

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное учреждение
Волгоградский медицинский научный центр**

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук
Григорьева Наталья Владимировна

доктор медицинских наук, профессор
Смирнов Алексей Владимирович

Волгоград - 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Гистологическая характеристика гиппокампа на этапах старения и его физиологическое значение	12
1.2. Морфологические изменения в гиппокампе при различных видах стресса	21
1.3. Роль стресса в возникновении и развитии нейродегенеративной патологии	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Экспериментальные животные и моделирование комбинированного стресса	34
2.2. Методы качественного и количественного морфологического исследования	36
2.3. Статистическая обработка и анализ данных	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
3.1. Морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев	41
3.1.1. Особенности гистологического строения дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев	41
3.1.2. Сравнительная иммунофенотипическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев	48
3.1.3. Особенности гистологического строения вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев	65
3.1.4. Сравнительная иммунофенотипическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев	68
3.2. Морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев при моделировании комбинированного стресса.....	83
3.2.1. Патоморфологическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев при моделировании комбинированного стресса	83

3.2.2. Иммуногистохимическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса	88
3.2.3. Патоморфологическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев при моделировании комбинированного стресса.	104
3.2.4. Иммуногистохимическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса	108
3.3. Морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса.....	120
3.3.1. Патоморфологическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса	120
3.3.2. Иммуногистохимическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса	124
3.3.3. Патоморфологическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса ..	140
3.3.4. Иммуногистохимическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса	144
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	158
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	174
ВЫВОДЫ	176
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	181
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	182
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	183

ВВЕДЕНИЕ

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 [63, 190, 220]. 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 [152, 238]. Гиппокамп является одной из наиболее чувствительных структур головного мозга к стрессовым воздействиям [5, 31, 88, 107, 152], 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 [5, 99, 105, 129, 173]. Кроме того, вентральный гиппокамп регулирует активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [5, 65, 122, 152, 281].

Представления о патогенетических механизмах стрессовых реакций включают сведения об активации вслед за стресс-реализующими, стресс-лимитирущих систем организма, минимизирующих повреждающее действие стресса [26, 134]. Гиппокамп играет важную роль в процессах снижения ответа ГГНС при стрессе, и уменьшении повреждения [88, 144]. Атрофия гиппокампа ухудшает его ограничительные влияния и ведет к более длительному ответу со стороны ГГНС на психологические стрессоры [25, 135].

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 [196], и как следствие – развитию нейродегенеративных изменений [4, 59, 63, 88, 170, 171, 262]. 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 [12, 13, 14, 18, 63] и при стрессе [152, 247, 282,], 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 [18, 14, 206, 251]. Кроме того, при моделировании различных стрессовых воздействий используются в основном молодые животные [32, 114, 247, 251], 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 [11]. 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) [7]. Эвтаназию проводили через 24 часа после последнего стрессового воздействия. Объектом для морфофункционального исследования являлся гиппокамп. В работе были использованы современные морфологические методы (нейрогистологический, 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.

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 «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, внедрены в научную работу ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России, практическую работу ГБУЗ «Волгоградское областное патологоанатомическое бюро», НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Волгоград-1 ОАО «РЖД»».

Личный вклад

Автору принадлежит основная роль в разработке дизайна исследования, заборе, фиксации, окраске с применением иммуногистохимической реакции экспериментального материала. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гистологическая характеристика гиппокампа на этапах старения и его физиологическое значение

В процессе старения происходит общее снижение физиологических функций организма, в том числе когнитивных [186, 240, 272]. Когнитивные способности являются решающим фактором, определяющим качество жизни пожилых людей [263], поскольку, начиная с шестого десятилетия жизни вероятность возникновения нейродегенеративных расстройств увеличивается [58, 168, 197, 201, 232]. Нормальное старение связано со снижением когнитивных функций в ряде регионов головного мозга, однако, некоторые когнитивные процессы, такие как вербальные навыки, семантическая память, являются относительно незатронутыми. В то время как заметный возрастзависимый дефицит наблюдается в эпизодической (декларативной) памяти, рабочей памяти, внимании и пространственном обучении [263]. Ключевая роль в процессах обучения и памяти отводится гиппокампу [172, 197, 224, 234]. Процесс кодирования пространственной памяти связан с СА1, СА3 гиппокампа и зубчатой извилиной. Гиппокамп и окружающие области, соединяющие неокортекс и амигдалу, помогают консолидировать информацию из краткосрочной памяти в долгосрочную память [197]. Процесс старения выявляет уменьшенные познавательные способности и уменьшенную пластичность гиппокампа [36]. У старых крыс (24 месяца), по сравнению с крысами в возрасте 3-4 месяцев обнаруживаются нарушения в гиппокампальной трисинаптической схеме (энториальная кора → зубчатая извилина → СА3 → СА1), посредством которой происходит формирование новой памяти и моносинаптической схеме (энториальная кора → СА1), которая усиливает старые воспоминания. Снижение нейронов в гранулярном слое зубчатой извилины и полиморфных клеток в СА4, может приводить к уменьшению мшистых волокон, нарушающих передачу нервного импульса от СА4 → СА3. Кроме того, в процессе старения снижается интенсивность накопления базофильной субстанции в пирамидных нейронах

CA3, что приводит к нарушению связей в коллатеральных Шаффера (CA3-CA1). Дезорганизация слоев нервных клеток в субикулуле нарушает выход нервного импульса из гиппокампа в префронтальную кору, энторинальную кору, гипоталамус и амигдалу, что может привести к прерыванию мыслительных процессов. Ухудшение памяти у старых крыс связано с дефектом нейронных цепей гиппокампа (зубчатая извилина-CA4-CA1-субикулум), которые значительно повреждаются [197]. При старении в гиппокампе отмечаются изменения во многих нейрохимических и нейрофизиологических процессах, которые могут приводить к нарушению когнитивных функций. Например, у крыс с возрастом в пирамидных нейронах гиппокампа наблюдается снижение ацетилхолина, нейротрансмиттера, участвующего в процессах памяти [177]. У старых крыс в гиппокампе происходит снижение транскрипции, нарушение синтеза нейротрофического фактора мозга BDNF и снижение активации его рецептора TrkB. Эти изменения могут способствовать когнитивному дефициту, связанному со старением [219].

Старение сопровождается уменьшением количества интернейронов, опосредующих ингибирующие механизмы в CA3. Анализ спонтанных глутаматергических и гамма-аминомасляных кислот-опосредованных токов на клетках CA3 обнаруживает резкое изменение амплитуды и частоты невозбужденных событий. CA3-клетки также проявляют повышенную внутреннюю возбудимость. Вместе эти результаты показывают, что старение сопровождается уменьшением ГАМК-ергического ингибирования, снижением экспрессии коротко- и долгосрочных форм синаптической пластичности и повышенной внутренней возбудимостью [43].

Возрастные изменения в гиппокампе связаны, в первую очередь, со сморщиванием нейронов, а не с их гибелью. Исследования на животных моделях старения демонстрируют снижение нейрональной плотности во всех зонах, а также числа дендритных шипиков в CA1 [111, 119, 262]. С возрастом увеличивается отношение удельного объема нейрона к нейронам [262]. В нейронах гиппокампа наблюдаются обратимые и необратимые изменения. В

соответствии с классическими представлениями к обратимым относят очаговый хроматолиз и гиперхромиию без сморщивания, к необратимым – тотальный хроматолиз с образованием клеток-теней и сморщенные гиперхромные нейроны [8, 13]. На модели преждевременно стареющих крыс линии OXYS обнаружено возрастзависимое увеличение дегенеративных изменений в СА1, СА3 и зубчатой извилине гиппокампа [12]. При исследовании гиппокампа крыс самцов и самок линии Sprague–Dawley в возрастном аспекте (1 месяц, 12 месяцев и 24 месяца) во всех областях гиппокампа наблюдались изменения, которые включали дистрофические изменения нейронов, которые не сильно различались между самцами и самками. Дистрофия нейронов у самцов наблюдалась в областях СА1, СА2 и СА3, а у самок в СА1, СА3 и СА4 [39].

Хотя потеря клеток в гиппокампе не является необходимым сопутствующим старению, размер гиппокампа варьирует в широких пределах у отдельных лиц. Нейроанатомические исследования позволяют определить, что размер гиппокампа уменьшается с возрастом, и это происходит у лиц, не страдающих неврологическими заболеваниями. МРТ-оценка экспериментальных животных указывает на небольшую атрофию гиппокампа, и не все исследования на людях сообщают об атрофии [139, 177, 235, 254]. По-видимому, атрофия гиппокампа может начаться в раннем взрослом возрасте и затем ускориться. Уменьшение в размере происходит на 0,3-2,1 % в год и у женщин проявляется меньше, чем у мужчин [177]. Уменьшение объема гиппокампа можно объяснить уменьшением размеров нейронов и связанных с ними дендритных и синаптических полей [279]. Кроме того, глия, как ненейрональный клеточный элемент гиппокампа, заметно способствует его объему из-за относительного её преобладания над нейронами. Следовательно, изменения в различных типах глии (астроциты, олигодендроциты и микроглия) могут способствовать атрофии. Действительно, миелинизация, функция олигодендроцитов, продолжается в гиппокампе человека и в 50 и в 60 лет, и старение может быть связано с ухудшением и потерей миелина. Белое вещество составляет около 3 % от гиппокампального образования [60, 123]. При старении в гиппокампе крыс,

мышей, кроликов, собак, обезьян и человека проявляется другой тип изменений морфологии глиальных клеток, выражающийся гипертрофией астроцитов, отличительной чертой которой является увеличение количества белка и мРНК глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) [52, 191]. Хотя астроглиоз обычно возникает в ответ на повреждение, увеличение, обнаруженное при старении, происходит у здоровых людей, у которых нет очевидных когнитивных нарушений или болезней. Важность этой возрастной астроцитарной гипертрофии неизвестна, но она может способствовать атрофическим изменениям, поскольку астроциты обеспечивают нейротрофическую поддержку, которая помогает поддерживать целостность и функцию нейронов. Чтобы полностью оценить роль различных типов глиальных клеток при старении гиппокампа, а также других областей мозга требуется понимание того, как глиальные клетки взаимодействуют с нейропилем и как эти взаимодействия меняются в течение всей жизни. Большинство исследований сосредоточены на нейронных популяциях и структурах серого вещества, однако многие исследователи отмечают важность изучения изменений происходящих в белом веществе, как при патологических состояниях, так и в процессе старения [60, 82, 126, 140, 145].

По другим данным, в гиппокампе крыс в возрасте 21-го месяца объем астроглиальных доменов, определяемый с помощью морфометрического анализа клеток, окрашенных антителами против глутаминсинтетазы (GS), был примерно в 2 раза больше по сравнению с 5-ти месячными животными. Однако общее количество астроцитов гиппокампа с возрастом не менялось, что обусловлено существенным увеличением перекрытия астроглиальных доменов [276]. Морфометрический анализ астроцитов, меченных тремя различными маркерами, GFAP, s100b и GS, выявил сложные и специфичные для региона изменения в астроглиальном проявлении [116]. Возрастание GFAP-позитивного материала было значительно больше в CA1 и зубчатой извилине гиппокампа и значительно меньше в энториальной коре. В то же время экспрессия белка s100b значительно увеличивалась с возрастом только в зубчатой извилине и энториальной коре, но не в области CA1, тогда как GS-позитивная экспрессия снижалась у старых крыс в

CA1 и зубчатой извилине, в то время как никаких изменений в энториальной коре выявлено не было. GS является центральным ферментом для глутамин-глутамата/GABA-шаттла [226], и, следовательно, зависящее от возраста снижение экспрессии GS может влиять как на возбуждающую, так и на ингибирующую нейротрансмиссию. Имеются также некоторые признаки метаболического ремоделирования астроцитов, окислительный метаболизм в астроглиальных клетках, по-видимому, увеличивается с возрастом, что может ограничить их способность снабжать нейроны метаболическими субстратами [146]. Возрастзависимое увеличение экспрессии GFAP и гипертрофия астроцитов могут, отражать астроглиальную адаптивную пластичность. Например, содержание крыс в клетках с обогащённой средой, а также физическая активность старых мышей и крыс увеличивала экспрессию GFAP в областях гиппокампа и приводило к астроцитарной гипертрофии с повышенной морфологической сложностью [53, 116]. Эти изменения в астроглии совпадали с улучшением познавательной способности [53]. Однако, как старение в целом влияет на астроцитарную глию остается неизвестным.

Оксид азота (NO) играет важную роль как в процессе физиологического старения, так и в возникновении нейродегенеративных заболеваний на этапах старения [102, 193]. NO является внутри- и межклеточным мессенджером и синтезируется тремя изоформами NO-синтаз: конститутивными нейрональной (nNOS) и эндотелиальной (eNOS), а также индуцибельной (iNOS) [194]. Повышенная экспрессия NO-синтаз наблюдается в головном мозге при многих патологических процессах [118]. Согласно одной из гипотез старения, избыточный синтез NO при активации iNOS в головном мозге приводит не только к развитию повреждений в клетках, но и посредством глутаматзависимого NO-сигнального пути может приводить к дегенеративным изменениям в нейронах во многих отделах головного мозга, включая гиппокамп [194]. Повторяющиеся инфекции центральной нервной системы и других органов могут привести к активации iNOS в головном мозге и увеличить концентрация NO, который может способствовать реализации механизмов эксайтотоксичности и дегенерации

нервных клеток [104]. Считается, что индукции iNOS не происходит во время физиологического старения [37, 74, 221], однако признается существенная роль системы NOS/NO в процессе старения Liu P. И соавт. [37, 138, 221]. Хотя классические взгляды указывают на роль nNOS в нейрональных моделях пластичности, данные, полученные с использованием нокаутных мышей, демонстрируют ключевую роль eNOS в вышеуказанных процессах. В ряде публикаций описано отсутствие влияния nNOS нокаута на процессы обучения и памяти при моделировании различной патологии [35, 54]. Учитывая экспрессию eNOS не только в эндотелии кровеносных сосудов, но и в астроцитах и нейронах гиппокампа [35, 221], необходимо отметить, что когнитивные нарушения у eNOS-дефицитных мышей сопровождаются селективной потерей эндотелиального NO [35]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что потеря NO в культуре эндотелиоцитов церебральных сосудов человека вызывает повышенную экспрессию белка предшественника амилоида (APP) и β -сайта APP расщепляющего фермента 1 (BACE1), что приводит к увеличению секреции β пептидов ($A\beta$ 1-40 и $A\beta$ 1-42) амилоида. Поскольку β пептиды амилоида рассматриваются как основные цитотоксические молекулы, ответственные за патогенез болезни Альцгеймера (БА), потеря эндотелиального NO может значительно способствовать инициации и прогрессированию когнитивных нарушений [149].

Измененная синаптическая морфология, прогрессирующая потеря синапсов и активация астроцитов и микроглии считаются характерными признаками старения. Недавние данные свидетельствуют о том, что существует связанное с возрастом снижение экспрессии пресинаптического белка синаптофизина и нейронального гликопротеина CD200, который взаимодействуя со своим рецептором, играет роль в поддержании микроглии в состоянии покоя. Эти возрастные изменения могут свидетельствовать о снижении нейроглиальной поддержки синапсов [38]. У 18-ти месячных крыс линии Вистар и OXYS, по сравнению с 5-ти месячными животными в цитоархитектонической области CA1 гиппокампа наблюдаются признаки дезорганизации синаптических везикул:

пузырьки не заполняют весь пресинаптический отросток, а у пресинаптической мембраны происходит увеличение их количества, в большинстве контактов пузырьки образуются лишь скопления у пресинаптической мембраны или располагаются группами вблизи нее [14].

Старение рассматривается как результат прогрессивного накопления молекулярных изменений, что в конечном итоге приводит к потере биологической функции [131]. Считается, что гибель нейронов 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 BDNF и гибели нейронов [167]. Общим механизмом повреждения нейронов гиппокампа при многих нейродегенеративных расстройствах является эксайтотоксическое действие высоких концентраций глутамата, которое, согласно общепринятой точке зрения, осуществляется в основном за счёт сверхактивации глутаматных рецепторов [124, 125].

Глутаматные рецепторы в гиппокампе необходимы для обучения и памяти. В глутаматергических синапсах локализуются два основных класса рецепторов, обычно называемых рецепторами N-метил-d-аспартата (NMDAR) и аминоксигматической кислоты (AMPA) [23, 42, 151]. AMPAR обычно состоят из четырех субъединиц (GluR1-R4), которые могут образовывать гетеро- или гомомерные комплексы, среди которых субъединица GluR2 является критической детерминантой проницаемости кальция [81]. В нескольких исследованиях сообщается возрастзависимое снижение уровня мРНК и белка NR1 (основной субъединицы для функции NMDAR), но не субъединицы AMPARs GluR1 и GluR2 [67, 80, 163], в то время как другие не обнаруживают ассоциированных с возрастом изменений экспрессии белка NR1 во всем гиппокампе [33]. Позднее было обнаружено резкое возрастающее снижение

экспрессии GluR2 в области CA1, но никаких существенных изменений в области CA2 и CA3 не было, что указывает на то, что эффекты старения на экспрессию субъединиц AMPARs различаются в связанных с памятью структурах мозга [157]. Однако точные изменения рецепторов глутамата в гиппокампе во время старения остаются в значительной степени неясными. Динамика AMPARs в синапсе является убедительным механизмом для понимания клеточной основы обучения и памяти [150]. Только 30-50 % AMPARs экспрессируются на поверхности нейронов, и значительная часть внутриклеточных рецепторов находится внутри дендритов [42, 255, 256]. Дисфункция AMPAR способствует нейротоксичности при нейродегенеративных заболеваниях [50]. В базовых условиях тетрамерные AMPAR часто состоят из субъединиц GluR2, в комплексе с субъединицей GluR1 или GluR3 [42, 265], в то время как в головном мозге у старых крыс доля GluR2 AMPARs выше [34]. Цитоплазматические домены GluR2, GluR3 и GluR4 по существу гомологичны и тесно связываются с родственными мультидоменными факторами PDZ в качестве мембранных анкером, таких как белок, взаимодействующий с глутаматным рецептором (GRIP) и связывающий белок AMPAR (ABP) [98]. С-конец GluRs также связывается с белком, взаимодействующим с С-киназой 1 (PICK1). PICK1 изначально изолирован из-за его взаимодействия с протеинкиназой С (PKC) [42, 203] и связывается с С-терминалом GluR2/3 [71]. Взаимодействие PICK1 с ABP/GRIP является критическим шагом [160], после фосфорилирования GluR2 PKC PICK1 диссоциация GluR2 из GRIP будет инициировать последующий каскад реакций [182, 202].

Возрастзависимый дефицит синаптической пластичности также отражает сдвиг в работе глутаматных NMDAR [121]. Тем не менее, важность уменьшения плотности рецепторов, как это было предложено ранее [80], оспорена в исследовании линии крыс Lou/C/Jall, представляющих модель здорового старения [267]. У этих животных не наблюдалось очевидных возрастных нарушений памяти, несмотря на значительное снижение NMDAR [28]. Интересно отметить, что нарушение активности NMDAR и синаптической пластичности, которые

отмечаются у старых крыс других линий [80] снижаются за счёт насыщающей дозы D-серина. D-серин представляет собой эндогенный лиганд стрихнин-нечувствительного глицин-связывающего сайт NMDAR [28] и синтезируется из L-изомера в ходе прямой реакции рацемизации, катализируемой сериновой рацемазой (CP), ферментом локализованным не только в астроцитах, но и в нейронах [283]. Нарушенная эффективность эндогенного D-серина обусловлена не изменениями аффинности к сайту связывания с глицином, а снижением уровня в ткани аминокислоты, вызванного более слабой экспрессией фермента CP [64]. В процессе старения чрезмерная активация оксидативного стресса приводит к инактивации CP, что влияет на синтез D-серина в нейронах гиппокампа и на динамику изменений нейронной сети при физиологическом старении, лежащих в основе нарушений памяти [237].

Необходимо отметить, что исследования, проведенные на грызунах и пациентах, свидетельствуют о том, что гиппокамп функционирует как гетерогенная структура с обособленными дорсальным и вентральным отделами [5, 97, 260]. Во-первых, анатомические исследования указывают на различия афферентных и эфферентных связей дорсального и вентрального отделов гиппокампа [5, 258]. В частности, дорсальный гиппокамп получает афферентные связи из энторинальной, древней и передней коры головного мозга [69, 103], тогда как вентральный гиппокамп иннервируется миндалиной [225]. Кроме того, дорсальный и вентральный гиппокамп имеют также различные эфферентные связи, дорсальный отдел, в основном, связаны с неокортексом, тогда как вентральный связан с подкорковыми структурами, включая амигдаллярный комплекс и парагиппокампальные области, гипоталамус, перегородку, вентральный стриатум и обонятельные области [49]. Во-вторых, была описана функциональная диссоциация, дорсальный гиппокамп, по-видимому, гораздо более активно участвует в когнитивной обработке информации (пространственной/контекстной), тогда как вентральный преимущественно участвует в обработке эмоциональной [260]. Например, известно, что поражение гиппокампа ухудшает пространственную навигацию крыс в водном лабиринте

Морриса [204] и что дорсальный гиппокамп необходим для оптимальной работы в этой задаче [101]. Напротив, вентральный отдел гиппокампа преимущественно участвует в тревожном поведении у грызунов, о чем свидетельствуют многочисленные исследования с использованием экологических угроз [97, 106, 112, 155].

Однако пока мало известно о морфофункциональных изменениях дорсального и вентрального отделов гиппокампа в процессе старения, поскольку большинство исследований сосредоточены на изучении гиппокампа как цельной структуры головного мозга.

1.2. Морфологические изменения в гиппокампе при различных видах стресса

Под стрессом понимают общий адаптационный синдром организма на воздействие различных неблагоприятных факторов – стрессоров (физических или психологических), нарушающих его гомеостаз. В процесс адаптации к стрессогенным факторам вовлекаются практически все органы и системы, однако ведущая роль принадлежит ГГНС [266]. В ответ на стресс выделяются глюкокортикоиды, которые связываются с минералокортикоидными и глюкокортикоидными рецепторами, лиганд-активированными факторами транскрипции, участвующими в регуляции транскрипции генных сетей в головном мозге, необходимыми для преодоления стресса, восстановления и адаптации [212]. Высокое количество глюкокортикоидных рецепторов экспрессируется в нейронах CA1 зоны и зубчатой извилины гиппокампа, что обуславливает их восприимчивость к гормонам стресса [148]. Воздействие стресса или гормонов стресса влияет на синаптическую пластичность гиппокампа, нейрохимию, нейрогенез, морфологию и апоптоз нейронов [89, 252], а также нарушает гиппокамп-зависимые процессы обучения и памяти [87].

Рассматривая различные функциональные аспекты стрессовых реакций, можно отметить ключевые различия в процессах кратковременной (острой) и длительной (долговременной, хронической) адаптации организма к

стрессогенному стимулу [170]. В первом случае выброс гормонов и химических медиаторов, таких как глюкокортикоиды и катехоламины, приводит к увеличению частоты сердечных сокращений и повышению артериального давления. Подобные реакции наблюдаются как при простых актах, как утренний подъем с постели, так и при комплексных мультисистемных реакциях, например при заболеваниях, сопровождающихся болевым синдромом [16].

В условиях длительного (хронического) стресса происходит резкое увеличение нагрузки на нервную и эндокринную системы, особенно на центры, регулирующие кардио-респираторные функции [26], что приводит к постоянному и длительному повышению уровней гормонов, в частности глюкокортикоидов и катехоламинов. Хронизация эпизодов тахикардии и артериальной гипертензии при стрессе рассматривается как важнейший фактор риска развития атеросклероза, гипертонической болезни (эссенциальной артериальной гипертензии) и, как следствие, инфарктов миокарда, головного мозга, внутримозговых кровоизлияний [266].

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 [17, 187], атрофию дендритов и исчезновение дендритных шипиков в пирамидном слое СА3 зоны гиппокампа, а также приводит к нарушению синаптических механизмов пластичности [125, 171, 173], что сопровождается когнитивными нарушениями [2], приводит к потере памяти и способствует снижению способности к обучению [31, 153, 193]. У контрольных крыс терминали мшистых волокон полностью заполнены везикулами, содержащими глутамат, тогда как у стрессированных животных, подвергнутых иммобилизационному стрессу количество везикул снижается, а оставшиеся находятся в нескольких активных синаптических зонах в пресинаптических терминалях [173]. СА3 не является единственной областью гиппокампа, которая демонстрирует дендритную реорганизацию после хронического стресса. Сообщалось, что у взрослых крыс в СА1 апикальные дендриты укорачивались

после перенесенного ими хронического стресса в период новорожденности [173]. Сравнение мультимодального стресса (одновременное длительное действие света, громкого звука, толкания и ограничения подвижности) с ограничением подвижности или громким звуком показало больший дефицит памяти, зависящей от гиппокампа, после мультимодального стресса, по сравнению с ограничением подвижности или громким звуком. Эти различия в памяти не были объяснены различиями в уровнях кортикостерона в плазме или изменением количества Fos-меченых стресс-чувствительных нейронов гипоталамуса. Измерения плотности синапсов при разных видах стрессового воздействия показало, что в СА3 гиппокампа их плотность снижалась как при ограничении подвижности, так и при мультимодальном стрессе, тогда как мультимодальный стресс приводил к уменьшению плотности синапсов и в СА1 дорсального отдела гиппокампа. При этом ни один из этих видов стрессового воздействия не влиял на плотность синапсов в СА1 вентрального отдела гиппокампа. Используя c-Fos в качестве маркера активности нейронов было установлено, что мультимодальный стресс приводил к уменьшению связи гиппокампа с перегородкой и таламусом и увеличивал связь с миндалиной по сравнению со стрессом, ограничивающим подвижность животных [173, 209].

Повреждение гиппокампа при воздействии мягкого стресса происходит позже, чем у крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессовому воздействию. Модель хронического иммобилизационного стресса влияет как на исследовательское поведение, так и на экспрессию белков теплового шока HSP70 в СА3 гиппокампа более выражено, чем модель хронического мягкого стресса [142].

Под влиянием комбинированного 14-х суточного стрессового воздействия (наклонное положение клетки, использование подкисленной уксусной кислотой воды, воздействие светом стробоскопа, использование запаха и звуков, издаваемых хищниками) у 3-х месячных крыс наблюдались структурные отличия в вентральном и дорсальном субрегионах гиппокампа [99].

У мышей линии C57Bl6 после 10-ти дневного хронического иммобилизационного стресса наблюдалась ретракция дендритов пирамидных нейронов CA3, а также ретракция дендритов пирамидных нейронов CA1 только в дорсальном отделе гиппокампа. При этом у мышей с отсутствием NMDA-рецепторов после воздействия хронического стресса, ретракция дендритов не проявлялась ни в CA3, ни в CA1, и имела минимальное влияние на активацию ГГНС и поведенческие изменения [78].

Помимо глюкокортикоидов и рецепторов возбуждающих аминокислот, растет список медиаторов, вовлеченных в вызванное стрессом ремоделирование дендритов. К ним относятся трофические факторы, такие как BDNF, секретируемая сигнальная молекула и протеаза tPA, липокалин 2, кортикотропин релизинг фактор (КРФ) и эндоканнабиноиды. Важнейшую роль играют сигнальные поверхностные клеточные молекулы. Экспрессия полисиалирированной формы молекулы адгезии нервных клеток (PSA-NCAM) в гиппокампальной формации повышается при стрессе, в то время как удаление PSA с помощью эндонейраминидазы-N (Endo-N), как известно, приводит к тому, что мшистые волокна теряют расположение пучком. Большая часть структурного ремоделирования дендритов связана с изменениями в экспрессии генов, за счёт глюкокортикоидного ответа и является результатом изменений в транскрипции ДНК (геномные эффекты). Однако стресс-индуцированная пластичность также может быть опосредована с помощью негеномных механизмов [173].

Пренатальный стресс влияет на поведение и процессы памяти потомства, что, вероятно, связано с морфологическими изменениями в головном мозге. Все исследования, в которых изучались индуцированные пренатальным стрессом изменения морфологии головного мозга, были сосредоточены главным образом, на изучении дорсального отдела гиппокампа. В работе Mart'inez-T'ellez R. I. и соавт. [210] была показана возрастная зависимость в изменении дендритной морфологии пирамидных нейронов гиппокампа CA1 и CA3 после пренатального стресса. Они обнаружили, что область CA3 гиппокампа более подвержена воздействию пренатального стресса, поскольку уменьшение плотности

дендритных шипиков наблюдается как в препубертатном периоде (в возрасте 35 дней), так и у взрослых (в возрасте 65 дней) крыс самцов, в то время как уменьшение плотности дендритных шипиков в СА1 характерно только для взрослых животных. Интересно, что пирамидные нейроны СА1 у животных препубертатного периода характеризовались повышенной плотностью дендритных шипиков [210]. В исследовании пренатального стресса В. Petit и соавт. [249] была показана более высокая плотность шипиков на апикальных дендритах в СА1 гиппокампа у ягнят сразу после рождения. Пренатальное стрессовое воздействие в течение последней недели беременности приводило к атрофии дендритов, выраженному сокращению общей длины и уменьшению числа точек разветвления апикальных дендритов пирамидных нейронов в СА3 дорсального отдела гиппокампа также у самок препубертатного периода [211]. В другом исследовании было показано, что пренатальный стресс не влияет ни на общее количество нейронов, ни на количество и распределение, как апикальных, так и базальных дендритов, а также на общую плотность дендритов пирамидных нейронов СА1 гиппокампа у потомства обоих полов в возрасте 5-ти недель [285]. Дендритная морфология пирамидных нейронов СА1 также не была изменена у потомства в возрасте 2-х месяцев. Сниженная синаптическая плотность, длина и количество ветвлений дендритов пирамидных нейронов СА3 у потомства в возрасте 35-дней и 2-х месяцев после воздействия разнообразных пренатальных стрессоров были продемонстрированы и в других исследованиях [141]. Кроме того, кратковременный мягкий пренатальный стресс (30-ти минутное ограничение подвижности с 15-го по 17-й день беременности) усиливает нейрогенез в гиппокампе у новорожденных крыс самцов в возрасте 10-ти недель, а длительный тяжелый пренатальный стресс (240 минут ограничения подвижности с 15-го дня по 17-й день беременности) нарушает морфологию нейронов гиппокампа. Минералокортикоидные и глюкокортикоидные рецепторы способствуют изменениям, вызванным пренатальным стрессом [129].

Гиппокамп играет важную роль в процессах снижения ответа ГНС при стрессе, и уменьшении повреждения [144, 156], вызывает транссинаптическое

ингибирование КРФ нейронов паравентрикулярного ядра гиппоталамуса с помощью глутаматергических влияний гиппокампа на ГАМК-ергические нейроны в других областях, которые, в свою очередь, могут ингибировать нейроны паравентрикулярного ядра [70, 274].

Атрофия гиппокампа ухудшает его ограничительные влияния и ведет к более длительному ответу со стороны ГГНС на психологические стрессоры [134]. Так, в исследованиях Lupien и соавт. [90] показано, что прогрессивное увеличение кортизола в слюне во время ежегодной сдачи экзаменов в течение 5-летнего периода прогнозировало уменьшение объема гиппокампа и снижение выполнения гиппокамп-зависимых задач на память. У людей с синдромом Кушинга и пациентов, получающих глюкокортикоиды в качестве терапии, может также наблюдаться атрофия гиппокампа [187]. Показана специфика вовлечения гиппокампа в реализацию стрессового ответа у особей с разной чувствительностью к эмоциональному стрессу [21].

Известно, что нейроны гиппокампа восприимчивы не только к стрессу, но и к старению [128, 242], поскольку, процесс старения связан с нарушением регуляции ГГНС, что приводит к замедленному окончанию стресс реакции [196]. Стресс и глюкокортикоиды могут способствовать снижению возрастных изменений в численности нейронов гиппокампа. Считается, что повреждение нейронов гиппокампа может быть связано с эксайтотоксическим действием высоких концентраций глутамата, которое осуществляется через NMDA-рецепторы и вызывает высвобождение NO [125]. Действие хронического стресса вызывает усиление экспрессии nNOS и iNOS как в новой коре, так и в гиппокампе [27]. С помощью глутамата осуществляется динамическая регуляция содержания CP, активация метаботропных глутаматных рецепторов приводит к расщеплению фосфатидилинозитола (4,5)-бифосфаткарбоксилазы (PIP₂) фосфолипазой C (PLC), тем самым уменьшая ингибирование CP [127]. Глутамат/D-серин активирует NMDA-рецепторы, максимальная концентрация которых у крыс представлена в CA1 зоне гиппокампа. NO по принципу обратной связи гомеостатической регуляции вызывает уменьшение активности CP и тем самым снижает уровень D-

серина, что, в свою очередь, приводит к уменьшению NMDA-зависимой нейротрансмиссии [109, 127, 195, 239]. У мышей с отсутствием гена *СР* наряду с дефицитом памяти [108] наблюдается уменьшение ветвлений, общей длины и плотности расположения шипиков апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов в первичной самотосенсорной коре [269].

При изучении влияние острого болевого стресса на уровни глутамата в гиппокампе и медиальной префронтальной коре молодых (3-4 месяца) и старых (22-24 месяца) крыс Fischer 344 наблюдалось умеренное увеличение уровня глутамата в гиппокампе у молодых и старых крыс. После прекращения процедуры стресса концентрация глутамата в гиппокампе продолжала расти у старых крыс, достигнув уровня, примерно в пять раз превышающего уровень у молодых крыс, и оставалась повышенной в течение как минимум 2 часов после прекращения стресса. Аналогичная картина наблюдалась и в медиальной префронтальной коре [29].

Функционирование нейронов гиппокампа во время стресса в старости зависит от BDNF [36, 46, 189, 246], поскольку BDNF является чувствительным к стрессу межклеточным мессенджером, участвующим в регуляции активности ГГНС [30, 253]. Благодаря своей способности защищать нейроны от дисфункции и повреждения, этот фактор вовлечен в нейробиологические механизмы, лежащие в основе пластичности мозга после стресса [113, 169, 188, 205]. Острое принудительное плавание вызывало значительное увеличение плотности BDNF-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA2 и CA3 гиппокампа у старых (720 суток) крыс Wistar Han, а острое стрессовое воздействие в виде яркого света приводило к увеличению BDNF в CA1-CA3 гиппокампа. Однако плотность BDNF-иммунопозитивных нейронов оставалась неизменной после воздействия хронического стресса. Эти результаты указывают на то, что острый стресс индуцирует увеличение плотности BDNF-иммунопозитивных пирамидных нейронов, что, вероятно, связано с повышенной регуляцией активности ГГНС и кратковременной обработкой памяти стрессовой ситуацией. Хронические

воздействия не является отягчающим фактором для крыс в изученных онтогенетических периодах [85].

Кроме того, нарушение регуляции ГГНС в свою очередь может увеличивать воздействие глюкокортикоидов и ускоряет дегенеративные процессы в гиппокампе стареющего организма [196]. Тем не менее, основные механизмы, с помощью которых стресс вызывает нейродегенеративные изменения и повреждения в гиппокампе при старении остаются неясными. Остается также открытым вопрос о морфологических различиях между дорсальным и вентральным отделами гиппокампа стареющего организма на фоне различных видов стрессового воздействия.

1.3. Роль стресса в возникновении и развитии нейродегенеративной патологии

Хронический стресс является одним из основных этиологических факторов, активирующих каскад процессов, способствующих развитию и прогрессированию различных нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП) [92, 133, 227, 250, 257]. Известно, что 50-60 % всех форм деменции приходится на БА [214], при этом 95 % всех случаев БА представляют спорадическую её форму и затрагивают почти 40 миллионов человек во всем мире [180]. Первичные этиологические факторы, ответственные за развитие семейной формы БА хорошо изучены и представляют собой наследуемые мутации в генах, которые кодируют белок предшественник амилоида (APP), пресенилин 1, пресенилин 2 и/или небольшое количество других белков [236]. В случае спорадической формы БА её этиология многофакторна, однако, существуют два общепринятых основных фактора риска: возраст и аллельный вариант гена ApoE e4 [217]. Кроме того, существует несколько гипотез относительно спорадического этиопатогенеза БА, в основном базирующихся на роли амилоида $\beta_{40,42}$ и посттрансляционных модификаций тау-белка [181]. Если тау-белок гиперфосфорилируется, он становится способен к агрегации и образованию нейрофибриллярных клубочков [180]. Кроме того, была исследована

роль митохондриальной дисфункции, дефектов эндолизосомальной системы, аутофагии, нейровоспаления, окислительного стресса и повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера при БА [48, 200]. Однако данные гипотезы сосредоточены на патологических процессах, которые являются последствиями, а не первичными этиологическими факторами БА. Вероятно, что сочетание нескольких факторов (например, возрастные изменения, влияющие на уровень экспрессии генов, инфекционные агенты, токсические соединения, травмы головы) инициирует нейропатологические процессы, приводящие к образованию абберантных тау-белков и β -амилоида ($A\beta$), снижению синаптической пластичности и гибели нейронов, приводящие к развитию спорадической формы БА [180].

Считается, что нейродегенерация (накопление $A\beta$ и абберантных тау-белков) начинается за 20-30 лет до появления клинических симптомов БА и сопровождается умеренными когнитивными расстройствами (УКР) [214].

Эпидемиологические исследования, проведенные за последние два десятилетия, указывают на возможную связь между хроническим психосоциальным стрессом и началом развития БА [45, 94, 95, 208]. При этом риск развития УКР увеличивается примерно на 2 % после каждого стрессового воздействия и более высокий уровень хронического психологического стресса увеличивает выраженность УКР [92]. Несмотря на то, что стресс довольно часто встречается у пациентов с БА [250], роль нейроэндокринных и поведенческих последствий стрессового ответа в развитии нейропатологии, связанной с БА, не детально исследована [180].

При БА происходит сверхактивация ГГНС, что может приводить к дисрегуляции нейромедиаторов при стрессе и играть ключевую роль в патофизиологии БА [147, 207, 214]. Повышенная активация ГГНС была показана на трансгенных линиях мышей Tg2576 (характеризуется накоплением $A\beta$) и P301S (PS19) (характеризуется гиперфосфорилированием тау-белков, образованием нерастворимых агрегированных комплексов). У Tg2576 мышей после длительного стрессового воздействия увеличивался уровень $A\beta$,

подавлялась активация микроглии и ухудшалась пространственная память. Роль КРФ1-зависимого механизма была дополнительно подтверждена обнаружением того, что у мышей избыточная экспрессия КРФ увеличивала гиперфосфорилирование тау-белка по сравнению с мышами дикого типа [77]. Кроме того, у крыс, подвергнутых 4-х недельному хроническому непредсказуемому стрессу, наблюдалось значительное увеличение APP и A β в гиппокампе и префронтальной коре [264]. Различные физиологические и клеточные стрессоры, в том числе старение и гипоксия, могут «высвободить» микроглию и усугублять нейровоспаление при БА [40]. Помимо глюкокортикоидов, симпатически высвобожденный нейротрансмиттер NE также участвует в провоспалительных реакциях микроглии в ответ на стресс при БА. Снижение NE у трансгенных мышей увеличивало нейровоспаление и уменьшало фагоцитоз микроглией A β , в то время как добавка NE-предшественника L-трео-3,4-дигидроксифенилсерина увеличивала фагоцитоз микроглией A β , ослабляя опосредованное микроглией нейровоспаление и восстанавливая микроглиальную подвижность по отношению к A β [158].

В моделях БА нарушенные длительная потенция (LTP) и дефицит памяти могут усугубляться хроническим стрессом или введением гормонов стресса. Эти эффекты коррелируют со снижением фосфорилирования кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) во время LTP [45]. Стрессовое воздействие нарушает пространственную память у крыс и ослабляет фосфорилирование CaMKII, несмотря на то, что сама киназа была активирована [243]. Интересно отметить, что ген шизофрении DISC1 регулирует активацию глюкокортикоидных рецепторов и протеолитический процессинг APP [47, 223]. «Выключение» DISC1 значительно снижает уровень A β [100]. A β -очистка системой комплемента может обеспечить еще один путь, связывающий стресс с БА. Аллельные варианты генов компонентов системы комплемента C4A и C4B связаны с восприимчивостью к шизофрении, а дефицит C4 связан со снижением количества синапсов у мышей [233]. С учетом последствий стресса на функцию микроглии эти данные свидетельствуют о возможных механизмах того, как стресс

может способствовать увеличению микроглиально-опосредованной нейропатологии и синаптической дисфункции, которые лежат в основе когнитивных нарушений при БА [214].

Стресс может играть определенную роль в развитии БП. БП представляет собой нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей дофаминергических нейронов в *pars compacta* черной субстанции и, в меньшей степени, норадренергических нейронов в *locus coeruleus*. Большинство случаев БП представляют идиопатические и спорадические формы и, как полагают, являются результатом как экологических, так и генетических факторов [76].

При моделировании хронического иммобилизационного стресса у крыс (8 ч/сут, 5 дней в неделю) снижается число дофаминергических нейронов в *pars compacta* черной субстанции и норадренергических нейронов в *locus coeruleus*. Потеря дофаминергических нейронов в черной субстанции была очевидна после 2-х недель стресса и прогрессировала в зависимости от времени, достигнув 61 % через 16 недель. Это снижение сопровождалось активацией микроглии и окислительным стрессом [76].

Основным фактором риска развития БП является старение, которое может быть связано с повышенными уровнями кортизола. Кортизол также повышен у пациентов с БП по сравнению со здоровыми пациентами. Терапия леводопой может снизить уровень кортизола в плазме у пациентов с БП [133], что указывает на связь между снижением дофамина и гиперактивностью ГГНС. Стрессовые жизненные события также могут ускорить развитие БП. Эмоциональный стресс может временно увеличивать двигательные симптомы [162]. Потеря кортикальных дофаминергических нейронов, которая встречается на более поздних стадиях БП, может привести к повышенной уязвимости к стрессу, так как высвобождение дофамина в коре тормозит стресс-активированные нейроны в ядре *accumbens* [133]. Глюкокортикоиды могут ускорять нейродегенеративные процессы при БП [176]. Области головного мозга, участвующие в моторном контроле, содержат как дофаминергические маркеры, так и рецепторы глюкокортикоидных гормонов [44]. Стресс влияет не только на

дофаминергические нейроны в мезокортикальном и мезолимбическом путях, но также и на нигростриарный путь [117]. Глюкокортикоиды и связанная со стрессом тревога могут влиять на моторную функцию, поскольку у животных острый и хронический стресс, а также длительное введение кортикостерона нарушают движение во время теста на достижение и могут быть отменены путем введения анксиолитических соединений [174]. Эти исследования показывают, что стресс может влиять на дофаминергический контроль двигательных движений, причем глюкокортикоиды могут влиять на компенсаторный ответ поврежденной моторной системы [175]. Интересно отметить, что глюкокортикоиды, действующие через рецепторы глюкокортикоидных гормонов, оказывают нейропротекторный эффект на поврежденные дофаминергические нейроны нигростриатума [176]. Таким образом, возникает сложная картина относительно точной роли и функции гормонов стресса в БП. Во время раннего развития потомства периодическое отделение матерей увеличивало дефицит моторного поведения и снижение уровня тирозингидроксилазы у взрослых крыс в стриатуме, после введения им 6-гидроксидофамина [165]. Лишение материнской заботы может иметь другие долгосрочные последствия, такие как появление депрессивных симптомов у взрослых животных [166]. Напротив, физические упражнения могут оказывать нейропротективный эффект при БП [161].

Возбуждающие аминокислоты, такие как глутамат, могут действовать на рецепторы внутри *pars compacta* черной субстанции, увеличивая высвобождение дофамина в стриатуме во время стрессового воздействия [68]. Возбуждающие аминокислоты играют роль в нейродегенерации, наблюдаемой в гиппокампе после стрессового воздействия [173]. Увеличение дофамина, вызванного возбуждающими аминокислотами, может увеличить уязвимость нейронов в нигростриаторном пути и вызвать нейротоксический эффект [68]. В дополнение к изменениям в синтезе нейротрансмиттеров считается, что воспаление является основным фактором в этиологии БП [215]. Воспаление приводит к снижению уровня BDNF в *pars compacta* черной субстанции у животных [228], а повышенные уровни цитокинов встречаются вместе со снижением BDNF у больных БП [183].

Хронический стресс в свою очередь увеличивает синтез провоспалительных медиаторов в моделях депрессии у животных [213]. Как хронический стресс, так и введение кортикостерона приводят к увеличению моторных нарушений у пораженных животных [245]. Тем не менее, хотя в этом исследовании отмечалось увеличение количества меченых клеток Fluro-Jade (что указывает на нейродегенерацию) в *pars compacta* черной субстанции, не было уменьшения количества тирозингидроксилаза-положительных клеток [245]. Интересно, что в исследовании Suzuki и соавт. [96] утверждается, что поражение *pars compacta* черной субстанции приводит к снижению клеточной пролиферации в субгранулярном слое зубчатой извилины, что может замедлять эффекты антидепрессантов. Это говорит о том, что повреждение нигрострирной системы может повлиять на контроль стрессовых реакций [133].

Исходя из приведенных данных, существует связь между стрессовым воздействием, началом развития и прогрессированием нейродегенеративных заболеваний.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что стрессовое воздействие и старение являются фактором риска в развитии нейродегенеративной патологии. В стресс-моделях в основном используются молодые животные. Практически полное отсутствие четких данных об особенностях морфологических изменений нейронов различных цитоархитектонических областей и пространственной иммунофенотипической гетерогенности гиппокампа не только при различных видах стресса, но и в процессе старения не позволяет определить структурные механизмы адаптации различных регионов гиппокампа стареющего организма в условиях стрессового воздействия. Несмотря на то, что в настоящее время выделение дорсального и вентрального отделов гиппокампа по септотемпоральной оси полностью обосновано функциональными различиями этих регионов, структурные особенности в дорсальном и вентральном гиппокампе при старении и под влиянием стресса остаются мало изученными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные и моделирование комбинированного стресса

Исследование проводилось на 40 нелинейных белых крысах самцах 2-х возрастных групп: 12-ти и 24-х месяцев (зрелого и старческого возраста, соответственно [11]), полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). При содержании животных, моделировании комбинированного стресса, а также выведении их из эксперимента руководствовались 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. Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым свето-темновым циклом при температуре воздуха $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, влажности 60 %, свободным доступом к воде и полноценному гранулированному корму ГОСТ Р 50258-92 (Изготовитель ЗАО «Волосовский комбикормовый завод»). После доставки животных из питомника они находились на карантинном режиме в течение двух недель и прошли необходимый осмотр перед включением их в эксперимент. Крысы были распределены по группам, что отражено в таблице 1.

Таблица 1 – Экспериментальные группы животных

№ группы	Группа эксперимента	Количество животных, n
1	Контрольные крысы в возрасте 12 месяцев	10
2	Контрольные крысы в возрасте 24 месяцев	10
3	Стрессированные крысы в возрасте 12 месяцев	10
4	Стрессированные крысы в возрасте 24 месяцев	10

Моделирование стрессового воздействия проводилось в специальной установке, представляющей собой камеру шириной 28×36×28 см, разделённую на 6 изолированных отсеков (4×12×28 см) и закреплённую на наклонной плоской металлической платформе с регулируемым углом наклона от 1 до 12°, на стенках камеры по периметру расположены вентиляционные отверстия, обеспечивающие циркуляцию воздуха. Животные подвергались длительному неизбежному стрессированию в течение 7 дней (ежедневно по 30 минут) в установке со сменой разномодальных раздражителей (пульсирующий свет, громкий звук, вибрация) каждые 5 минут по стохастической схеме, таким образом, чтобы каждое последующее стрессирующее воздействие было непредсказуемым для животных. Во время стрессирования животные в ячейки были иммобилизованы, а температура внутри камеры повышалась на 7-8°C, что обусловлено теплоотдачей животных, источниками света и работающим мотором установки, что являлось дополнительным повреждающим воздействием. Эвтаназию проводили с помощью гильотинного метода с использованием «Гильотины для крыс» (AE0702, производитель «Open Science», Россия) через 24 часа после последнего стрессового воздействия. Экспериментальное моделирование, оценка функциональных и биохимических показателей у животных проводилась нами совместно с сотрудниками кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ¹.

¹*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.х.н. Д. В. Куркину и всем сотрудникам кафедры за помощь в проведении эксперимента*

2.2. Методы качественного и количественного морфологического исследования

Материалом исследования являлся головной мозг крыс. Головной мозг извлекали из полости черепа 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. После фиксации материал 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 ротормом микротоме изготавливали серийные фронтальные срезы толщиной 4-5 мкм [10, 24]. Окраску парафиновых срезов проводили гематоксилином и эозином, для выявления хроматофильного вещества в перикарионах нейронов срезы окрашивали тионином по методу Ниссля [15].

Для иммуногистохимического исследования² изготовленные парафиновые срезы (4 мкм) подвергали депарафинизации. Высокотемпературную демаскировку антигенных детерминант проводили с помощью нагревания срезов в 10 мМ растворе высокощелочного фосфатного буфера (pH 9,0) (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) при 98 °С в течение 30 минут с последующим охлаждением при комнатной температуре в течение 20 минут. В качестве промывочного буфера использовали 20 % TBS IHC Wash Buffer with Tween 20 (Cell Marque, USA). Для блокирования эндогенной пероксидазы применяли 3 % раствор H₂O₂ (Cell Marque, USA). С целью определения экспрессии различных антигенов в качестве первичных антител использовали поли- и моноклональные антитела к соответствующим белкам (Таблица 2). В соответствии с рекомендуемыми протоколами фирм производителей подбирали рабочее разведение первичных антител, время и условия инкубации.

²Иммуногистохимическое исследование было выполнено в лаборатории морфологии, иммуногистохимии и канцерогенеза ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр» (директор – академик РАН А. А. Спасов, заведующий лабораторией – д.м.н., профессор А. В. Смирнов)

Таблица 2 –Панель использованных в исследовании антител

Название	Клон/№ по каталогу	Фирма, страна производитель	Разведение	Демаскировка антигенных детерминант	Время и условия инкубации
caspase-3	GTX24051	GeneTex, Inc.	1:100	термическая обработка	24 часа, влажная камера, температура +4..+8 ⁰ С
iNOS	GTX15323	GeneTex, Inc. Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100 rtu	термическая обработка	20 минут, влажная камера, комнатная температура
eNOS ³	GTX50892	GeneTex, Inc. Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:50 rtu	термическая обработка	2 часа, влажная камера, комнатная температура
nNOS	EP1855Y GTX61671	GeneTex, Inc.	1:100	термическая обработка	24 часа, влажная камера, температура, +4..+8 ⁰ С
beclin-1	GTX3770	GeneTex, Inc.	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
GFAP	Ab-6 (ASTR06)	Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	rtu	нет	1 час, влажная камера, комнатная температура
BDNF	EPR1292 GTX62594	GeneTex, Inc.	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура
HSP70	Ab-2 (w27) mouse Mab MS-482-P	Thermo Scientific, NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100	термическая обработка	1 час, влажная камера, комнатная температура

Продолжение таблицы 2

Название	Клон/№ по каталогу	Фирма, страна производитель	Разведение	Демаскировка антигенных детерминант	Время и условия инкубации
сериновая рацемаза	mouse monoclonal IgG ₁ sc-365217	Santa Cruz, Biotechnology, Inc., USA	1:50	термическая обработка	2 часа, влажная камера, комнатная температура
синапто-физин	monoclonal mouse SY38	Dako, Denmark	1:20	термическая обработка	20 минут, влажная камера, комнатная температура

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). В соответствии с протоколами фирм производителей при определении экспрессии первичных антител использовали позитивные контроли. Негативным контролем служили срезы с экспериментальным материалом, на которые наносили разбавитель антител (Cell Marque, USA), но не наносили первичные антитела.

³Исследование выполнено при поддержке гранта ВолгГМУ (Приказ № 715-КМ, 2015 г.)

Фронтальные срезы головного мозга изучали на уровне от -2,28 мм до -6,12 мм относительно брегмы [198]. 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).

На срезах, окрашенных тионином по методу Ниссля в СА1 и СА3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа определяли следующие показатели:

1. Абсолютные показатели – площадь перикарионов нейронов, площадь ядер нейронов, площадь цитоплазмы перикарионов нейронов.
2. Ширину пирамидного слоя.
3. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы.

На основе полученных параметров рассчитывали:

1. Относительные показатели – относительную площадь перикарионов нейронов, относительную площадь ядер нейронов, относительную площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, относительную площадь нейропиля.
2. Ядерно-цитоплазматическое отношение.
3. Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропилю.

Для оценки результатов иммуногистохимической реакции в СА1 и СА3 дорсального и вентрального отделов гиппокампа определяли:

1. Удельное количество иммунопозитивных нейронов.
2. Относительную площадь иммунореактивного материала (суммарная площадь измеренных объектов, отнесенная к площади тестовой системы [6]).
3. Интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабовыраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание).

2.3. Статистическая обработка и анализ данных

Описание количественных признаков и статистический анализ данных в полученных выборках проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах [3, 22]. Возможные промахи и артефакты среди экспериментальных данных обнаруживали с помощью Q-теста, если объем выборки был меньше 12, или по методу трех сигм, в случае больших выборок. Проверка соответствия выборочных распределений нормальному проводилась по критерию Шапиро-Уилка [22]. При описании параметров выборки центральную тенденцию характеризовали с помощью медианы (Me), которая при малом объеме выборки и отклонениях одномодального распределения от нормального в наилучшей степени соответствует генеральному среднему [3]. Для оценки вариабельности показателей указывали интерквартильный интервал ($Q1-Q3$), где $Q1$ – 25 перцентиль, $Q3$ – 75 перцентиль. Наличие различий между выборками проверяли путем попарного сравнения выборок с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test) [22]. Для оценки справедливости гипотезы о существовании различий между выборками рассчитывали критический уровень статистической значимости с учетом поправки Бонферрони [3, 22].

Все статистические расчеты проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0, фирмы StatSoft, Inc. (США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе гистологического исследования у экспериментальных групп животных на фронтальных срезах головного мозга в гиппокампе определялись 4 основные цитоархитектонические области – СА1, СА2, СА3, СА4. Микроскопически гиппокамп имел характерную стратификацию. Доминирующими нейронами являлись нейроны пирамидного слоя (stratum pyramidale), которые в СА1 располагались более компактно, по сравнению с СА2-СА4. Краевой слой (stratum oriens) гиппокампа представлял собой узкий относительно бесклеточный слой. Радиальный (stratum radiatum) и молекулярный слои (stratum moleculare) состояли в основном из дендритов пирамидных нейронов. При сравнении особенностей гистологического строения дорсального и вентрального отделов гиппокампа у исследуемых групп животных наиболее выраженные изменения наблюдались в пирамидном слое СА1 и СА3.

3.1. Морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев

3.1.1. Особенности гистологического строения дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев

При нейрогистологическом исследовании СА1 дорсального отдела гиппокампа у 12-ти месячных крыс большинство нейронов пирамидного слоя характеризовалась близкой к округлой форме перикариона с центрально расположенным округлым ядром, как правило, с хорошо выраженным ядрышком. В цитоплазме отмечалось равномерное распределение пылевидной и мелкоглобулярной субстанции Ниссля. Пирамидные нейроны в СА1 располагались в 2-4 слоя (Рисунок 1). Встречались единичные нейроны с гиперхроматозом цитоплазмы, сморщиванием перикарионов, с явлениями очагового и тотального хроматолиза. Обнаруживались единичные участки выпадения нейронов.

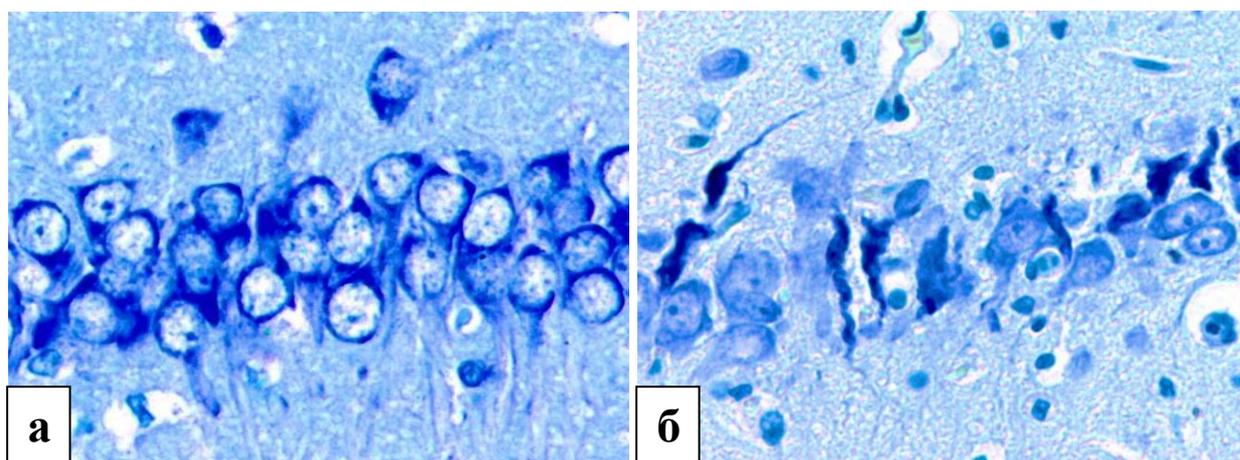


Рисунок 1. Гистологическое строение пирамидного слоя СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Перикарионы нейронов пирамидного слоя близкие округлой форме (а). Наличие в пирамидном слое сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы (б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

У 24-х месячных животных в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа наряду с неизменёнными нейронами, обнаруживались нейроны, перикарионы которых приобретали неправильную форму, цитоплазма и ядра таких нейронов характеризовались гиперхромией, ядрышко не визуализировалось. Встречались нейроны с резкой деформацией перикарионов, тела таких нейронов сморщивались, приобретали извитую, вытянутую форму, цитоплазма и ядра характеризовались резкой гиперхромией. Ядра сморщенных нейронов по форме напоминали их тела, ядрышко не визуализировалось. Отростки гиперхромных сморщенных нейронов, расположенные в радиальном слое также подвергались изменениям, что выражалось в их деформации и появлении неровных извитых контуров. У отдельных животных в пирамидном слое СА1 гиперхромные сморщенные нейроны встречались на отдельных участках СА1 и занимали более 50 % из всех нейронов в поле зрения (Рисунок 1). Так же, как и у 12-ти месячных животных встречались единичные нейроны с очаговым и тотальным хроматолизом, участки выпадения нейронов.

Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 3,9 (1,7-10,9) % у 12-ти месячных животных и 7,1 (3,7-15) % - у 24-х месячных животных ($p=0,016$) (Рисунок 2).

У 24-х месячных животных нейроны пирамидного слоя в СА1 располагались в 2-3 слоя, отмечалось значимое уменьшение ширины пирамидного слоя на 9 % ($p < 0,001$) по сравнению с 12-ти месячными крысами. Данный показатель у животных 1 группы составил – 36,7 (31,2-42,8) мкм, у животных второй группы – 33,4 (29,1- 39,1) мкм (Рисунок 2). Достоверного уменьшения ширины других слоев гиппокампа с возрастом не обнаружено.

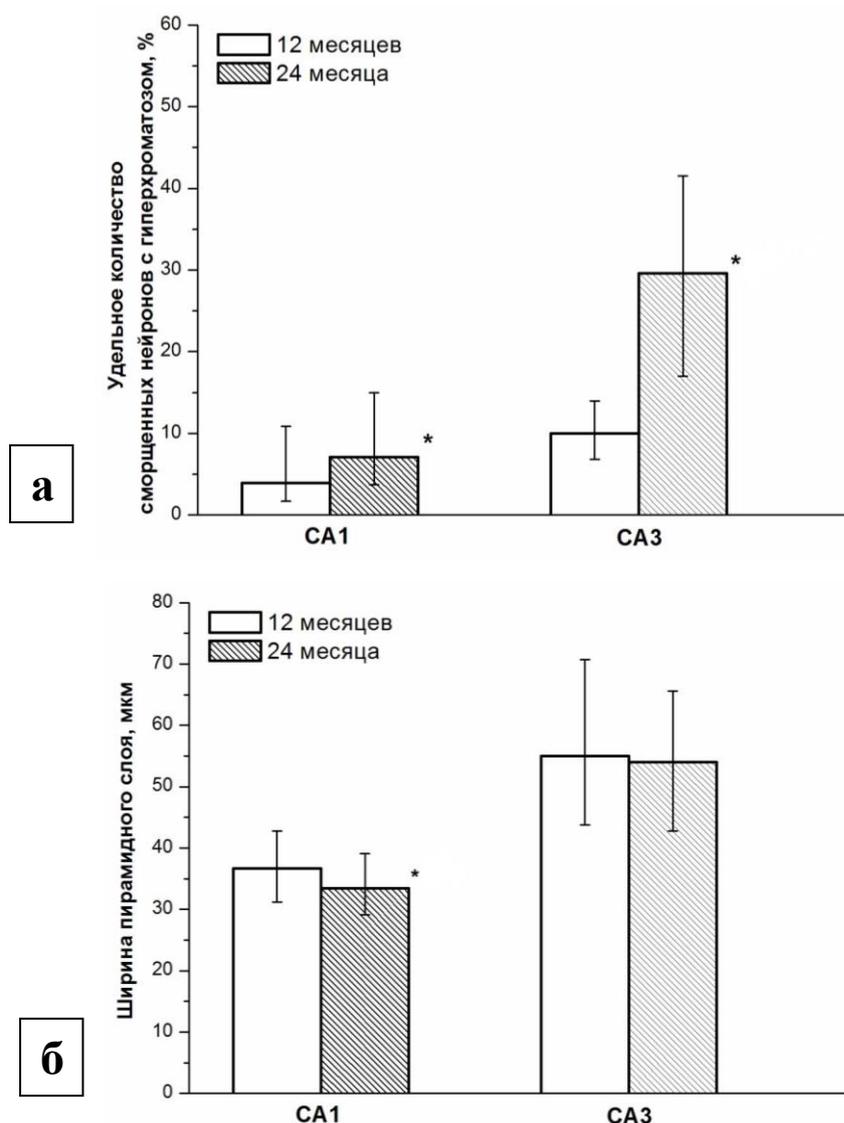


Рисунок 2. Динамика изменения удельного количества сморщенных нейронов пирамидного слоя с гиперхроматозом цитоплазмы в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12- ти и 24-х месячных крыс (а). Динамика изменения ширины пирамидного слоя в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа продемонстрировала статистически значимое увеличение средней площади ядер ($p=0,001$) и средней площади перикарионов ($p=0,001$) у 24-х месячных крыс по сравнению с 12-ти месячными животными (Таблица 3). Достоверных различий средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p=0,039$), ядерно-цитоплазматического отношения ($p=0,314$), отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю ($p=0,828$), а также относительных морфометрических параметров в СА1 между группами обнаружено не было (Таблица 3).

При микроскопическом исследовании СА3 дорсального отдела гиппокампа у 12-ти месячных крыс нейроны пирамидного слоя располагались более рыхло, большинство нейронов имели полигональную форму с четко визуализируемым везикулярным ядром и одним ядрышком. Выявлялись нейроны с гиперхромией цитоплазмы и ядер, деформацией и сморщиванием перикарионов, которые характеризовались схожими изменениями с нейронами, обнаруженными в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных крыс. Встречались единичные нейроны с очаговым и тотальным хроматолизом (Рисунок 3).

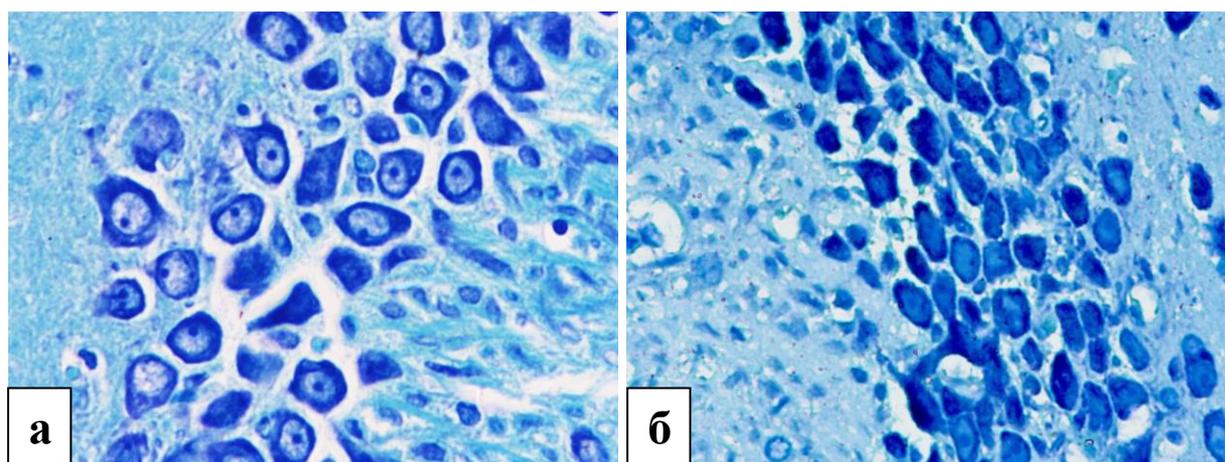


Рисунок 3. Гистологическое строение пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Большинство перикарионов нейронов пирамидного слоя полигональной формы (а). Наличие в пирамидном слое значительного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы (б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

При этом у 24-х месячных крыс в пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа изменения, обнаруженные в СА3 у 12-ти месячных животных, носили более выраженный характер. Многие нейроны характеризовались извитой формой перикарионов, с выраженной базофилией цитоплазмы. Отмечались участки пирамидного слоя с «выпадением» нейронов (Рисунок 3).

Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 10 (6,8-14) % у 12-ти месячных крыс и 29,6 (17-41,5) % - у 24-х месячных животных ($p < 0,001$) (Рисунок 2).

У 12-ти и 24-х месячных животных нейроны пирамидного слоя в СА3 располагались в 2-8 слоев, максимальное количество слоев отмечалось на границе с СА2. Достоверных различий ширины пирамидного слоя в СА3 между 12-ти и 24-х месячными крысами обнаружено не было ($p = 0,328$). Данный показатель у животных 1 группы составил – 55 (43,8-70,7) мкм, у животных второй группы – 54 (42,7- 65,6) мкм (Рисунок 2).

Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа продемонстрировала увеличение средней площади перикарионов и цитоплазмы перикарионов нейронов у 24-х месячных крыс ($p < 0,001$) по сравнению с 12-ти месячными животными (Таблица 3). Достоверные различия обнаруживались в снижении относительной площади ядер нейронов в пирамидном слое СА3 у 24-х месячных животных на 1,6 % ($p = 0,013$) по сравнению с 12-ти месячными (Таблица 3). Также у 24-х месячных крыс отмечалось достоверное снижение ядерно-цитоплазматического отношения (Таблица 3) по сравнению с крысами более молодого возраста ($p < 0,001$). Достоверных различий отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю в СА3 между группами обнаружено не было ($p = 0,938$) (Таблица 3).

Таблица 3 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя дорсального отдела гиппокампа крыс, Me (Q₁-Q₂)

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Крысы в возрасте 24-х месяцев
CA1	Площадь ядер нейронов, мкм ²	57,7 (49,9-66,1)	61,4* (50,3-73,6)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	117,9 (101,7-136,2)	126,9* (106,4-151,9)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	59,5 (49,1-74,4)	63,1 (50,6-81)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	20 (17,9-23,1)	20,7 (16,1-24,1)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	42,5 (37,2-45,6)	43,6 (36,9-47,4)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	22,2 (19-22,9)	22,1 (19,9-24,2)
	Относительная площадь нейропиля, %	57,5 (54,4-62,8)	56,4 (52,6-63,1)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	1 (0,8-1,1)	0,9 (0,7-1,1)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,6-0,8)	0,8 (0,6-0,9)
CA3	Площадь ядер нейронов, мкм ²	64,5 (47,8-80,2)	65,1 (44,6-83,5)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	140,7 (107,1-172,8)	154,2* (111,2-193,6)

Продолжение таблицы 3

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Крысы в возрасте 24-х месяцев
CA3	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	73,6 (53,6-96,5)	86,2* (63,4-109,8)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	18,5 (16,9- 20,6)	16,9* (14,8-19,8)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	41,3 (36,1-46,9)	41,9 (35,2-46,7)
	Относительная Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	23,1 (18,9-25,8)	23,1 (19,5-27,2)
	Относительная площадь нейропиля, %	58,7 (53,1-63,9)	58,1 (53,3-64,8)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,8 (0,6-1,1)	0,7* (0,6-0,9)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,6-0,9)	0,7 (0,5-0,9)
* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).			

Таким образом, у 24-х месячных крыс по сравнению с 12-ти месячными животными в пирамидном слое дорсального отдела гиппокампа обнаружены дистрофические изменения нейронов, сопровождающиеся увеличением средней площади ядер в CA1, средней площади перикарионов, средней площади цитоплазмы перикарионов в CA3, а также признаки возрастной атрофии, выражающиеся уменьшением ширины пирамидного слоя CA1 в сочетании с

увеличением на 3,2 % удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы. При этом атрофические изменения нейронов пирамидного слоя в СА3 носили более выраженный характер, который проявлялся в увеличении на 19,6 % удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы.

3.1.2. Сравнительная иммунофенотипическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев

Иммуногистохимическое исследование экспрессии caspase-3

При оценке результатов иммуногистохимического исследования дорсального отдела гиппокампа 12-ти-месячных крыс с использованием антител к caspase-3 в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 преобладала иммунонегативная реакция. У отдельных животных в цитоплазме единичных нейронов пирамидного слоя СА1 обнаруживалась слабовыраженная экспрессия caspase-3-иммунореактивного материала (ИРМ). Удельное количество иммунопозитивных нейронов составило 0 (0-28,6) %. В отдельных глиоцитах пирамидного, молекулярного и радиального слоев экспрессия носила выраженный характер (3 балла) (Рисунок 4).

В цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 у животных 24-х месяцев преобладала иммунонегативная реакция. На протяжении СА1 обнаруживались сморщенные нейроны, которые характеризовались умеренной и выраженной цитоплазматической экспрессией caspase-3-ИРМ. У некоторых животных мелкогранулярная умеренно выраженная экспрессия caspase-3-ИРМ обнаруживалась в цитоплазме нейронов с округлой и близкой к округлой форме перикарионов (Рисунок 4).

Отмечалось достоверное увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 35,5 % ($p=0,016$), по сравнению с животными 12-ти месяцев. У старых животных данный показатель составил 35,5 (7,1-40,9) %. Необходимо отметить, что в пирамидном слое СА1 встречались единичные сморщенные нейроны, цитоплазма которых, характеризовалась

иммунонегативной реакцией. В отдельных глиоцитах пирамидного, молекулярного и радиального слоев экспрессия носила выраженный характер (3 балла).

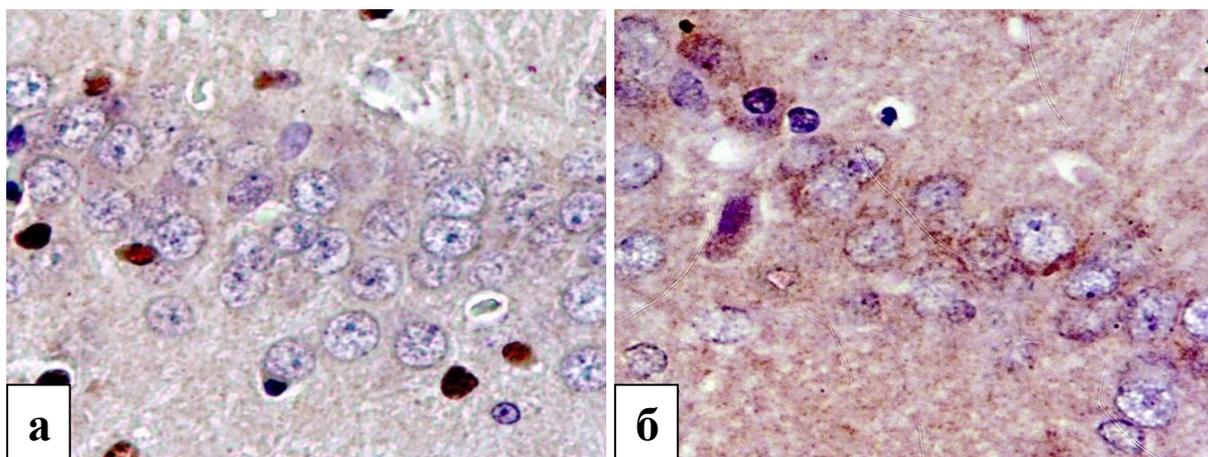


Рисунок 4. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Иммунонегативная реакция в цитоплазме перикарионов нейронов и выраженная экспрессия ИРМ в глиоцитах пирамидного слоя (а), умеренно выраженная гранулярная экспрессия ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против caspase-3, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти-месячных крыс в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя СА3 наблюдалось отсутствие экспрессии caspase-3-ИРМ. Единичные нейроны пирамидного слоя характеризовались слабовыраженной пылевидной экспрессией в цитоплазме перикарионов. Удельное количество иммунопозитивных нейронов составило 0 %. В отдельных глиоцитах молекулярного, радиального и пирамидного слоев отмечается умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла).

В цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА3 у животных 24-х месяцев преобладала умеренно выраженная экспрессия caspase-3-ИРМ (2 балла). Также встречались нейроны с выраженной и слабовыраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ. Данные нейроны характеризовались как сморщиванием перикарионов, так и имели неизменную форму. Удельное количество иммунопозитивных нейронов составило 22,2 (14,8-30) % ($p < 0,001$). Необходимо отметить, что в пирамидном слое СА3 встречались единичные сморщенные

нейроны, цитоплазма которых, характеризовалась иммунонегативной реакцией. В отдельных глиоцитах молекулярного, радиального и пирамидного слоев отмечалась выраженная экспрессия ИРМ (3 балла).

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, в отличие от животных 12-ти месяцев, нами выявлено увеличение удельно количества caspase-3 иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа в сочетании с увеличением степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов СА3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти-месячных крыс с использованием антител против индуцибельной NO-синтазы (iNOS) отмечалась пылевидная, слабовыраженная экспрессия (1 балл) ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, а также в нейропиле радиального слоя (1 балл) СА1. В дендритах, расположенных в радиальном слое, выраженность экспрессии была слабее, чем в окружающем нейропиле. В краевом слое обнаруживались единичные нейроны со слабовыраженной экспрессией ИРМ в цитоплазме их перикарионов (1 балл). Отмечалась умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ (2 балла) в отдельных нейронах пирамидного, радиального и молекулярного слоёв.

В пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа у 24-х месячных крыс большинство нейронов характеризовалось слабовыраженной цитоплазматической экспрессией iNOS-ИРМ (1 балл), отмечалось увеличение количества нейронов с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (2 балла). В дендритах радиального слоя наблюдалась слабовыраженная пылевидная экспрессия ИРМ (1 балл). В краевом и молекулярном слоях гиппокампа встречались нейроны с умеренно и максимально выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (3 балла).

Достоверных различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов ($p=0,890$) (Рисунок 6) и относительной площади

ИРМ ($p=0,388$) в пирамидном слое СА1 у 12-ти и 24-х месячных крыс обнаружено не было.

В СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс экспрессия iNOS-ИРМ была обнаружена в нейропиле и в единичных нейронах радиального слоя гиппокампа, которая носила умеренный характер (2 балла), в цитоплазме перикарионов остальной части нейронов наблюдалась слабовыраженная экспрессия ИРМ (1 балл). В нейронах пирамидного слоя отмечалась слабая цитоплазматическая экспрессия ИРМ (1 балл), встречались единичные нейроны с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (Рисунок 5). В молекулярном слое обнаруживались нейроны со слабой цитоплазматической экспрессией ИРМ (1 балл). Перикарионы нейронов краевого слоя имели умеренно выраженную экспрессию ИРМ (2 балла), в нейропиле отмечалась слабовыраженная экспрессия (1 балл). В эндотелии капилляров наблюдалась умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла) (Рисунок 5).

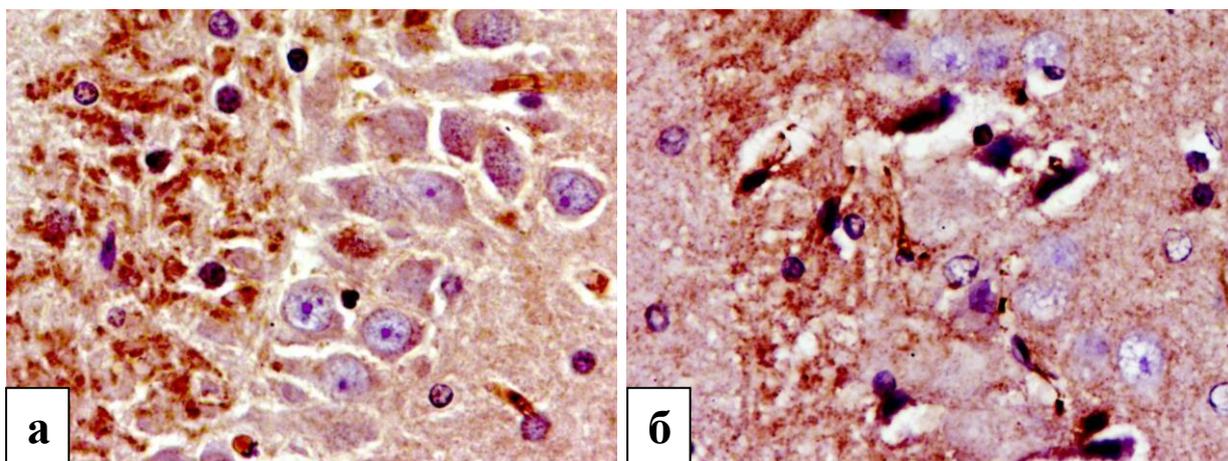


Рисунок 5. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле радиального слоя (а, б) и в перикарионах нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

У 24-х месячных крыс в нейропиле СА3 радиального слоя отмечалась умеренно выраженная экспрессия iNOS-реактивного материала (2 балла). В пирамидном слое в большинстве нейронов наблюдалась пылевидная экспрессия

ИРМ (1 балл), встречались единичные нейроны с умеренной и выраженной экспрессией ИРМ в перикарионах (Рисунок 5).

Отмечалась разная выраженность экспрессии ИРМ в СА3 и СА2 зонах в нейропиле радиального слоя, причем экспрессия обнаруживалась в отделах, граничащих с пирамидным слоем, уменьшаясь в СА2 и, практически, исчезая в СА1 зоне, распределение ИРМ в отростках нейронов в радиальном слое приобретало вид полумесяца. У 24-х месячных крыс данный феномен проявлялся менее выраженно.

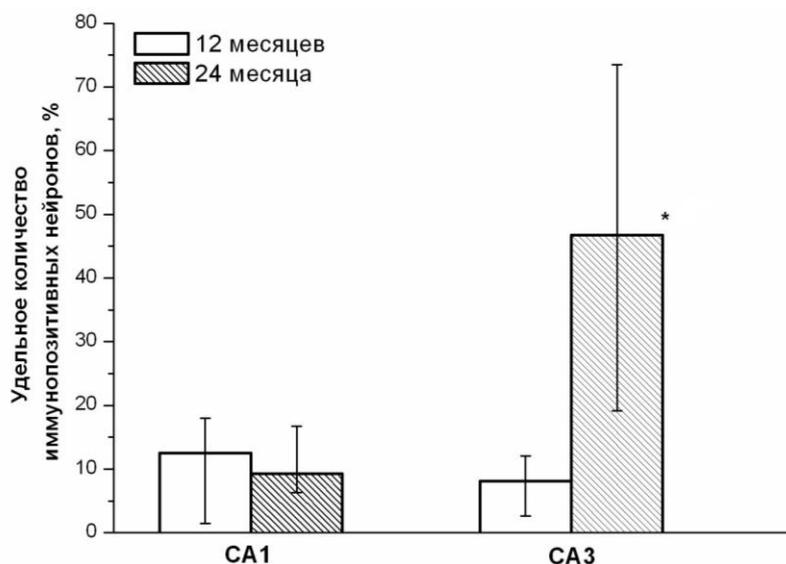


Рисунок 6. Динамика изменения удельного количества iNOS- иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Отмечалось достоверное увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА3 на 38,6 %, по сравнению с группой 12-ти месячных животных, достигающее 46,7 (19,2-66,7) % ($p < 0,001$) (Рисунок 6). Достоверных различий изменений при сопоставлении относительной площади ИРМ в СА3 у 12-ти и 24-х-месячных крыс обнаружено не было ($p = 0,318$).

В молекулярном и краевом слоях СА3 у 24-х-месячных крыс наблюдалась умеренная степень экспрессии ИРМ в перикарионах нейронов (2 балла), единичные нейроны краевого слоя характеризовались выраженной степенью

экспрессии ИРМ в цитоплазме (3 балла). В эндотелиоцитах капилляров наблюдалась умеренная степень экспрессии ИРМ (2 балла) (Рисунок 5).

Таким образом, у 12-ти и 24-х месячных животных в радиальном слое СА1-СА3 дорсального отдела гиппокампа распределение iNOS-ИРМ приобретало вид полумесяца. У старых крыс данный феномен проявлялся менее выражено, что отражает иммунофенотипические особенности гиппокампа при старении. У 24-х месячных животных выявлено увеличение удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) перикарионы большинства нейронов пирамидного слоя СА1 характеризовались умеренной степенью экспрессии гранулярного ИРМ (2 балла), однако встречались и нейроны со слабовыраженной степенью экспрессии. В дендритах нейронов радиального слоя экспрессия ИРМ носила чередующийся характер, от слабо – (1 балл) до умеренно выраженной (2 балла) (Рисунок 7).

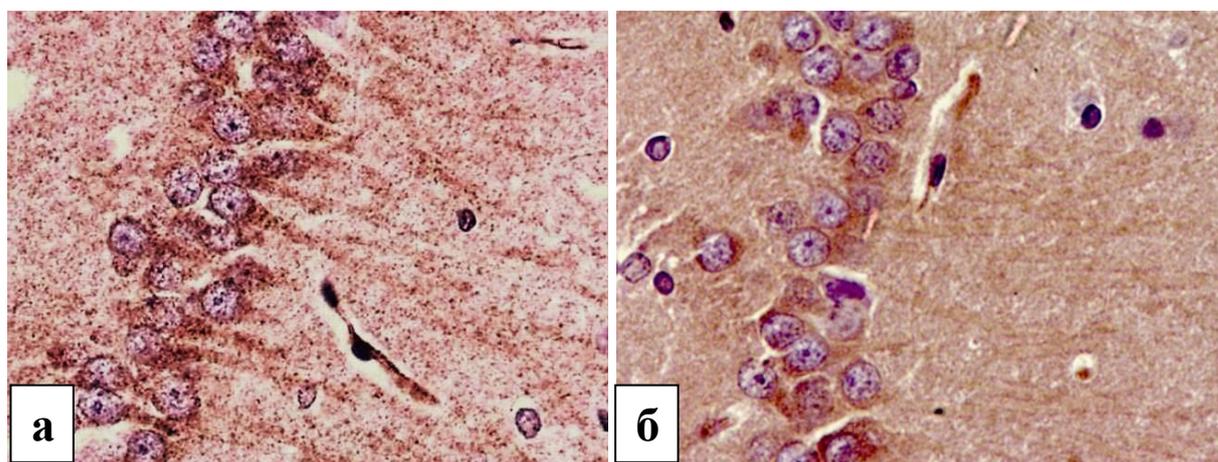


Рисунок 7. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренная цитоплазматическая степень экспрессии ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя, дендритах радиального слоя и эндотелии капилляров (а). Уменьшение содержания ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя, нейропиле радиального слоя и эндотелии капилляров (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В нейропиле радиального слоя экспрессия носила слабовыраженный характер (1 балл) или отсутствовала. В эндотелии капилляров наблюдалась слабая eNOS-позитивная реакция (1 балл) (Рисунок 7).

Отмечалось достоверное уменьшение удельного количество иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое CA1 на 56,1 % ($p < 0,001$) и относительной площади ИРМ на 24,8 % ($p < 0,001$) у 24-х месячных крыс, по сравнению с 12-ти месячными животными (Рисунок 8).

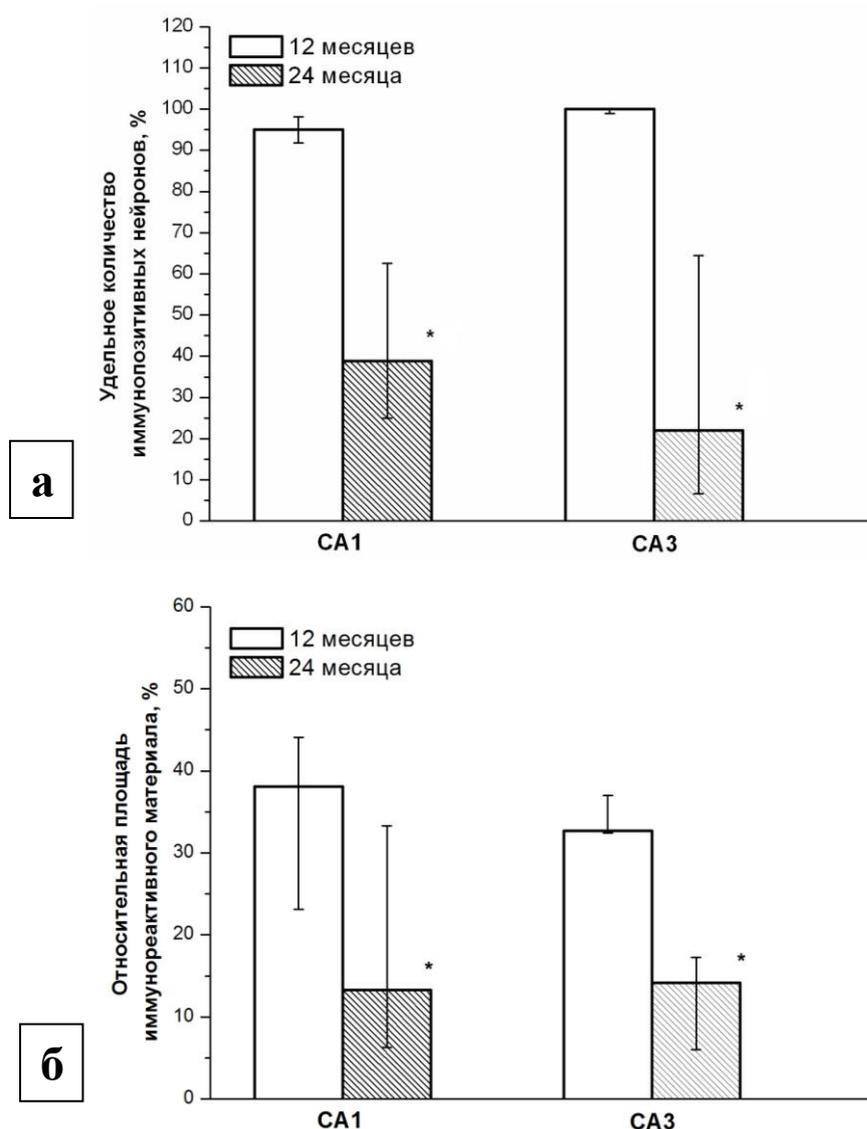


Рисунок 8. Динамика изменения удельного количества eNOS- иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс (а). Динамика изменения относительной площади eNOS-иммунореактивного материала в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Данные показатели в группе 24-х месячных крыс составили 38,9 (25-62,5) % и 13,3 (6,3-33,3) %, соответственно (Рисунок 8).

Нейроны пирамидного слоя СА3 12-ти месячных животных характеризовались слабой цитоплазматической экспрессией eNOS-ИРМ (1 балл), а также умеренной экспрессией ИРМ (2 балла) в единичных нейронах пирамидного слоя. В нейропиле радиального слоя отмечалась умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла). В молекулярном слое встречались единичные нейроны со слабовыраженной экспрессией ИРМ (1 балл) в перикарионах. В эндотелии капилляров наблюдалась умеренно выраженная степень экспрессии ИРМ (2 балла) (Рисунок 9).

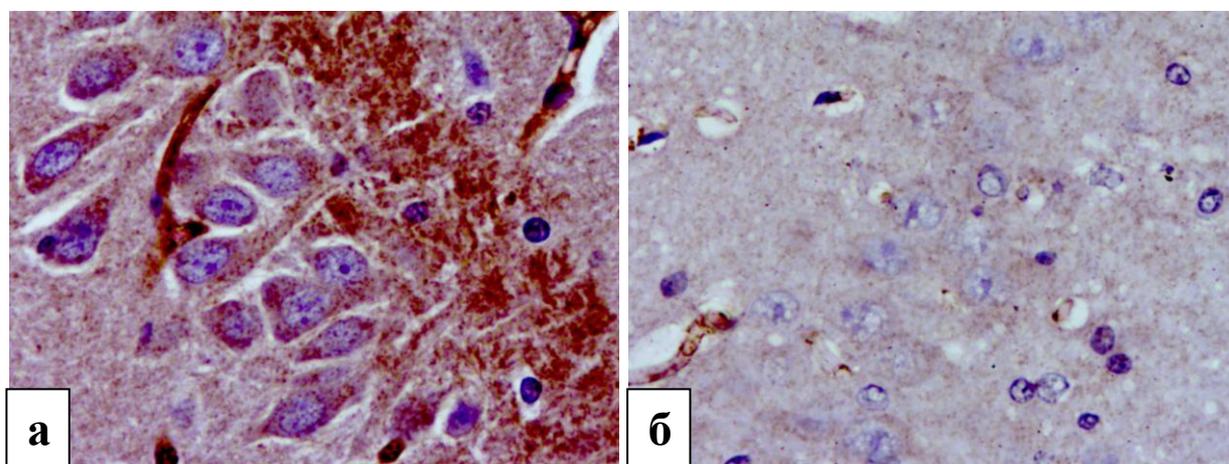


Рисунок 9. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Слабая и умеренная степень экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, умеренная степень экспрессии ИРМ в нейропиле радиального слоя и в эндотелии капилляров (а). Отсутствие ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в нейропиле радиального слоя, снижение степени экспрессии ИРМ в эндотелии капилляров (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

У 24-х месячных крыс в СА3 наблюдалось снижение экспрессии eNOS-ИРМ в цитоплазме нейронов пирамидного слоя, а также в нейропиле радиального слоя (слабовыраженная экспрессия (1 балл) или её отсутствие) по сравнению с 12-ти месячными животными (Рисунок 9).

У старых животных отмечалось достоверное снижение удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 на 78 %

($p < 0,001$) и относительной площади ИРМ на 18,5 % ($p < 0,001$) по сравнению с 12-ти месячными животными. Данные показатели в группе 24-х месячных крыс составили 22 % (6,7-64,5) и 14,2 % (6,0-17,3), соответственно. Нейроны и глиоциты молекулярного слоя гиппокампа характеризовались иммунонегативной реакцией (0 баллов), в нейропиле выявлена слабовыраженная экспрессия ИРМ (1 балл). В эндотелии капилляров наблюдалась слабовыраженная экспрессия eNOS-реактивного материала (1 балл) или её отсутствие (Рисунок 8).

Таким образом, обнаружено снижение степени экспрессии eNOS в нейропиле радиального слоя и эндотелии капилляров различных слоёв СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, а также снижение удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя и относительной площади ИРМ у 24-х месячных животных, по сравнению с 12-ти месячными животными.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии nNOS

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к нейрональной NO-синтазе (nNOS) различий в характере и степени экспрессии (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии beclin-1

У крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев при иммуногистохимическом исследовании с использованием антител против becline-1 в СА1 дорсального отдела гиппокампа наблюдалась слабовыраженная цитоплазматическая экспрессия beclin-1-ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов пирамидного слоя. У крыс в возрасте 12-ти месяцев в СА3 дорсального отдела гиппокампа обнаруживалась слабовыраженная пылевидная степень экспрессии beclin-1-ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов пирамидного слоя (Рисунок 10).

У 24-х месячных крыс, по сравнению с животными в возрасте 12-ти месяцев в цитоплазме пирамидных нейронов СА3 наблюдалось увеличение степени экспрессии до умеренно выраженной (2 балла) (Рисунок 10).

При морфометрической оценке относительной площади ИРМ достоверных различий в СА1 и СА3 между животными исследуемых групп обнаружено не было. У крыс 1 группы в СА1 относительная площадь *bcclin-1*-ИРМ составила 5 (3,3-7,2) %, у крыс 2 группы – 4 (3,2-6,9) %. В СА3 относительная площадь ИРМ у 12-ти месячных животных составила 6,8 (6,6-7,1) %, у крыс в возрасте 24-х месяцев - 5,1 (3,5-9,6) %.

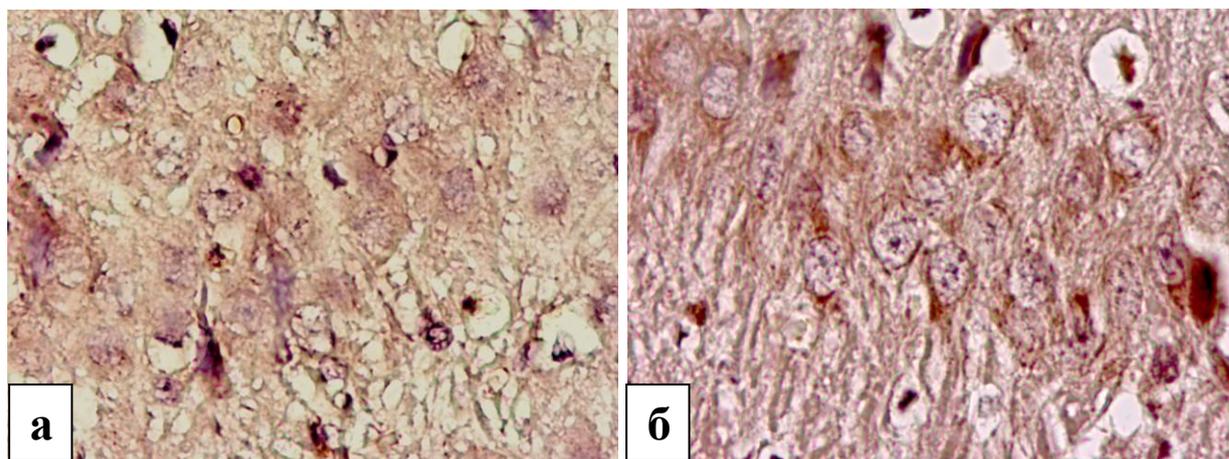


Рисунок 10. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Слабовыраженная пылевидная степень экспрессии *bcclin-1*-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а). Увеличение степени цитоплазматической экспрессии ИРМ в нейронах пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против *bcclin-1*, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, у 24-х месячных животных, по сравнению с крысами в возрасте 12-ти месяцев, выявлено увеличение степени экспрессии *bcclin-1*-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев с использованием антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) наблюдалась выраженная цитоплазматическая экспрессия в астроцитах пирамидного, радиального и молекулярного слоев СА1 и СА3 (3 балла). GFAP-иммунопозитивные астроциты имели звездчатую форму и разветвлённые отростки, в пирамидном слое

располагались между нейронами, окутывая перикарионы своими отростками (Рисунок 11). Необходимо отметить, что GFAP-ИРМ в отростках астроцитов характеризовался неравномерной степенью экспрессии от слабой до выраженной.

У животных в возрасте 24-х месяцев в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа степень экспрессии GFAP также имела выраженный характер (3 балла), однако, в отличие от 12-ти месячных крыс, отростки астроцитов характеризовались меньшим количеством ответвлений, а сами астроциты располагались преимущественно в радиальном и молекулярном слоях гиппокампа (Рисунок 11).

При морфометрическом исследовании СА1 и СА3 не было обнаружено достоверных различий в относительной площади ИРМ между 12-ти и 24-х месячными животными. У крыс 1 группы в СА1 относительная площадь GFAP-ИРМ составила 11,2 (10,7-12,6) %, у крыс 2 группы – 11,2 (10,2-12,6) %. В СА3 относительная площадь ИРМ у 12-ти месячных животных составила 11,5 (10,6-12,3) %, у крыс в возрасте 24-х месяцев - 14,1 (11,8- 18,3) %.

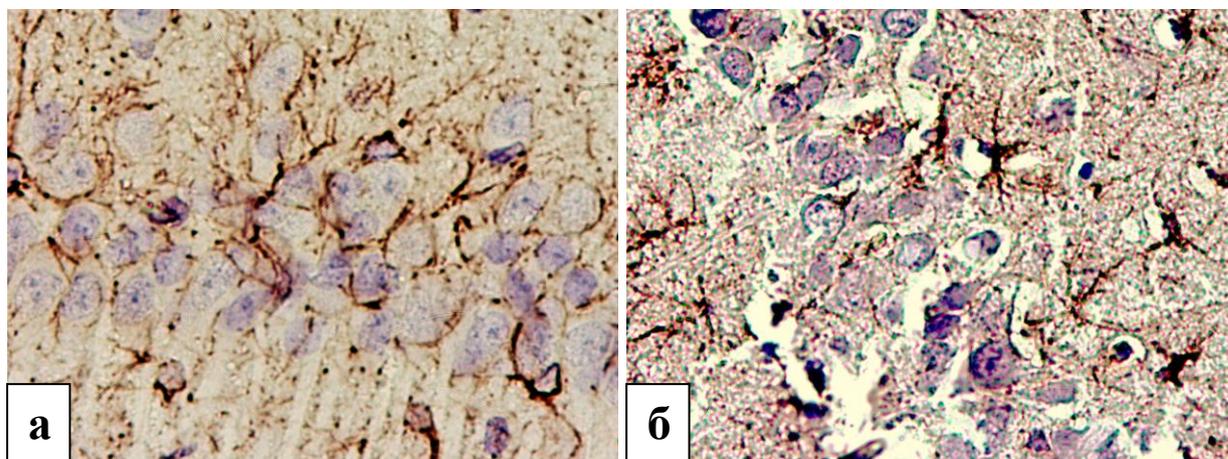


Рисунок 11. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в астроцитах (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, установлено, что у 12-ти месячных крыс в дорсальном отделе гиппокампа GFAP-иммунопозитивные астроциты в пирамидном слое СА1 и СА3 локализируются между нейронами. У 24-х месячных животных наблюдается

перераспределение GFAP-иммунопозитивных астроцитов с их концентрацией в радиальном и молекулярном слоях CA1 и CA3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии BDNF

У крыс в возрасте 12-ти месяцев в большинстве нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа определялась иммунонегативная реакция BDNF-ИРМ. В CA3 встречались нейроны со слабовыраженной цитоплазматической экспрессией BDNF-ИРМ, в цитоплазме единичных нейронов наблюдалась умеренно выраженная экспрессия BDNF-ИРМ (Рисунок 12). В астроцитах пирамидного, молекулярного и радиального слоёв преобладала иммунонегативная реакция или слабовыраженная цитоплазматическая экспрессия BDNF-ИРМ. Единичные глиоциты характеризовались умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией BDNF-ИРМ.

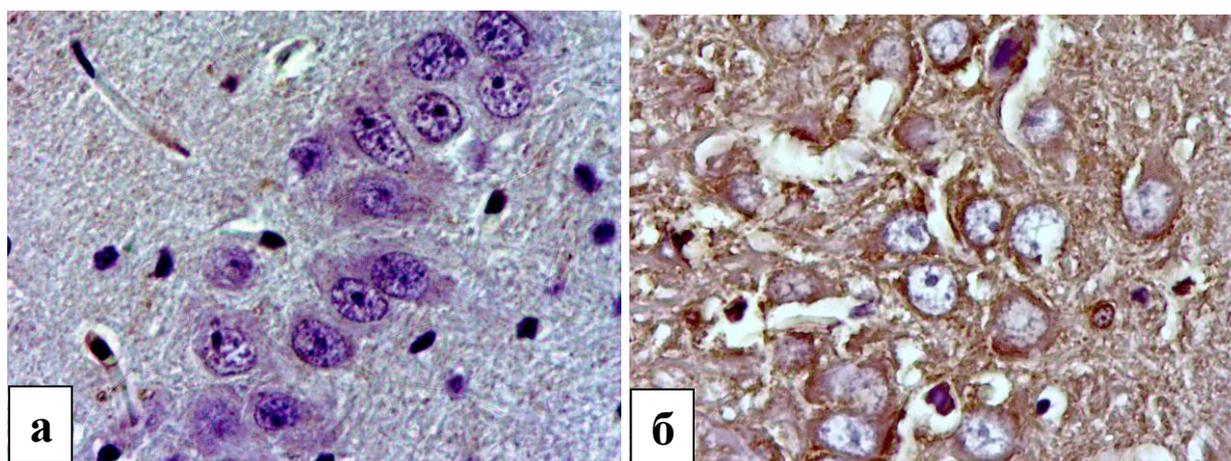


Рисунок 12. Гистологическое строение CA3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Иммунонегативная реакция BDNF-ИРМ в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя (а). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в нейропиле (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против BDNF, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При оценке результатов иммуногистохимического исследования у животных в возрасте 24-х месяцев в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа цитоплазматическая экспрессия BDNF-ИРМ в нейронах пирамидного слоя и нейропиле носила преимущественно слабо- и реже умеренно выраженный характер (1 балл) (Рисунок 12). Встречались единичные нейроны в цитоплазме

которых наблюдалась умеренно выраженная экспрессия BDNF-ИРМ. Сморщенные нейроны характеризовались иммунонегативной реакцией. В цитоплазме глиоцитов пирамидного, молекулярного и радиального слоёв преобладала выраженная экспрессия BDNF-ИРМ (3 балла).

Таким образом, у животных в возрасте 24-х месяцев в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, в отличие от животных более молодого возраста, наблюдается появление экспрессии BDNF-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и увеличение степени экспрессии в глиоцитах.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии HSP70

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к белкам теплового шока HSP70 наблюдалась иммунонегативная реакция в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп (Рисунок 13).

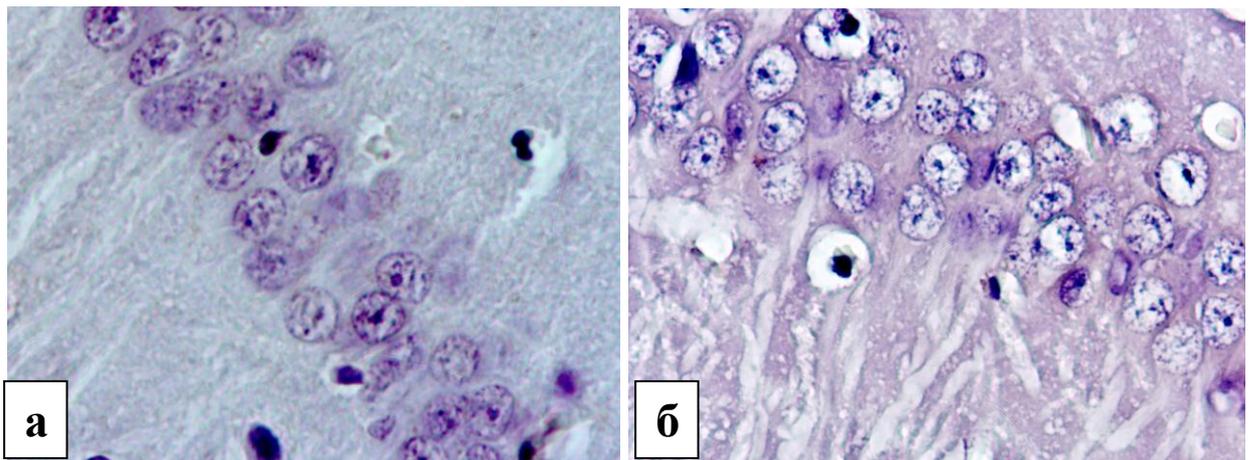


Рисунок 13. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Отсутствие экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против HSP70, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, у 12-ти и 24-х месячных животных в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа обнаружено отсутствие экспрессии HSP70.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против сериновой

рацемазы (СР) в СА1 отмечается умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ (2 балла) в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя (Рисунок 14).

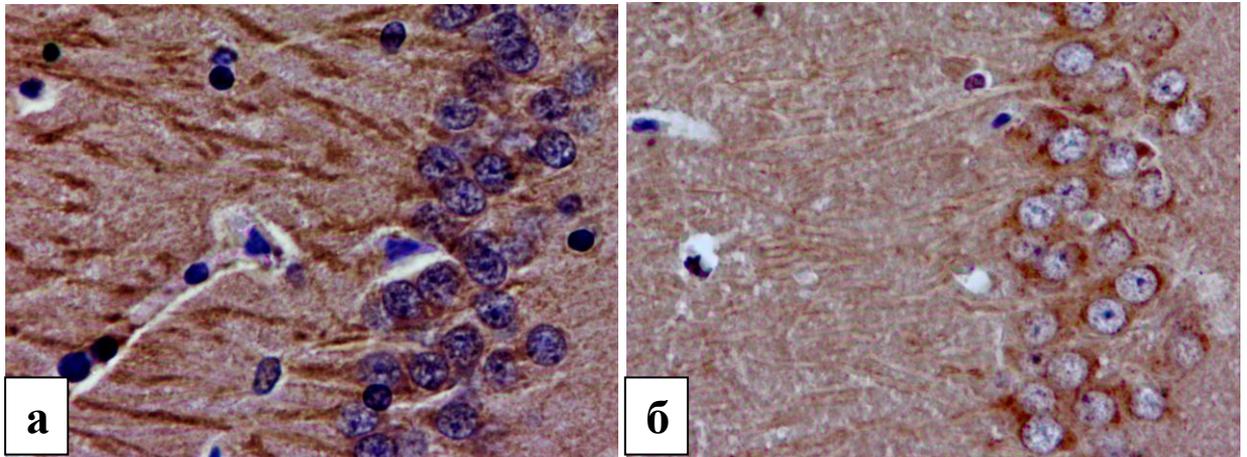


Рисунок 14. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя (а). Снижение степени экспрессии ИРМ в дендритах радиального слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

У старых животных (24 месяца) наблюдается слабовыраженная экспрессия ИРМ (1 балл) лишь в единичных дендритах радиального слоя при сохранении умеренно выраженной цитоплазматической экспрессии ИРМ (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя (Рисунок 14).

Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 у 12-ти и 24-х месячных крыс не обнаружено. Данный показатель у крыс в возрасте 12-ти месяцев составил 85,9 (80,4-93,8) %, у 24-х месячных животных 93,9 (76,5-100) %. Отмечается изменение преимущественной локализации ИРМ в СА1 у крыс старческого возраста: снижение уровня экспрессии ИРМ в дендритах радиального слоя и увеличение - в перикарионах нейронов пирамидного слоя. При этом суммарно в дендритах и перикарионах нейронов при компьютерном морфометрическом анализе достоверного снижения относительной площади ИРМ

не наблюдается. У крыс 1 группы в СА1 относительная площадь ИРМ составила 15,4 (11,9-22,8) %, у крыс 2 группы – 11,7 (9-18,5) %.

При оценке результатов иммуногистохимического исследования у 12-ти месячных крыс в СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечается умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя, окружающий нейропил характеризуется слабовыраженным окрашиванием (1 балл).

При этом у 24-х месячных крыс ИРМ локализован преимущественно в перикарионах нейронов пирамидного слоя (2 балла), однако, наряду с иммунопозитивными нейронами (2 балла), встречаются нейроны с иммунонегативной реакцией, которые характеризуются сморщиванием перикарионов, базофилией цитоплазмы и наличием гиперхромных ядер овальной формы. Экспрессия ИРМ в радиальном слое СА3 носила умеренно выраженный характер (2 балла) в дендритах и слабовыраженный характер (1 балл) в окружающем нейропиле радиального слоя.

Статистически значимых различий исследуемых параметров обнаружено не было. В СА3 относительная площадь ИРМ у 12-ти месячных животных составила 10,1 (9,0-14,0) %, удельное количество иммунопозитивных нейронов 96,8 (92,3-100) %, у крыс в возрасте 24-х месяцев - 11,7 (9,5-21,7) % и 100 (88,9-100) %, соответственно.

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, по сравнению с 12-ти месячными животными в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечается перераспределением СР-ИРМ, с его преимущественной локализацией в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, сопровождающееся возрастзависимым снижением степени экспрессии СР в дендритах радиального слоя СА1.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии синаптофизина

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против синаптофизина (СФ) в нейропиле пирамидного слоя СА1 отмечается умеренно

выраженная экспрессия ИРМ (2 балла). В цитоплазме большинства перикарионов нейронов наблюдается иммунонегативная реакция. Нейропиль молекулярного и радиального слоев характеризуется слабовыраженным окрашиванием (1 балл) (Рисунок 15).

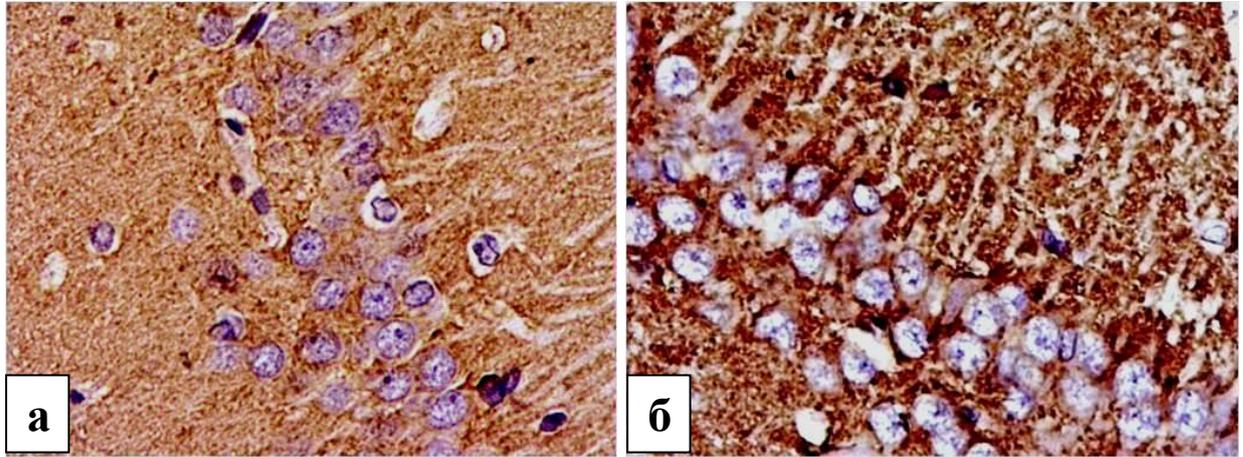


Рисунок 15. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиль пирамидного, радиального краевого слоев (а). Увеличение степени экспрессии ИРМ в нейропиль пирамидного, радиального и краевого слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В нейропиль пирамидного слоя СА1 24-х месячных крыс отмечалось увеличение степени экспрессии СФ-ИРМ (3 балла), по сравнению с группой 12-ти месячных крыс, экспрессия носила выраженный крупногранулярный характер. Также наблюдалось увеличение плотности расположения ИРМ, как в пирамидном, так и в радиальном и молекулярном слоях СА1 дорсального отдела гиппокампа. Увеличивалось количество нейронов с цитоплазматической экспрессией СФ-ИРМ. Выраженная крупногранулярная экспрессия (3 балла) наблюдалась как в перикарионах сморщенных нейронов, так и в нейронах округлой и близкой к округлой форме. Нейропиль молекулярного и радиального слоев характеризовался умеренно выраженным окрашиванием (2 балла) (Рисунок 15).

Достоверных различий в относительной площади ИРМ у 12-ти и 24-х месячных животных в СА1 дорсального отдела гиппокампа обнаружено не было.

У крыс 1 группы относительная площадь ИРМ составила 38,5 (26,8-43,4) %, у крыс 2 группы – 35,1 (26,2-37,7) %.

При оценке результатов иммуногистохимического исследования у 12-ти месячных крыс в нейропиле пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа наблюдается умеренно выраженная экспрессия (2 балла) СФ-ИРМ. В радиальном и молекулярном слоях степень экспрессии была менее выраженной (2 балла). В цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя экспрессия СФ-ИРМ отсутствовала.

У 24-х месячных крыс в нейропиле СА3 пирамидного слоя, в отличие от 12-ти месячных животных, отмечалась выраженная экспрессия СФ-ИРМ (3 балла). В цитоплазме сморщенных извитых нейронов пирамидного слоя экспрессия приобретала выраженный крупногранулярный характер (3 балла), встречалась умеренно выраженная экспрессия в пирамидных нейронах неизменённой формы. Нейропиль молекулярного и радиального слоев характеризовался умеренно выраженным окрашиванием (2 балла). Достоверных различий в относительной площади ИРМ у 12-ти и 24-х месячных животных в СА3 дорсального отдела гиппокампа обнаружено не было. У крыс 1 группы относительная площадь ИРМ составила 35 (28,2-43,2) %, у крыс 2 группы – 31,3 (26,4-34,4) %.

Необходимо отметить, что в нейропиле пирамидного слоя на протяжении СА4-СА1 зон дорсального отдела гиппокампа ширина экспрессии СФ-ИРМ имела разнонаправленный характер. На границе СА3 с СА2, где ширина пирамидного слоя максимальная, увеличивалась и ширина экспрессии СФ-ИРМ, уменьшаясь в СА2 и СА1 и приобретая вид полумесяца. У 24-х месячных крыс данный феномен проявлялся более выраженно.

Таким образом, у 12-ти и 24-х месячных животных в нейропиле пирамидного слоя СА1-СА4 дорсального отдела гиппокампа обнаружено распределение СФ-ИРМ в виде полумесяца, наиболее выраженное у старых животных, что отражает иммунофенотипические особенности гиппокампа. У 24-х-месячных животных выявлено увеличение степени экспрессии СФ-ИРМ в

нейропиле пирамидного, радиального и молекулярного слоёв СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа.

3.1.3. Особенности гистологического строения вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев

При нейрогистологическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных животных не было обнаружено существенных различий в строении цитоархитектонических областей СА1 и СА3 по сравнению с дорсальным отделом гиппокампа. Однако, стоит отметить, что у некоторых животных, исследуемых возрастных групп в пирамидном слое СА1 и СА3 гиперхромные сморщенные нейроны занимали практически 100 % из всех нейронов в отдельных полях зрения.

Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в СА1 составило 4,9 (3,1-15,1) % у 12-ти месячных животных и 18,3 (6,8-77,9) % - у 24-х месячных животных ($p < 0,001$).

В СА3 не было обнаружено различий в изменении данного параметра. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 14,2 (4,8-34,9) % у 12-ти месячных крыс и 12,4 (4,8-50,8) % - у 24-х месячных животных ($p = 0,723$).

Также не наблюдалось достоверных различий в ширине пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа между исследуемыми группами животных. В пирамидном слое СА1 и СА3 нейроны располагались в 3-6 слоев. Ширина пирамидного слоя у 12-ти месячных животных составила 48,9 (44,6-61,2) мкм в СА1 и 58,6 (50,4-73,8) мкм в СА3, у 24-х месячных крыс в СА1 – 52,8 (44,3-61,7) мкм, в СА3 – 61,8 (51,7-69) мкм.

При оценке морфометрических показателей пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа достоверные различия между группами были обнаружены только в СА1. В СА1 наблюдалось увеличение средней площади ядер ($p < 0,001$), средней площади перикарионов ($p < 0,001$), средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p < 0,001$) у 24-х месячных крыс по

сравнению с 12-ти месячными животными (Таблица 4). Изменения ядерно-цитоплазматического отношения и отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю между группами обнаружено не было (Таблица 4).

Таблица 4 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя вентрального отдела гиппокампа крыс, Ме (Q₁-Q₂)

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Крысы в возрасте 24-х месяцев
CA1	Площадь ядер нейронов, мкм ²	48,9 (37,7-62)	60,8* (46,7-76,2)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	105,5 (84,9-132,1)	132,2* (108,9-161,6)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	55,8 (44-71,3)	70,9* (56,6-89,5)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	18,4 (15,5-21,1)	19,4 (16,3-21,8)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	39,6 (35,1-44,9)	43,3 (31,1-47,9)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	21,3 (19,1-24,2)	24,2 (20,6-26,1)
	Относительная площадь нейропиля, %	60,4 (55,1-64,9)	56,7 (52,1-62,9)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,9 (0,7-1)	0,8 (0,6-1)

Продолжение таблицы 4

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Крысы в возрасте 24-х месяцев
CA1	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,5-0,8)	0,8 (0,6-0,9)
CA3	Площадь ядер нейронов, мкм ²	67,1 (50,1-82,5)	66,2 (39,9-86,8)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	158,8 (130,4-190)	154,3 (110-196,1)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	88,7 (74,2-111,9)	85,7 (65,8-117,5)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	15,5 (13,9- 18,1)	15,3 (12,5-17,1)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	38,2 (33,3-43,6)	35,4 (30,1-41,3)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	22,1 (19,9-25,2)	21,1 (17,3-25,2)
	Относительная площадь нейропиля, %	61,8 (56,4-66,7)	64,4 (58,7-69,9)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,7 (0,6-0,9)	0,7 (0,5-0,9)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,6 (0,5-0,8)	0,6 (0,4-0,7)
* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).			

Таким образом, у 24-х месячных крыс по сравнению с 12-ти месячными животными в СА1 пирамидного слоя вентрального отдела гиппокампа обнаруживается увеличение количества повреждённых нейронов, выражающиеся увеличением удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы на 13,4 %, что может свидетельствовать о снижении компенсаторно-приспособительных реакций у крыс в процессе старения. При этом возрастзависимые изменения нейронов пирамидного слоя цитоархитектонической области СА1 вентрального отдела гиппокампа проявлялись более выражено, по сравнению с СА1 дорсального отдела.

3.1.4. Сравнительная иммунофенотипическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев

Иммуногистохимическое исследование экспрессии caspase-3

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс с использованием антител к caspase-3 в цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 отмечалась иммунонегативная реакция. В единичных полях зрения пирамидного слоя СА1 и СА3 встречались нейроны со слабовыраженной цитоплазматической экспрессией в перикарионах. При этом достоверно значимых различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 между 12-ти и 24-х месячными животными обнаружено не было. Глиоциты молекулярного, радиального и пирамидного слоев характеризовались выраженной степенью экспрессии caspase-3-ИРМ (3 балла).

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев различий в характере и степени экспрессии caspase-3 в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против iNOS

отмечался схожий с дорсальным отделом характер экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, а также в нейропиле радиального слоя СА1 (1 балл) (Рисунок 16). Удельное количество иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 составило 41,1 (32,1-60) %. В отличие от дорсального отдела гиппокампа, дендриты пирамидных нейронов, расположенные в радиальном слое, характеризовались иммунонегативной реакцией. Отмечалась умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ (2 балла) в отдельных нейронах краевого, пирамидного, радиального и молекулярного слоёв. В эндотелии капилляров наблюдалась иммунонегативная реакция.

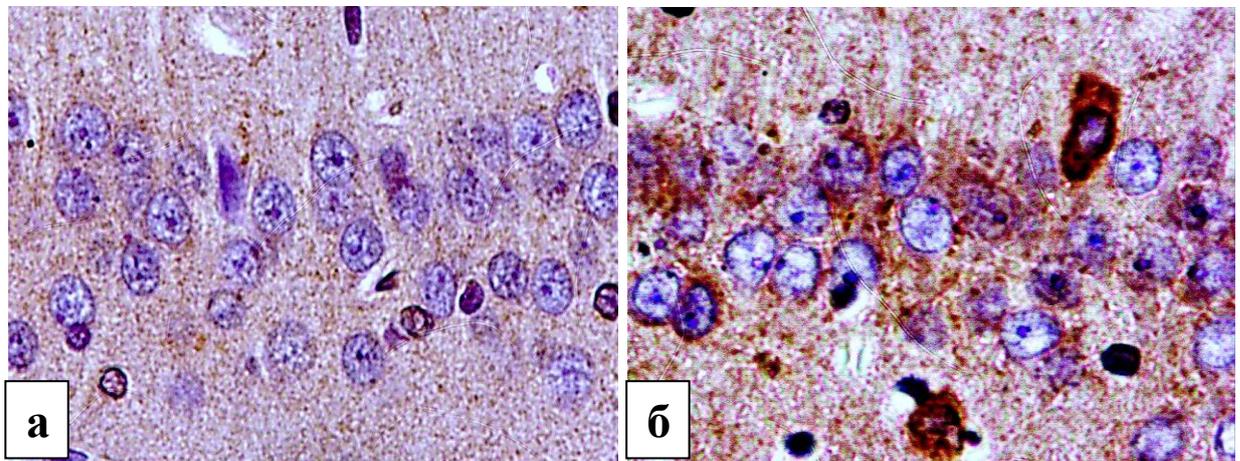


Рисунок 16. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в нейропиле радиального слоя (а). Умеренно выраженная и выраженная степень экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В пирамидном слое СА1 вентрального отдела гиппокампа у 24-х месячных крыс большинство нейронов характеризовалось умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией iNOS-ИРМ (2 балла), встречались нейроны с выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (Рисунок 16). Дендриты радиального слоя характеризовались иммунонегативной реакцией. В краевом, молекулярном и радиальном слоях вентрального отдела гиппокампа встречались нейроны с умеренной и выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (3 балла). При морфометрическом исследовании обнаружено достоверное

увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов (Рисунок 17) на 52,9 % ($p < 0,001$) по сравнению с более старыми животными, достигающее 100 (93,2-100) %. Достоверных различий относительной площади ИРМ в пирамидном слое CA1 у 12-ти и 24-х месячных крыс обнаружено не было ($p = 0,661$).

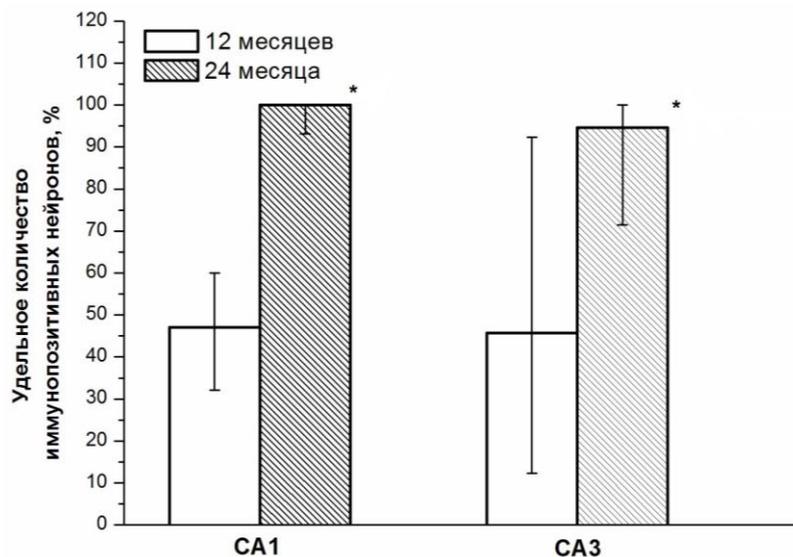


Рисунок 17. Динамика изменения удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

В CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс, по сравнению с дорсальным отделом гиппокампа не было обнаружено существенных различий в экспрессии iNOS-реактивного материала в цитоплазме перикарионов нейронов и нейропиле (Рисунок 18). В эндотелии капилляров наблюдалась иммунонегативная реакция, единичные капилляры характеризовались слабой экспрессией ИРМ.

У 24-х месячных крыс в нейропиле CA3 радиального слоя отмечалась умеренно выраженная экспрессия iNOS-ИРМ (2 балла), однако, в отличие от крыс в возрасте 12-ти месяцев ИРМ располагался более разрозненно. В пирамидном слое в большинстве нейронов наблюдалась умеренная экспрессия ИРМ (2 балла) (Рисунок 18). В краевом, молекулярном, радиальном и пирамидном слоях вентрального отдела гиппокампа встречались нейроны с выраженной

цитоплазматической экспрессией ИРМ (3 балла). В эндотелии капилляров наблюдалась иммунонегативная реакция.

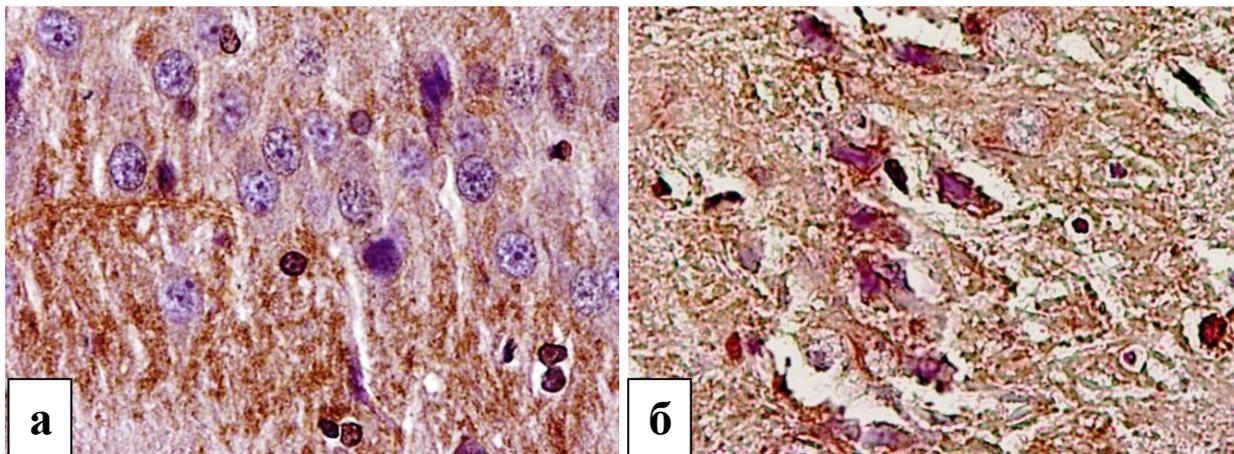


Рисунок 18. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле радиального слоя (а, б) и в перикарионах нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Отмечалось увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА3 на 48,9 % ($p < 0,001$), по сравнению с группой 12-ти месячных животных, достигающее 94,6 (71,4-100) % (Рисунок 17). Достоверных различий изменений при сопоставлении относительной площади ИРМ в СА3 у 12-ти и 24-х месячных крыс обнаружено не было ($p = 0,876$).

Таким образом, у животных в возрасте 24-х месяцев, по сравнению с 12-ти месячными животными, выявлено увеличение степени экспрессии iNOS-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов всех слоёв СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа, а также увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА1 и СА3. При этом возрастзависимое увеличение удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов наиболее выражено в вентральном отделе гиппокампа, по сравнению с дорсальным отделом.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против eNOS были обнаружены некоторые особенности гистологического строения СА1 по

сравнению с дорсальным отделом гиппокампа характеризующиеся отсутствием в большинстве дендритов радиального слоя экспрессии ИРМ (Рисунок 19).

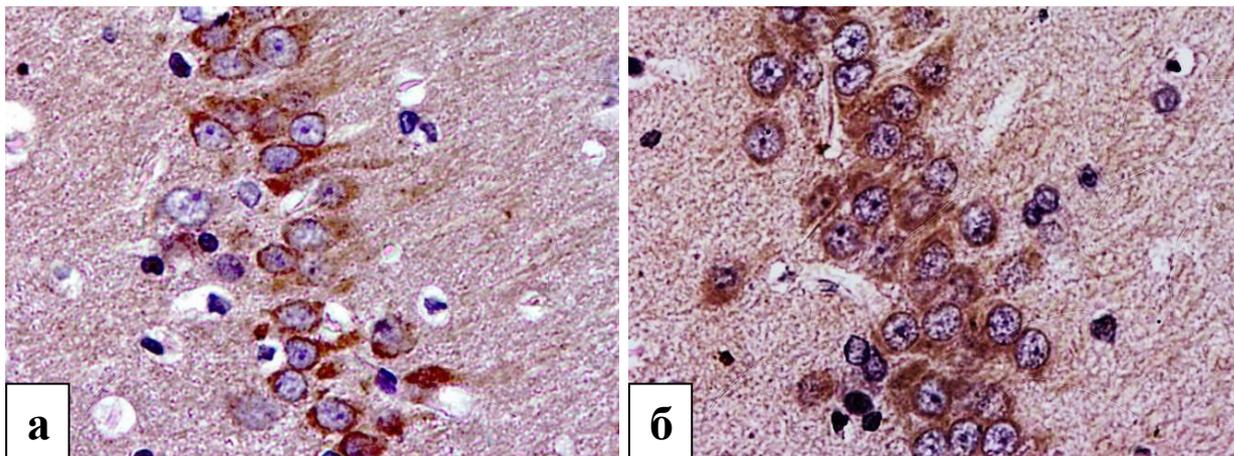


Рисунок 19. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 24-х месячных крыс степень экспрессии носила умеренно выраженный и выраженный характер (2-3 балла), ИРМ в цитоплазме нейронов располагался как более дисперсно в виде гранул, так и имел равномерный характер (Рисунок 19).

Отмечалось достоверное уменьшение удельного количество иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА1 на 10 % ($p=0,001$). Данный показатель в группе 24-х месячных крыс составили 90 (75-100) % и 100 % у 12-ти месячных животных (Рисунок 20). Достоверных различий относительной площади ИРМ в пирамидном слое СА1 у 12-ти и 24-х месячных крыс обнаружено не было ($p=0,650$) (Рисунок 20).

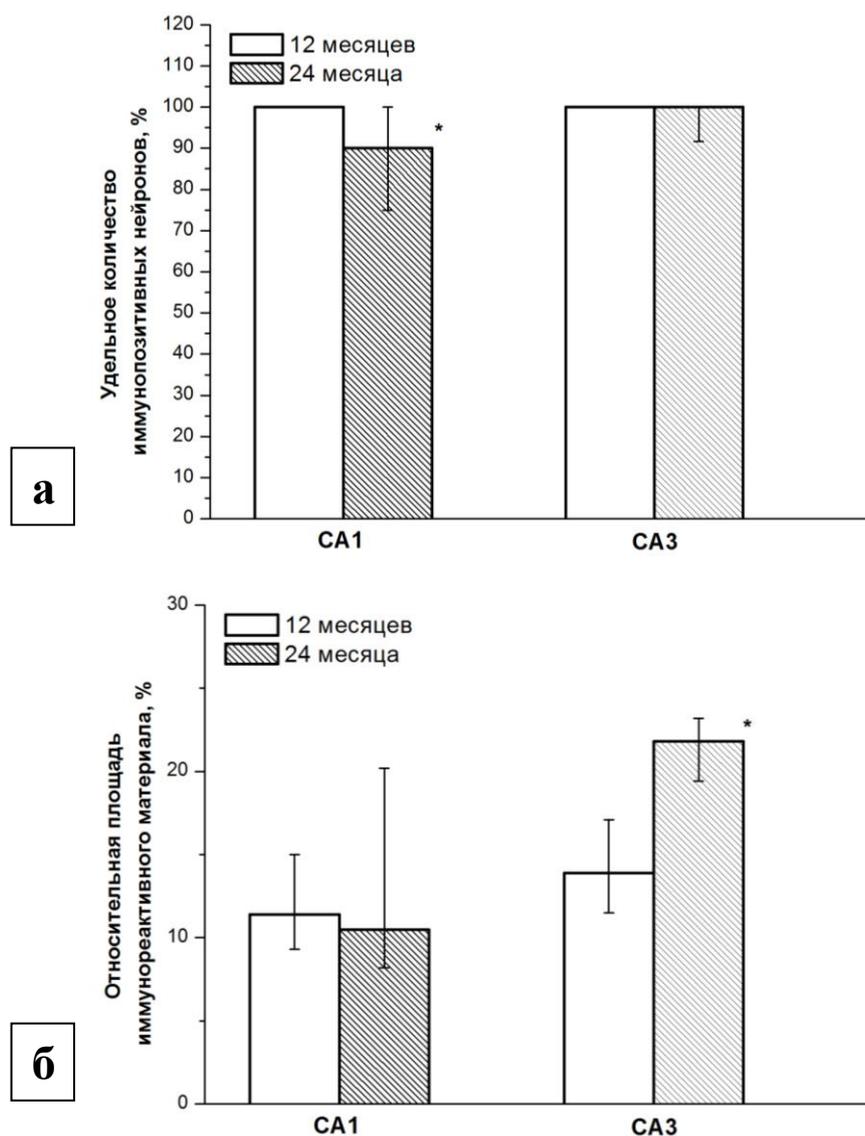


Рисунок 20. Динамика изменения удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс (а). Динамика изменения относительной площади eNOS-иммунореактивного материала в CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

У 12-ти месячных крыс в CA3 нейроны пирамидного слоя характеризовались умеренной цитоплазматической экспрессией eNOS-ИРМ (2 балл) (Рисунок 21). В нейропиле радиального слоя отмечалась слабая экспрессия ИРМ (1 балл). В молекулярном, радиальном и краевом слоях встречались единичные нейроны со слабовыраженной экспрессией ИРМ (1 балл) в перикарионах. В эндотелии капилляров наблюдалась умеренно выраженная степень экспрессии ИРМ (2 балла)

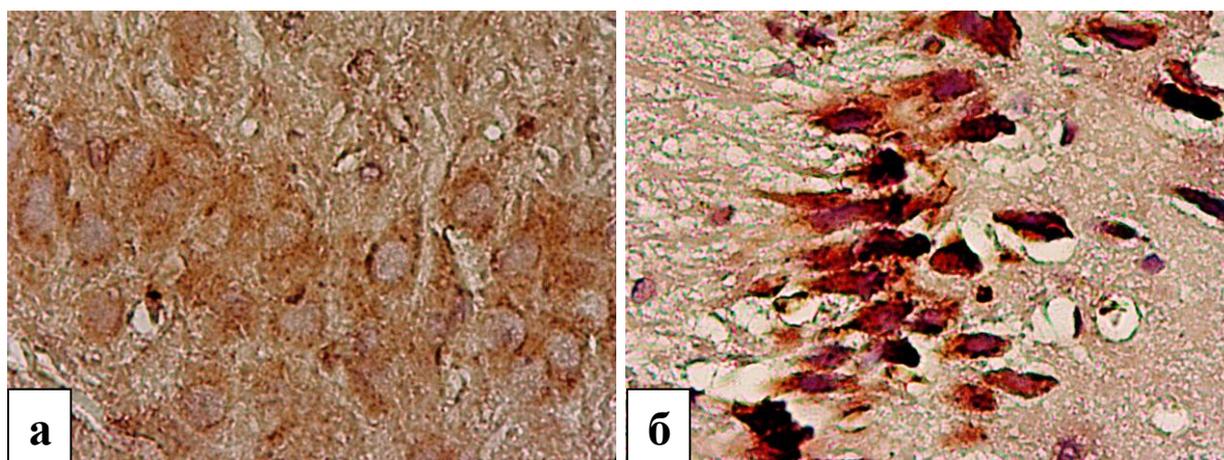


Рисунок 21. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренная цитоплазматической экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя (а). Увеличение содержания ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Нейроны пирамидного слоя СА3 24-х месячных животных характеризовались умеренной цитоплазматической экспрессией eNOS-позитивного материала (2 балл), а также выраженной экспрессией ИРМ (3 балла) в сморщенных нейронах пирамидного слоя (Рисунок 21). В нейропиле радиального слоя отмечалось отсутствие экспрессии ИРМ. В молекулярном, радиальном и краевом слоях встречались единичные нейроны с умеренной экспрессией ИРМ (2 балла) в перикарионах. В эндотелии капилляров наблюдалась слабовыраженная степень экспрессии ИРМ (1 балл).

Удельное количество иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 у животных исследуемых возрастных групп составило 100 % ($p=0,153$). При сопоставлении относительной площади ИРМ в СА3 у 12-ти и 24-х месячных крыс обнаружено достоверное увеличение данного параметра в группе более старых животных на 7,9 % ($p<0,001$) (Рисунок 20). Относительная площадь ИРМ у 12-ти месячных крыс составила 13,9 (11,5-17,1) %, у 24-х месячных крыс – 21,8 (19,4-23,2) %.

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, по сравнению с группой животных более молодого возраста, в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа отмечаются как однонаправленные особенности экспрессии

биомаркера eNOS, выражающиеся снижением степени экспрессии ИРМ в эндотелии капилляров CA1 и CA3, так и разнонаправленные изменения, характеризующиеся уменьшением удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое CA1 и увеличением относительной площади ИРМ в CA3 (вероятно, за счет увеличения нейронов с выраженной степенью экспрессии eNOS-ИРМ в цитоплазме). При этом в дорсальном отделе гиппокампа наблюдается более выраженное, по сравнению с вентральным отделом, снижение степени экспрессии eNOS, сочетающееся с уменьшением исследуемых морфометрических параметров, как в CA1, так и в CA3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии nNOS

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к nNOS различий в характере и степени экспрессии (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии beclin-1

У крыс в возрасте 12-ти месяцев при иммуногистохимическом исследовании с использованием антител против beclin-1 в CA1 вентрального отдела гиппокампа наблюдалась слабовыраженная цитоплазматическая экспрессия beclin-1-ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов пирамидного слоя (Рисунок 22).

У 24-х месячных крыс, по сравнению с животными в возрасте 12-ти месяцев в цитоплазме пирамидных нейронов CA1 наблюдалось увеличение степени экспрессии до выраженной (3 балла) (Рисунок 22).

У крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в CA3 вентрального отдела гиппокампа степень экспрессии beclin-1 ИРМ носила схожий характер с распределением ИРМ в CA3 дорсального отдела гиппокампа.

При морфометрической оценке относительной площади ИРМ достоверных различий в CA1 и CA3 между животными исследуемых групп обнаружено не было. У крыс 1 группы в CA1 относительная площадь beclin-1-иммунопозитивного материала составила 4,6 (3,5-5,1) %, у крыс 2 группы –

3,5 (2,2-5,2) %. В СА3 относительная площадь ИРМ у 12-ти месячных животных составила 2,5 (6,6-7,1) %, у крыс в возрасте 24-х месяцев - 6,2 (5,6-8,8) %.

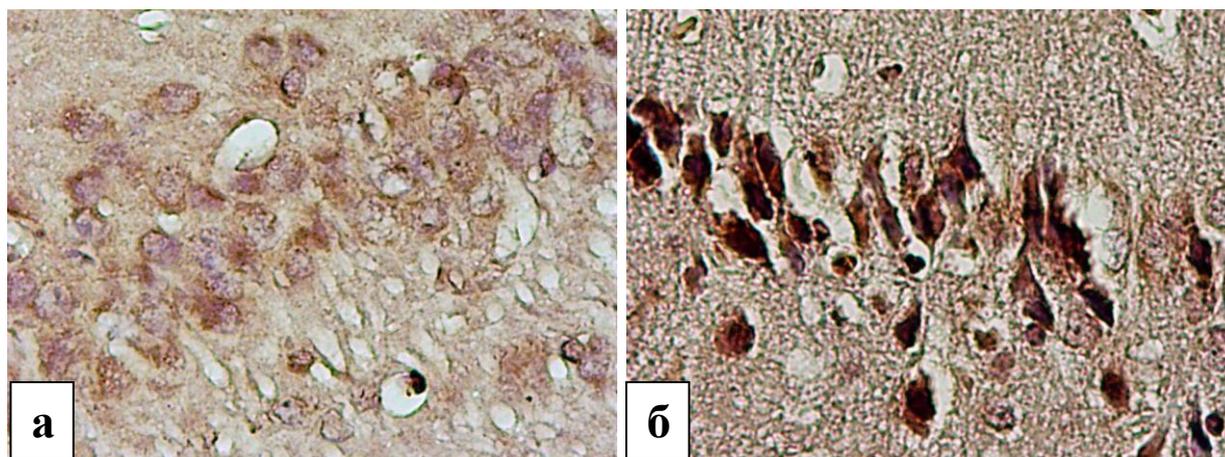


Рисунок 22. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Слабовыраженная цитоплазматическая экспрессия beclin-1-ИРМ (а). Увеличение степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против beclin-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, изменение степени экспрессии биомаркера beclin-1 в вентральном и дорсальном отделах гиппокампа у 24-х месячных животных, по сравнению с крысами в возрасте 12-ти месяцев, представляло однонаправленный характер и в вентральном отделе гиппокампа выражалось увеличением степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя не только в цитоархитектонической области СА3, но и в СА1.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев с использованием антител против GFAP существенных различий в степени и характере экспрессии ИРМ в СА1 и СА3 по сравнению с СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа обнаружено не было (Рисунок 23).

При морфометрическом исследовании СА1 и СА3 были обнаружены достоверные различия в относительной площади ИРМ между 12-ти и 24-х месячными животными ($p < 0,001$). У крыс 1 группы в СА1 относительная площадь

GFAP-ИРМ составила 7,6 (7-8,5) %, у крыс 2 группы – 2,6 (2-4,6) %. В СА3 относительная площадь ИРМ у 12-ти месячных животных составила 9,3 (8,2-9,6) %, у крыс в возрасте 24-х месяцев - 2,5 (2,1- 3,9) % (Рисунок 24).

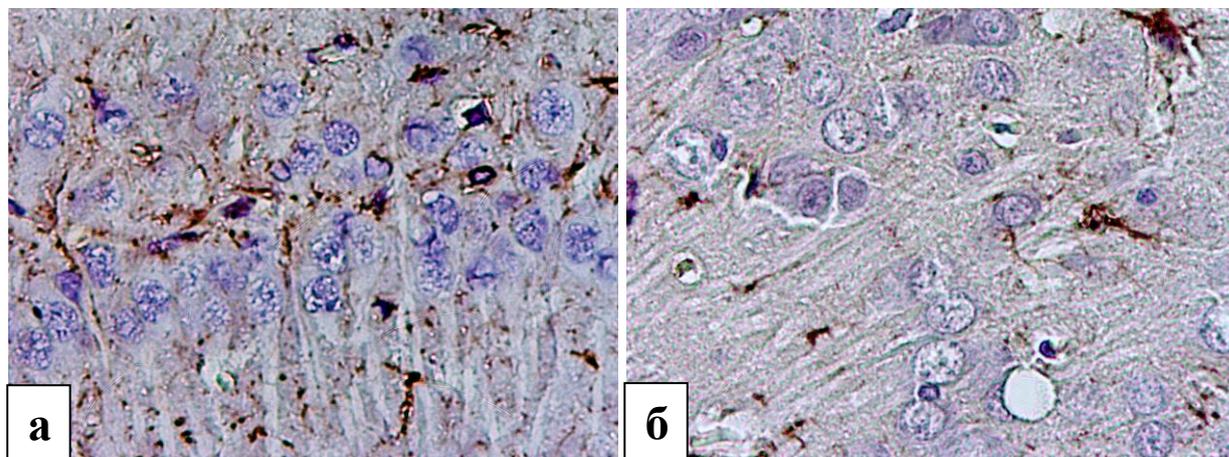


Рисунок 23. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в астроцитах (а, б). Уменьшение содержания ИРМ в пирамидном, радиальном и краевом слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

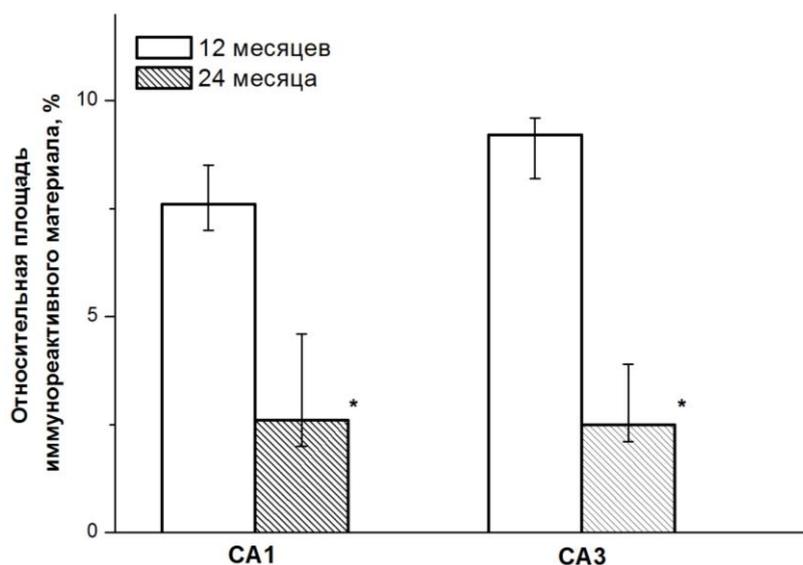


Рисунок 24. Динамика изменения относительной площади GFAP-иммунореактивного материала в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти и 24-х месячных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, в вентральном отделе гиппокампа у 24-х месячных животных, по сравнению с более молодыми животными и в отличие от

дорсального отдела гиппокампа, преобладают регрессивные реакции астроглии, выражающиеся уменьшением относительной площади GFAP-ИРМ в СА1 и СА3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии BDNF

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа у крыс в возрасте 12-ти и 24-х месяцев в большинстве нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 определялась иммунонегативная реакция BDNF-ИРМ. Перикарионы сморщенных нейронов характеризовались умеренной и выраженной цитоплазматической экспрессией BDNF-ИРМ. В астроцитах пирамидного, молекулярного и радиального слоёв преобладала выраженная цитоплазматическая экспрессия BDNF-ИРМ (3 балла).

Таким образом, у животных исследуемых возрастных групп не было обнаружено существенных различий в степени и характере распределения BDNF-ИРМ, как в цитоплазме перикарионов нейронов, так и в цитоплазме астроцитов СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа. При этом в дорсальном отделе гиппокампа наблюдалось увеличение степени экспрессии BDNF-ИРМ, как в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, так и в глиоцитах.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии HSP70

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа в СА1 и СА3 у 12-ти и 24-х месячных крыс не было обнаружено различий в степени и характере распределения ИРМ, по сравнению с СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа.

Обнаруженное в СА1 и СА3 вентрального и дорсального отделов гиппокампа отсутствие экспрессии HSP70 у 12-ти и 24-х месячных животных, свидетельствует об однонаправленных регион-специфических функциональных особенностях гиппокампа в процессе старения.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

При иммуногистохимическом исследовании СА1 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против СР существенных различий в степени экспрессии ИРМ с дорсальным отделом

гиппокампа обнаружено не было. Однако в радиальном слое встречались дендриты, которые характеризовались выраженной степенью экспрессии ИРМ.

У животных второй возрастной группы наблюдалось отсутствие экспрессии ИРМ в дендритах радиального слоя при сохранении умеренно выраженной цитоплазматической экспрессии ИРМ (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя.

Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 у 12-ти и 24-х месячных крыс не обнаружено. Данный показатель у крыс исследуемых возрастных групп составил 100 %. При компьютерном морфометрическом анализе наблюдается снижение относительной площади ИРМ ($p < 0,001$). У крыс 1 группы в СА1 относительная площадь ИРМ составила 19,4 (16,7-26,6) %, у крыс 2 группы – 12,0 (9,8-14,5) % (Рисунок 25).

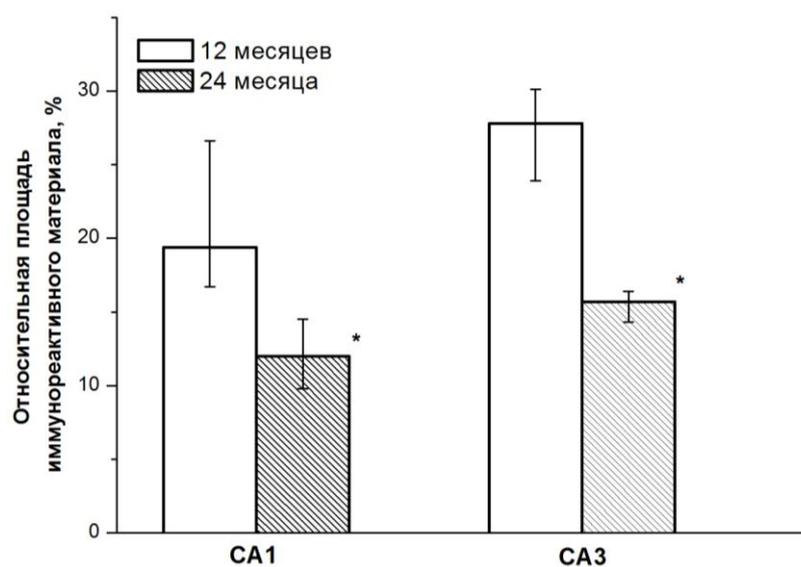


Рисунок 25. Динамика изменения относительной площади SR-иммунореактивного материала в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти- и 24-х месячных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

В СА3 вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев различий в степени экспрессии ИРМ по сравнению с дорсальным отделом гиппокампа обнаружено не было (Рисунок 26).

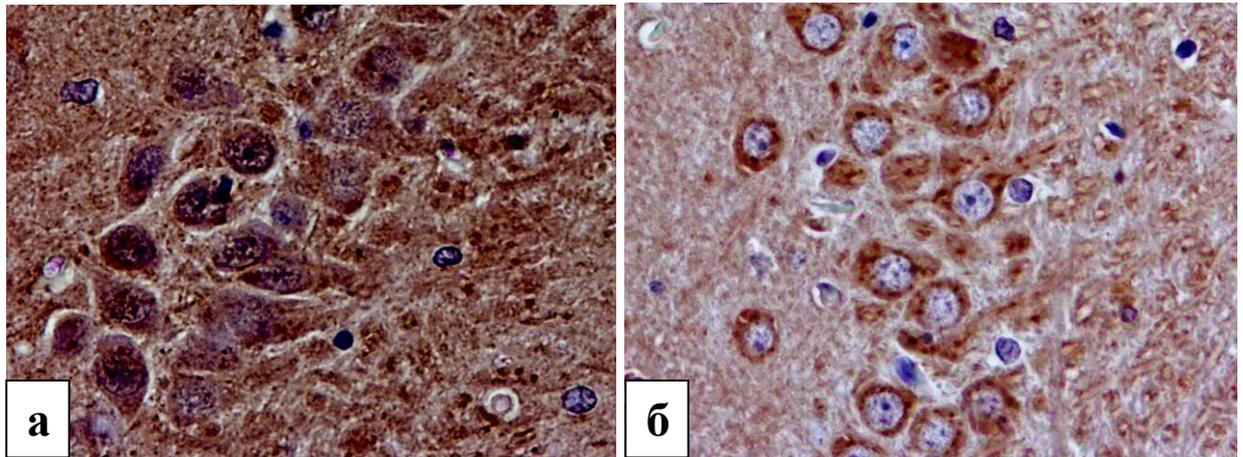


Рисунок 26. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя (а). Уменьшение содержания ИРМ в дендритах радиального слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

У 24-х месячных ИРМ выявлялся преимущественно в перикарионах нейронов пирамидного слоя (2 балла) и практически отсутствовал в дендритах радиального слоя (Рисунок 26).

Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 у 12-ти и 24-х месячных крыс не обнаружено. Данный показатель у крыс исследуемых возрастных групп составил 100 %. При компьютерном морфометрическом анализе наблюдается снижение относительной площади ИРМ ($p < 0,001$). У крыс 1 группы в СА3 относительная площадь ИРМ составила 27,8 (23,4-30,1) % , у крыс 2 группы – 15,7 (14,3-16,4) % (Рисунок 25).

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, по сравнению с 12-ти месячными животными, в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа отмечается отсутствие экспрессии биомаркера СР в дендритах радиального слоя, при сохранении умеренно выраженной цитоплазматической экспрессии СР в перикарионах нейронов пирамидного слоя, сопровождающееся снижением относительной площади ИРМ в СА1 и СА3, наиболее выраженное в цитоархитектонической области СА3. При этом в вентральном отделе

гиппокампа, по сравнению с дорсальным, изменения в степени и характере экспрессии СР наиболее выражены.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии синаптофизина

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс с использованием антител против СФ в СА1 отмечается умеренно выраженная гранулярная экспрессия ИРМ (2 балла) по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв (Рисунок 27). В цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя наблюдается иммунонегативная реакция. Нейропиле молекулярного и краевого слоев характеризуется умеренно выраженным дисперсно распределённым ИРМ.

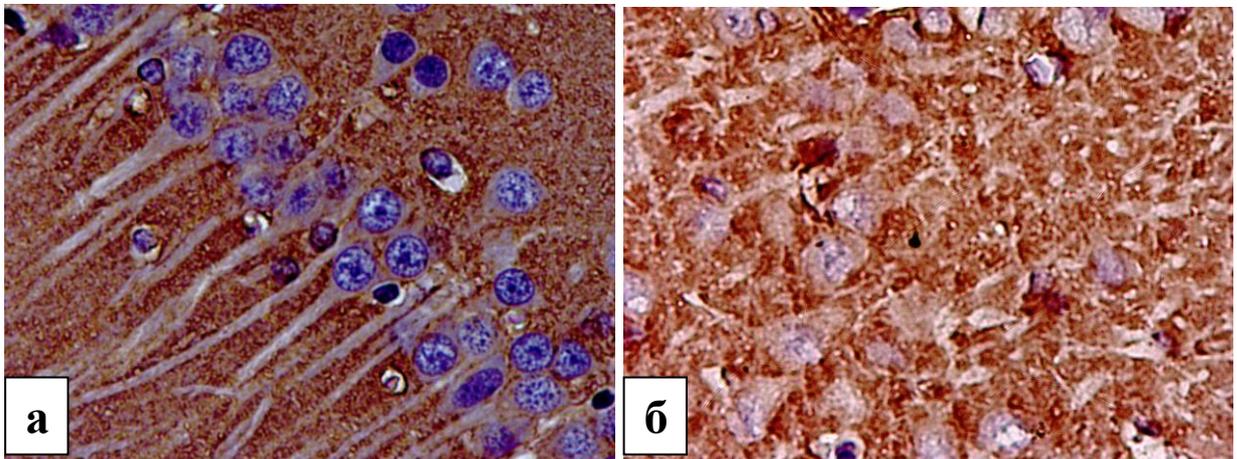


Рисунок 27. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная экспрессия по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв (а). Равномерное умеренно выраженное распределение ИРМ в нейропиле пирамидного и радиального слоев, снижение упорядоченности расположения дендритов в радиальном слое (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В нейропиле пирамидного, радиального, молекулярного и краевого слоев СА1 24-х месячных крыс отмечалось равномерное умеренно выраженное распределение СФ-иммунореактивного гранулярного материала (2 балла) (Рисунок 27). Большинство нейронов пирамидного слоя характеризовались отсутствием цитоплазматической экспрессии СФ в перикарионах. На протяжении пирамидного слоя СА1 встречались поля зрения, содержащие сморщенные нейроны, в цитоплазме перикарионов которых наблюдалась умеренная и

выраженная степень экспрессии СФ-ИРМ. В отличие от крыс в возрасте 12-ти месяцев, у 24-х месячных животных умеренно выраженная гранулярная экспрессия ИРМ по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв встречалась в единичных полях зрения.

Достоверных различий в относительной площади ИРМ у 12-ти и 24-х месячных животных в СА1 вентрального отдела гиппокампа обнаружено не было. У крыс 1 группы относительная площадь ИРМ составила 35,6 (32,3-36,5) %, у крыс 2 группы – 37,6 (29-42) %.

При оценке результатов иммуногистохимического исследования у 12-ти и 24-х месячных крыс в СА3 вентрального отдела гиппокампа отмечается схожий с СА1 характер экспрессии СФ-ИРМ (Рисунок 28).

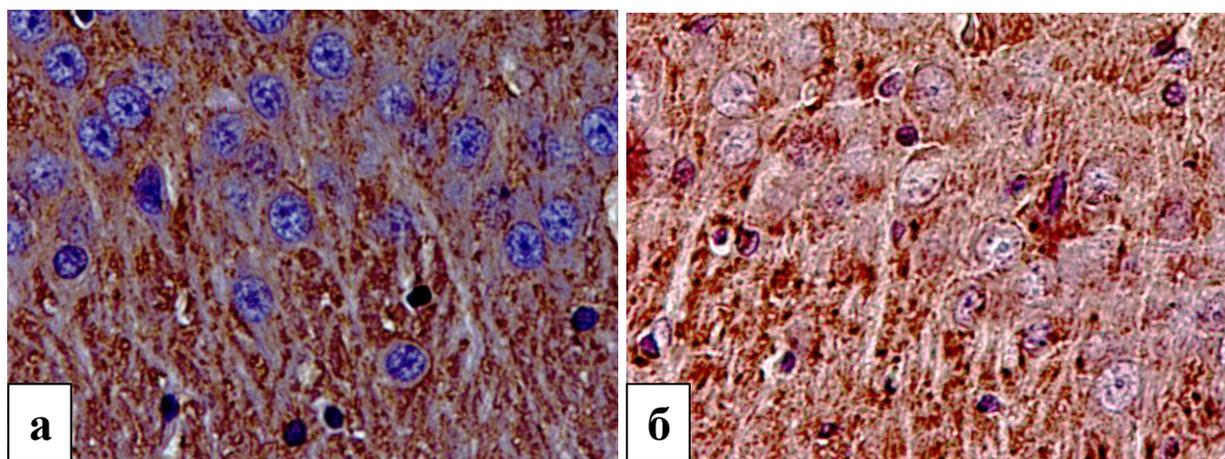


Рисунок 28. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев (б). Умеренно выраженная экспрессия по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв (а). Равномерное умеренно выраженное распределение ИРМ в нейропиле пирамидного и радиального слоев, снижение упорядоченности расположения дендритов в радиальном слое (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Достоверных различий в относительной площади ИРМ у 12-ти и 24-х месячных животных в СА3 вентрального отдела гиппокампа обнаружено не было. У крыс 1 группы относительная площадь ИРМ составила 33,1 (32,4-35) %, у крыс 2 группы – 27,9 (26,7-40) %.

Таким образом, у 12-ти месячных животных в нейропиле пирамидного слоя в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа в отличие от животных старшей

возрастной группы (24 месяца) обнаружена большая степень упорядоченности расположения дендритов в радиальном слое и распределении СФ-ИРМ по поверхности дендритов в пирамидном и радиальном слоях гиппокампа наиболее выраженные в СА1. При этом в вентральном отделе гиппокампа, в отличие от дорсального, не было обнаружено возрастзависимого увеличения степени экспрессии ИРМ.

3.2. Морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев при моделировании комбинированного стресса

3.2.1. Патоморфологическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев при моделировании комбинированного стресса

При изучении микропрепаратов головного мозга, окрашенных тионином по методу Ниссля, у животных 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в СА1 дорсального отдела гиппокампа не наблюдалось существенных различий в гистологическом строении пирамидного слоя, по сравнению с крысами контрольной группы. У некоторых животных на протяжении пирамидного слоя СА1 в единичных полях зрения встречались участки содержащие сморщенные гиперхромные нейроны. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 5,8 (1,1-14,9) %. Достоверных различий с группой контрольных животных не наблюдалось ($p=0,524$) (Рисунок 29).

У 12-ти месячных стрессированных животных нейроны пирамидного слоя в СА1 располагались в 2-3 слоя, отмечалось уменьшение ширины пирамидного слоя на 8,4 ($p=0,010$) % , по сравнению с крысами контрольной группы. Данный показатель у животных, подвергнутых комбинированному стрессу составил – 33,6 (28,4-36,3) мкм (Рисунок 29).

Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа продемонстрировала значимое уменьшение средней площади ядер, средней площади перикарионов и средней площади

цитоплазмы перикарионов нейронов у 12-ти месячных стрессированных крыс по сравнению с контрольными животными ($p < 0,001$) (Таблица 5). Достоверных различий относительных морфометрических параметров, ядерно-цитоплазматического отношения и отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю в СА1 между группами обнаружено не было (Таблица 5).

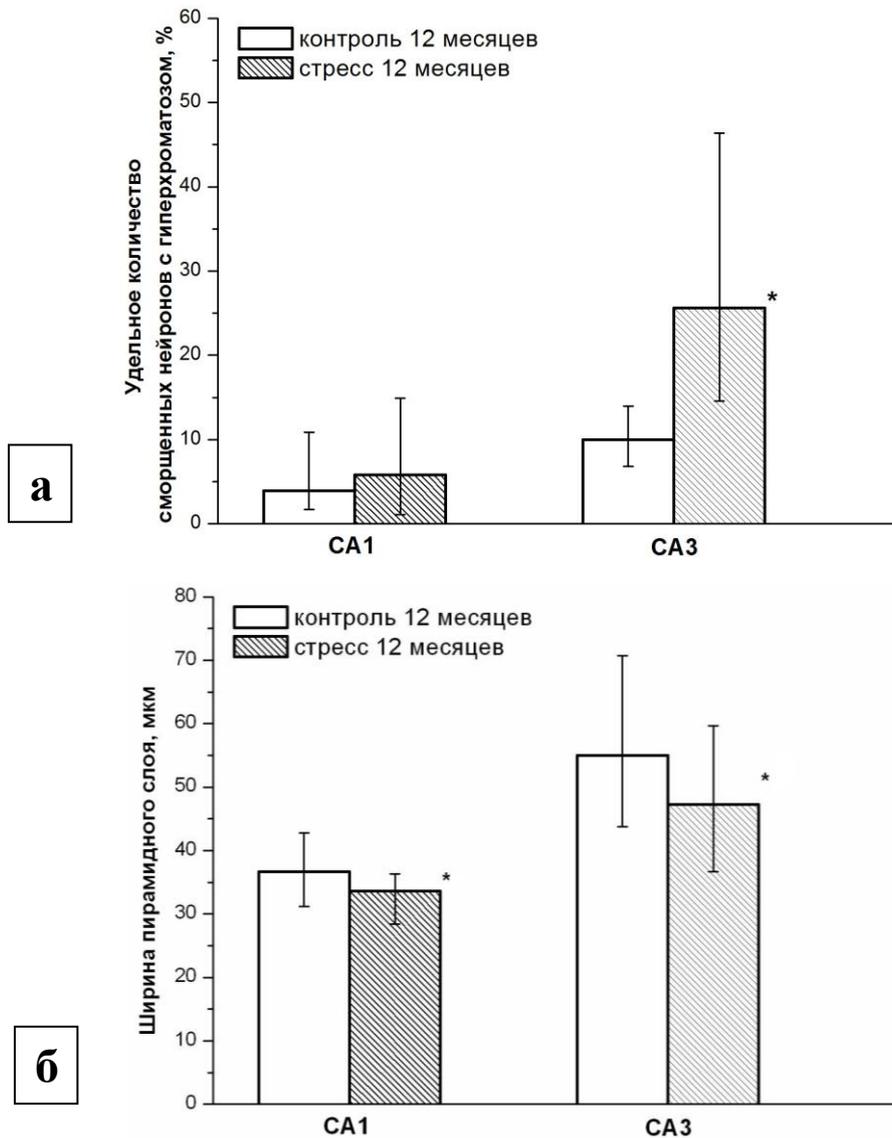


Рисунок 29. Динамика изменения удельного количества сморщенных нейронов пирамидного слоя с гиперхроматозом цитоплазмы в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (а). Динамика изменения ширины пирамидного слоя в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

У 12-ти месячных крыс, подвергнутых стрессовому воздействию наиболее выраженные изменения, по сравнению с контролем, отмечались в пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа (Рисунок 30). При окраске по методу Ниссля в пирамидном слое выявлялись нейроны с гиперхроматозом, хроматолизом и кариопикнозом. Удельное количество сморщенных гиперхромных нейронов в группе 12-ти месячных стрессированных крыс составило 25,6 (14,6-46,4) %, что выше контрольных значений на 15,6 % ($p < 0,001$) (Рисунок 29). У некоторых животных в пирамидном слое СА3 встречались поля зрения, в которых определялись лишь сморщенные нейроны с гиперхроматозом цитоплазмы. Отмечалось уменьшение ширины пирамидного слоя на 13,1 % ($p < 0,001$) по сравнению с крысами контрольной группы. Данный показатель у животных, подвергнутых комбинированному стрессу составил – 47,3 (36,7-59,7) мкм (Рисунок 29).

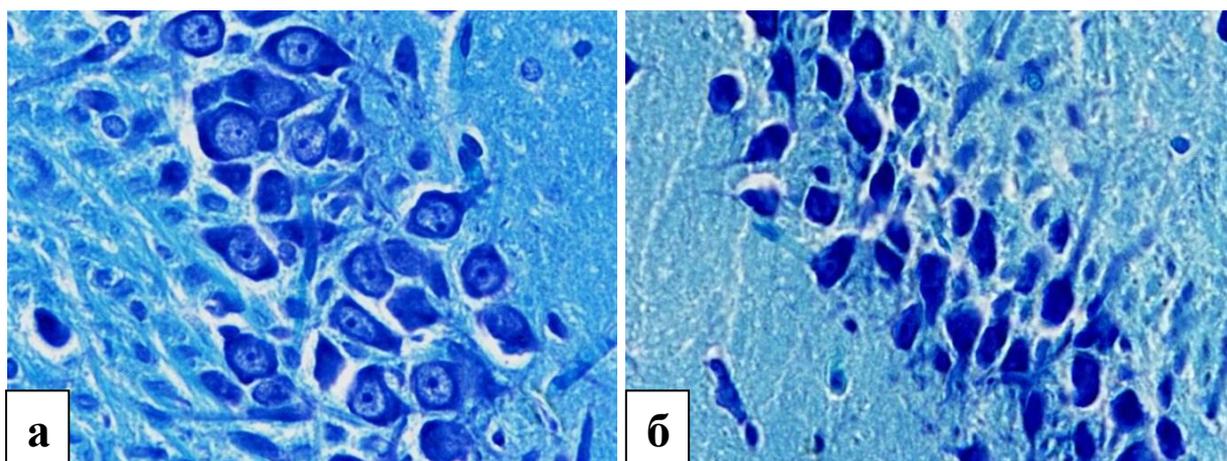


Рисунок 30. Гистологическое строение пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Большинство перикарионов нейронов пирамидного слоя полигональной формы (а). Наличие в пирамидном слое значительного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы (б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа продемонстрировала снижение средней площади ядер и перикарионов нейронов у 12-ти месячных стрессированных крыс по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,001$) (Таблица 5).

Таблица 5 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя дорсального отдела гиппокампа крыс, Me (Q₁-Q₂)

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 12-ти месяцев
CA1	Площадь ядер нейронов, мкм ²	57,7 (49,9-66,1)	46,7* (37,6-58,5)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	117,9 (101,7-136,2)	100* (83,9-119,1)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	59,5 (49,1-74,4)	51,1* (42,6-64,2)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	20 (17,9-23,1)	19,4 (16,7-22,2)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	42,5 (37,2-45,6)	41,1 (31,3-48,9)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов, % нейронов	22,2 (19-22,9)	20,4 (18-24,5)
	Относительная площадь нейропиля, %	57,5 (54,4-62,8)	58,9 (51,1-68,7)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	1 (0,8-1,1)	0,9 (0,7-1,2)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,6-0,8)	0,7 (0,5-1)

Продолжение таблицы 5

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 12-ти месяцев
CA3	Площадь ядер нейронов, мкм ²	64,5 (47,8-80,2)	49,1* (32,1-72,7)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	140,7 (107,1-172,8)	126,4* (85,7-164,1)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	73,6 (53,6-96,5)	72,9 (50,9-94,1)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	18,5 (16,9- 20,6)	14,1* (11,3-19,1)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	41,3 (36,1-46,9)	35,4* (30,5-44,8)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	23,1 (18,9-25,8)	21,4 (18,5-24,3)
	Относительная площадь нейропиля, %	58,7 (53,1-63,9)	64,6* (55,2-69,5)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,8 (0,6-1,1)	0,7* (0,5-0,9)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,6-0,9)	0,5* (0,5-0,8)
* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).			

Достоверные различия обнаруживались в снижении относительных площадей ядер ($p < 0,001$) и перикарионов нейронов ($p = 0,007$), увеличении относительной площади нейропиля ($p = 0,007$) в пирамидном слое CA3 у животных

12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса по сравнению с контролем (Таблица 5).

Также у стрессированных крыс отмечалось снижение ядерно-цитоплазматического отношения ($p < 0,001$) и отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю ($p = 0,007$) (Таблица 5)

Таким образом, при длительном комбинированном стрессовом воздействии у крыс в возрасте 12-ти месяцев в пирамидном слое дорсального отдела гиппокампа обнаруживается сочетание процессов повреждения нейронов с атрофическими изменениями, наиболее выраженными в цитоархитектонической области СА3, характеризующиеся увеличением удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в СА3, уменьшением ширины пирамидного слоя, снижением средней площади ядер нейронов, средней площади перикарионов нейронов в СА1 и СА3, уменьшением средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов в СА1, снижением относительной площади ядер нейронов, относительной площади перикарионов нейронов, ядерно-цитоплазматического отношения и отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, а также увеличение относительной площади нейропиля в СА3.

3.2.2. Иммуногистохимическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса

Иммуногистохимическое исследование экспрессии caspase-3

При оценке результатов иммуногистохимического исследования дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса с использованием антител против caspase-3, в отличие от крыс контрольной группы, в цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 преобладала умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла) (Рисунок 32). Caspase-3-ИРМ локализовался как в цитоплазме нейронов округлой и близкой к округлой форме, так и в нейронах со

сморщиванием перикарионов. Необходимо отметить, что в единичных сморщенных нейронах экспрессия носила иммунонегативный характер. В СА3 экспрессия ИРМ наблюдалась в цитоплазме нейронов пирамидного слоя и имела умеренно выраженный мелкогранулярный характер. В отдельных глиоцитах молекулярного, радиального и пирамидного слоев отмечалась выраженная экспрессия ИРМ. Удельное количество иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных животных достоверно увеличивалось на 36,4 % ($p=0,007$), по сравнению с контрольной группой, и составило 36,4 (25-47,6) %. В СА3 удельное количество иммунопозитивных нейронов увеличивалось на 13,8 % ($p<0,001$) и у крыс, находившихся под влиянием комбинированного стресса составило 13,8 (7,7-40) %.

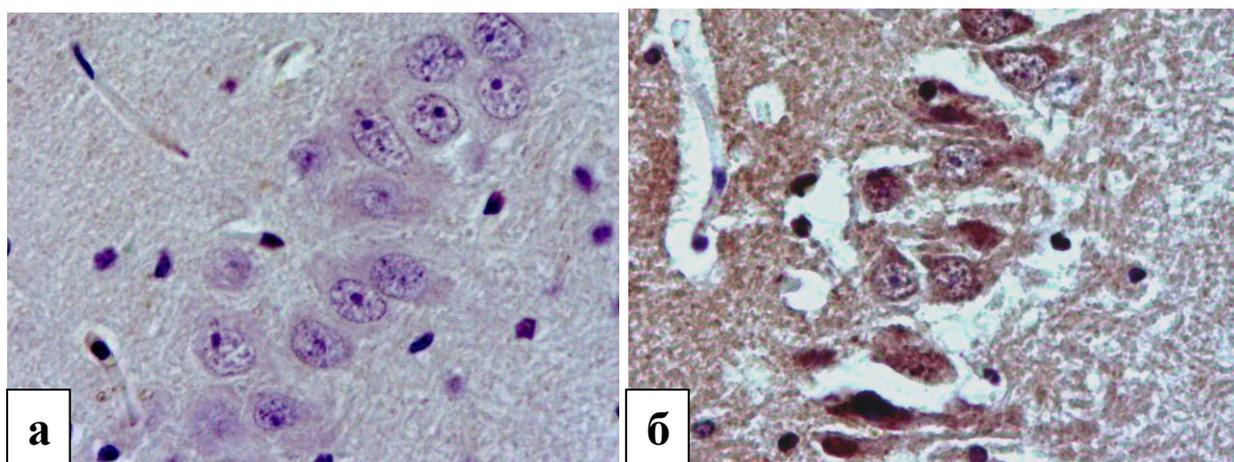


Рисунок 32. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Иммунонегативная реакция в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против caspase-3, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса, у крыс в возрасте 12-ти месяцев в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, нами выявлено увеличение удельно количества caspase-3 иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое в сочетании с увеличением степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител против iNOS в *st. pyramidalis*, *radialis* и *oriens* CA1 встречались нейроны с умеренно выраженной гранулярной цитоплазматической степенью экспрессии ИРМ (2 балла) в перикарионах. Обнаруживались единичные нейроны с выраженной степенью экспрессии iNOS-ИРМ. В нейропиле радиального слоя наблюдалась слабовыраженная экспрессия ИРМ (1 балл).

При проведении морфометрического исследования отмечалось увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое CA1 на 31,9 %, по сравнению с контрольной группой 12-ти месячных животных, достигающее 44,4 (32,1-56,5) % ($p < 0,001$) (Рисунок 33). Достоверных различий в изменении относительной площади iNOS-ИРМ в CA1 дорсального отдела гиппокампа между контрольными и стрессированными животными обнаружено не было ($p = 0,092$) (Рисунок 33). Относительная площадь иммунопозитивного материала в CA1 у контрольной группы животных составила 3,9 (2,2- 11,3) %, у 12-ти месячных стрессированных крыс – 6,6 (5,5-9,6) %.

В перикарионах нейронов пирамидного слоя CA3, а также в нейропиле прилегающей зоны радиального слоя наблюдалась умеренно выраженная степень экспрессии (2 балла) ИРМ (Рисунок 34). Обнаружено увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое CA3 на 39,2 % ($p < 0,001$), которое составило 47,3 (21,0-77,7) % (Рисунок 33), а также увеличение экспрессии iNOS в нейропиле *st. radialis*.

Относительная площадь иммунопозитивного материала в CA3 гиппокампа у стрессированных крыс увеличилась на 30,2 % ($p < 0,001$), что составило 53,5 (46,4-57,1) % (Рисунок 33).

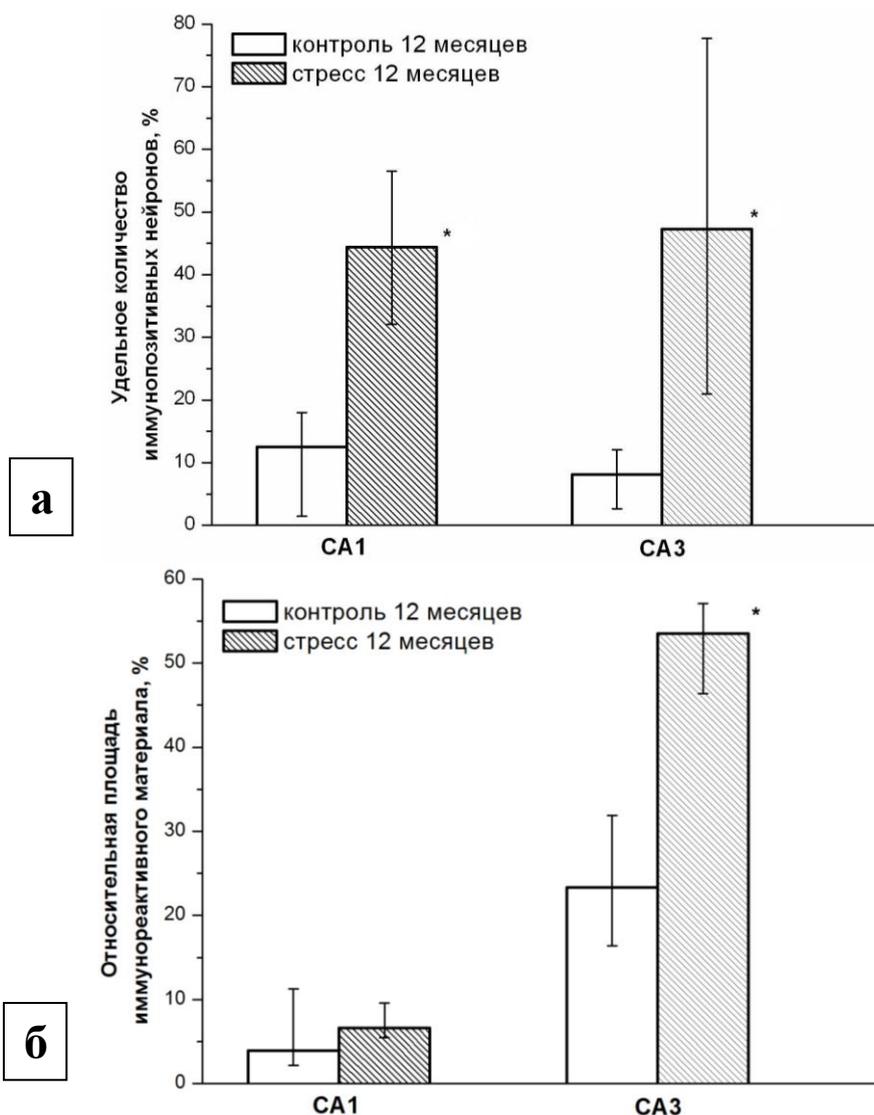


Рисунок 33. Динамика изменения удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (а). Динамика изменения относительной площади iNOS-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Как и у контрольной группы 12-ти месячных животных, у стрессированных крыс отмечалась разная выраженность экспрессии ИРМ в нейропиле радиального слоя CA3, CA2 и CA1 зон дорсального отдела гиппокампа, приобретая вид полумесяца и исчезая в CA1.

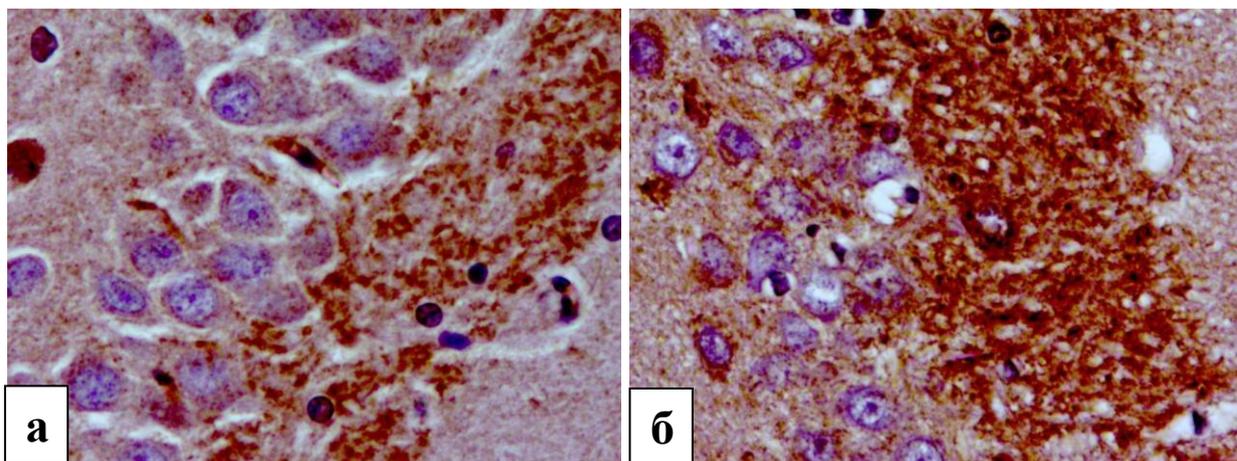


Рисунок 34. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле радиального слоя (а) Увеличение содержания ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в нейропиле радиального слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у 12-ти месячных животных в пирамидном слое СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа выявлено увеличение степени цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов, в сочетании с увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов, а также увеличение относительной площади ИРМ в цитоархитектонической области СА3. При этом у 12-ти месячных стрессированных животных в нейропиле радиального слоя СА1-СА3 дорсального отдела гиппокампа сохраняется распределение iNOS-ИРМ в виде полумесяца, что отражает иммунофенотипические регион-специфические особенности гиппокампа.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS

При изучении СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа с использованием антител против eNOS у 12-ти месячных крыс, подвергнутых комбинированному стрессу, в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя отмечается отсутствие экспрессии ИРМ (Рисунок 35, рисунок 36).

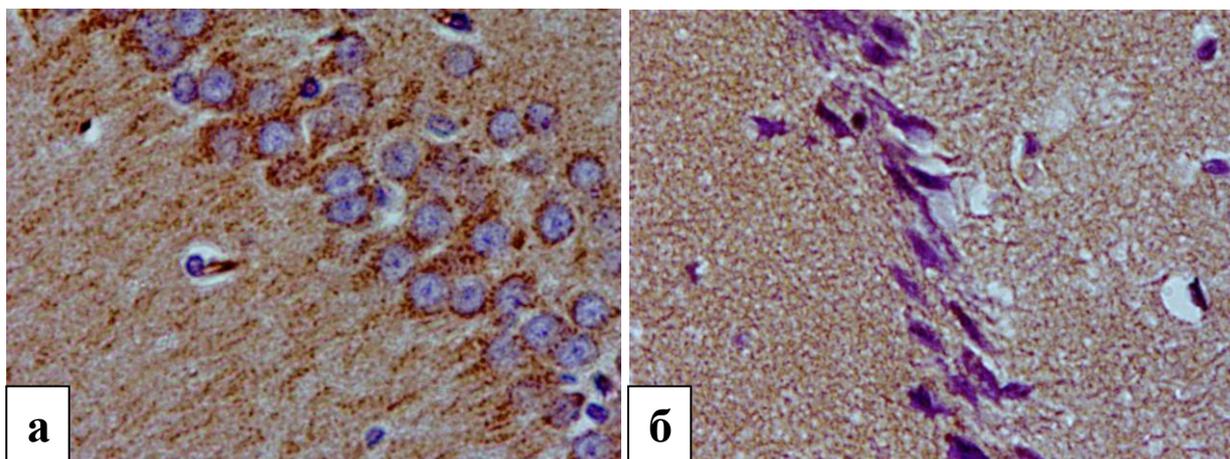


Рисунок 35. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренная цитоплазматическая степень экспрессии ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя, дендритах радиального слоя и эндотелии капилляров (а). Отсутствие экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в эндотелии капилляров (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

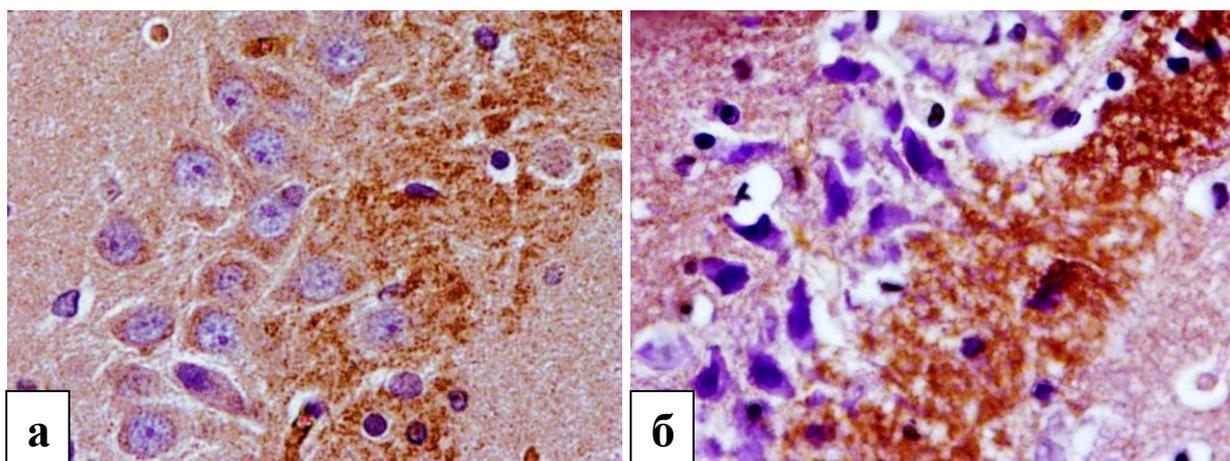


Рисунок 36. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабая и умеренная степень экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, умеренная степень экспрессии ИРМ в нейропиле радиального слоя и в эндотелии капилляров (а). Отсутствие экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В ходе проведения морфометрического исследования в СА1 обнаружено снижение удельного количества ИРМ по сравнению с контрольной группой на 61,2 ($p < 0,001$) % в СА1 и на 56 % в СА3 ($p < 0,001$), что составило 33,8 (0-86,1) % и 44,0 (23,1-66,7) % соответственно (Рисунок 37). Необходимо отметить, что в пирамидном слое СА1 и СА3 встречались нейроны неизменённой формы с умеренной и слабовыраженной цитоплазматической экспрессией eNOS-ИРМ. В СА1 дорсального отдела гиппокампа, в отличие от контрольной группы животных, наблюдалась иммунонегативная реакция в дендритах пирамидных нейронов (Рисунок 35). Относительная площадь ИРМ в СА1 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных крыс уменьшилась на 33,5 % ($p < 0,001$), что составило 4,6 (3,2-7,6) % (Рисунок 37).

У большинства животных нейропил радиального слоя СА3 характеризовался иммунонегативной реакцией. Однако, у некоторых животных сохранялась умеренно выраженная экспрессия eNOS-ИРМ в нейропиле, при отсутствии экспрессии в нейронах (Рисунок 36).

Относительная площадь иммунопозитивного материала в СА3 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных крыс уменьшилась на 19,5 % ($p < 0,001$), что составило 13,2 (12,2-19,8) % (Рисунок 37).

В эндотелии сосудов микроциркуляторного русла СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс отмечено практически полное исчезновение экспрессии eNOS в эндотелиоцитах большинства капилляров.

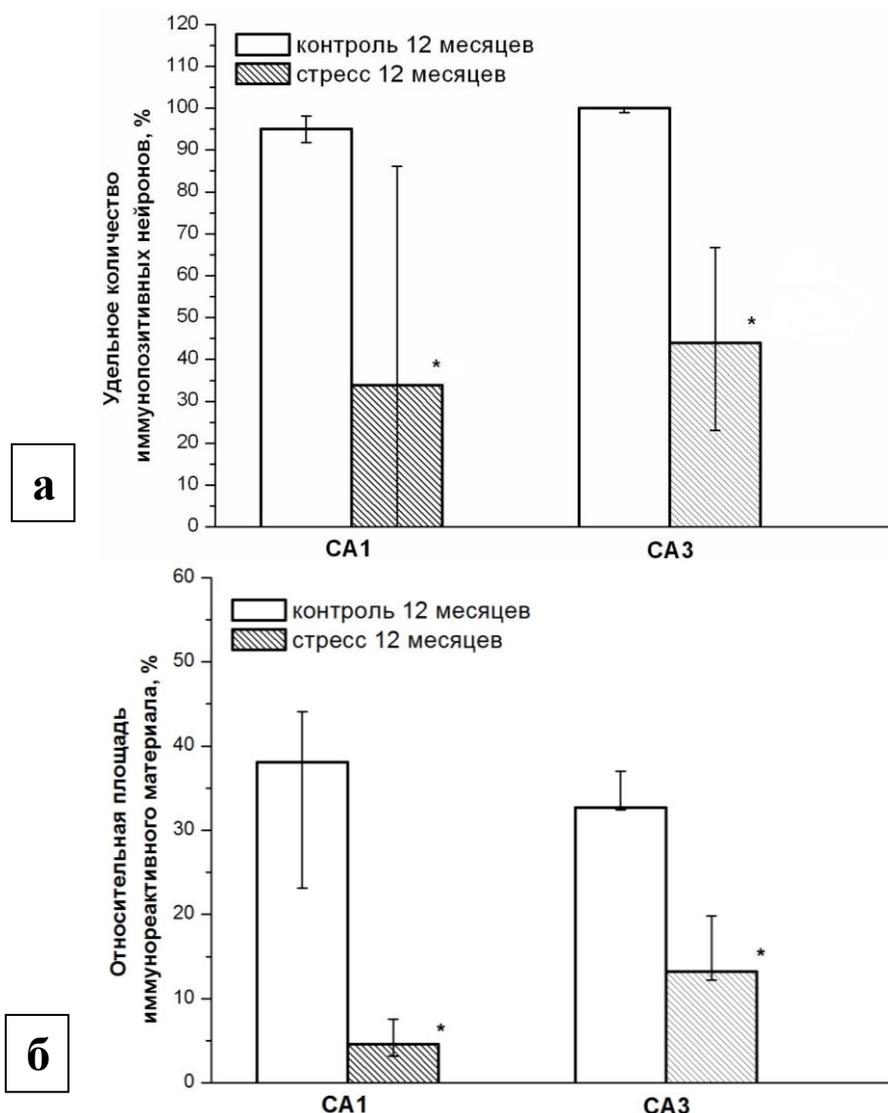


Рисунок 37. Динамика изменения удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (а). Динамика изменения относительной площади eNOS-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, у 12-ти месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа обнаружено снижение степени экспрессии eNOS в нейропиле радиального слоя и практически полное исчезновение в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в эндотелии капилляров различных слоев гиппокампа, в сочетании с уменьшением удельного количества иммунопозитивных нейронов и относительной площади ИРМ, наиболее выраженное в CA1.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии pNOS

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к pNOS различий в характере и степени экспрессии (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии beclin-1

У стрессированных крыс в возрасте 12-ти месяцев в пирамидном слое CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа преобладала слабовыраженная экспрессия beclin-1-ИРМ (1 балл) в перикарионах нейронов, у отдельных животных в цитоплазме извитых сморщенных нейронов и нейронах неизменённой формы наблюдалась умеренно выраженная экспрессия beclin-1 ИРМ (Рисунок 38).

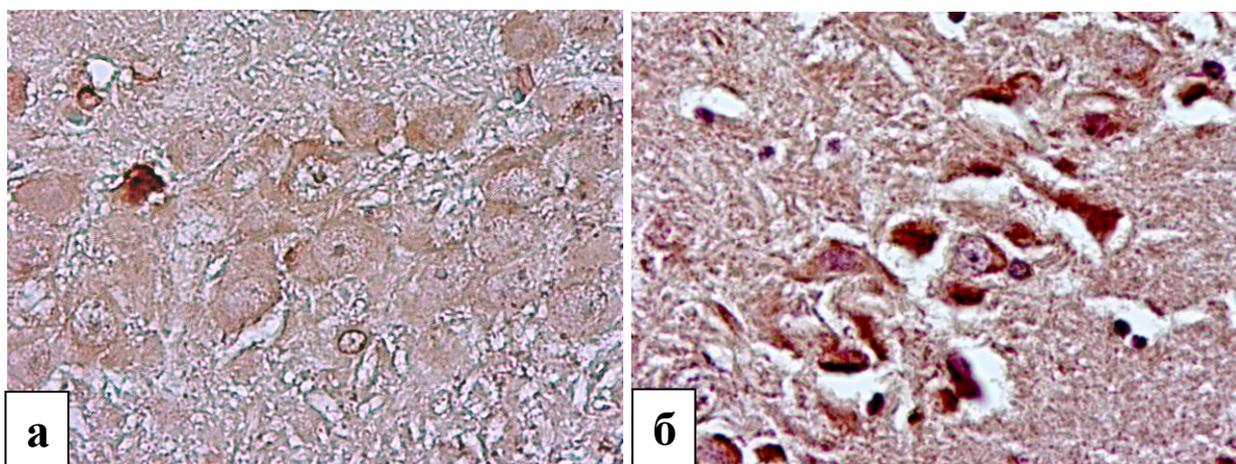


Рисунок 38. Гистологическое строение CA3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная пылевидная степень экспрессии beclin-1-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а). Умеренно выраженная степень экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против beclin-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Отмечалось достоверное увеличение относительной площади becline 1-ИРМ в CA1 дорсального отдела гиппокампа на 3,6 % ($p=0,016$) по сравнению с контрольной группой животных и составило у стрессированных животных 8,6 (6,8-11,9) %. В CA3 достоверных различий не наблюдалось. У контрольной

группы животных данный показатель составил 6,8 (6,6-7,1) %, у животных, подвергнутых комбинированному стрессу 10,6 (7,4-12,4) (Рисунок 39).

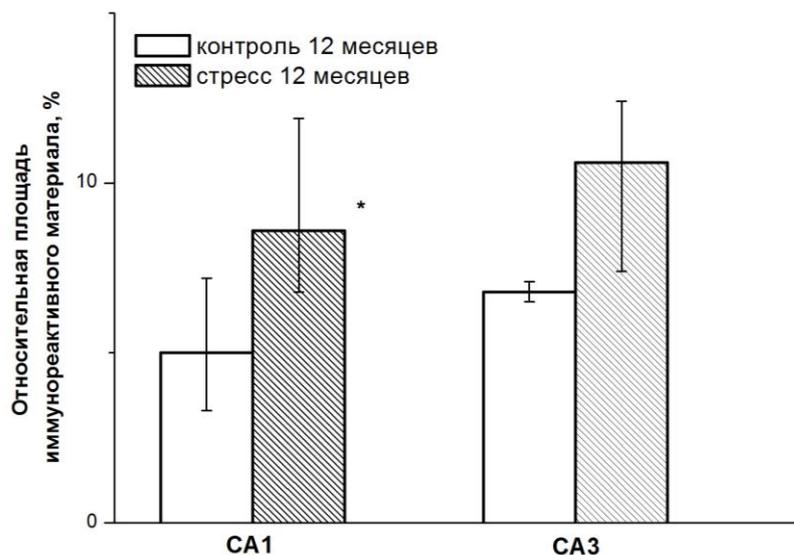


Рисунок 39. Динамика изменения относительной площади beclin-1-иммунореактивного материала в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в CA1 дорсального отдела гиппокампа выявлено увеличение относительной площади beclin-1-ИРМ.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, с использованием антител GFAP наблюдалась выраженная цитоплазматическая экспрессия в астроцитах пирамидного, радиального и молекулярного слоев CA1 и CA3 (3 балла). Однако в отличие от животных контрольной группы GFAP-иммунопозитивные астроциты концентрировались преимущественно в прилегающих к пирамидному, краевом и радиальном слоях и GFAP-ИРМ в отростках астроцитов характеризовался умеренной и выраженной степенью экспрессии (Рисунок 40, рисунок 41). При морфометрическом исследовании CA1 и CA3 было обнаружено достоверное повышение относительной площади ИРМ в дорсальном отделе гиппокампа 12-ти

месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных (Рисунок 41). У 12-ти месячных стрессированных крыс в СА1 относительная площадь GFAP-ИРМ увеличилась на 5,2 % ($p < 0,001$) и составила 16,4 (15,3-19,1) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 20,4 (17,8-27,7) % и увеличилась на 8,9 % ($p < 0,001$).

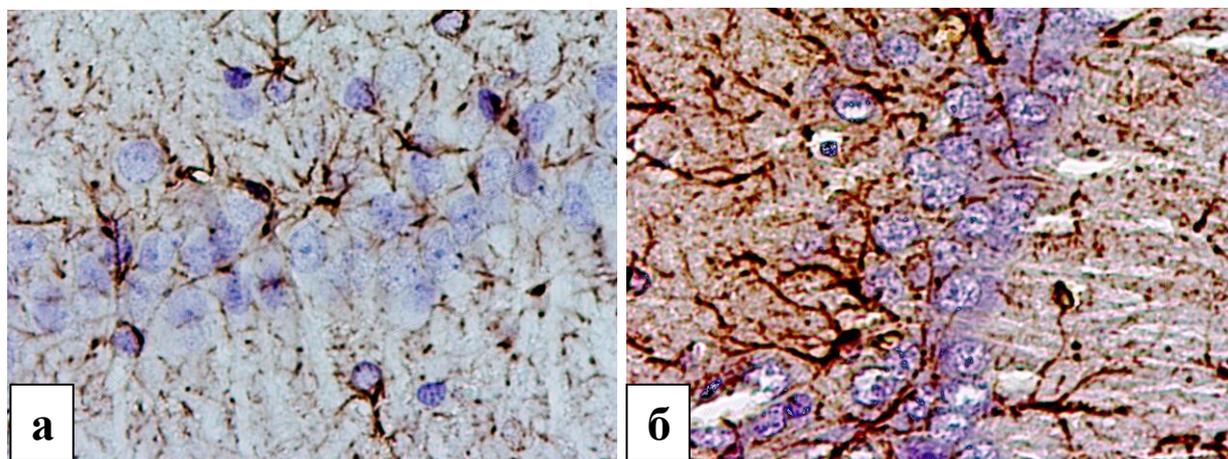


Рисунок 40. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в астроцитах (а, б). Увеличение содержания ИРМ в пирамидном, радиальном и краевом слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

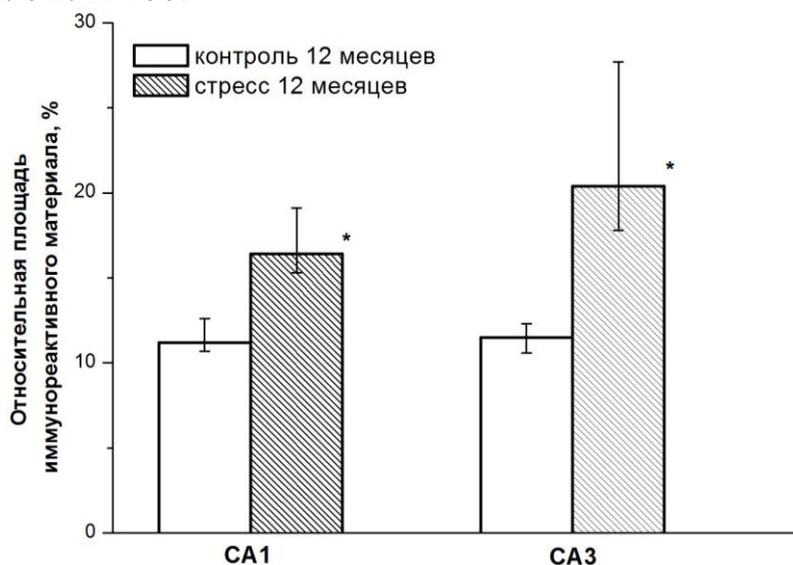


Рисунок 41. Динамика изменения относительной площади GFAP-иммунореактивного материала в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

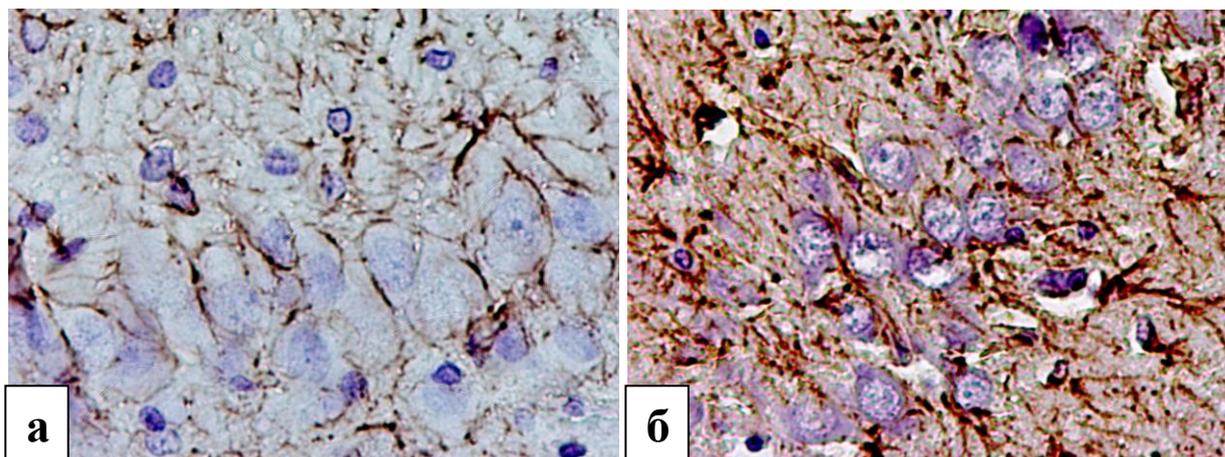


Рисунок 42. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Увеличение содержания ИРМ в пирамидном, радиальном и краевом слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечается прогрессивное увеличение астроцитарной глии, наиболее выраженное в цитоархитектонической области СА3, характеризующиеся увеличением относительной площади GFAP-ИРМ в СА1 и СА3. Установлено, что у стрессированных животных GFAP-иммунопозитивные астроциты концентрируются преимущественно в радиальном и краевом слоях дорсального отдела гиппокампа.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии BDNF

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса с использованием антител против BDNF в цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 отмечается слабовыраженная экспрессия BDNF-ИРМ (1 балл).

В пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных животных преобладали извитые сморщенные нейроны в цитоплазме которых определялась умеренно выраженная экспрессия BDNF-ИРМ (2 балла) (Рисунок

43). Встречались единичные неизменённые нейроны со слабовыраженной цитоплазматической экспрессией BDNF-ИРМ. В астроцитах пирамидного и молекулярного слоёв СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечалась выраженная цитоплазматическая экспрессия BDNF-ИРМ (3 балла). Наблюдалась слабовыраженная экспрессия BDNF-ИРМ (1 балл) в нейропиле пирамидного, молекулярного и радиального слоёв.

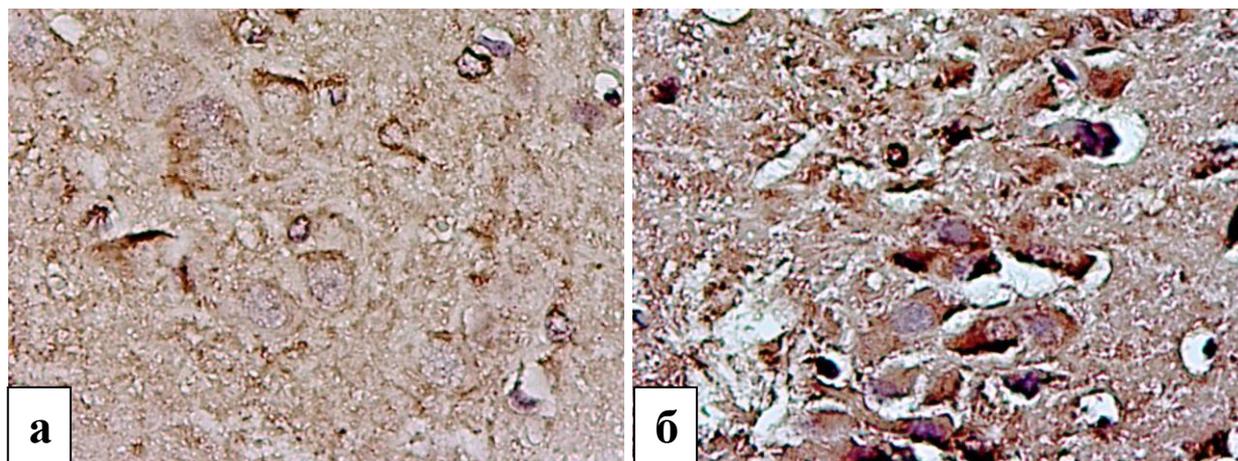


Рисунок 43. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Иммунонегативная реакция BDNF-ИРМ в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя (а). Увеличение степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против BDNF, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, у стрессированных животных в возрасте 12-ти месяцев в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа наблюдается увеличение степени экспрессии BDNF-ИРМ как в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, так и в цитоплазме астроцитов, что, по-видимому, связано как с функциональными особенностями гиппокампа, так и с регион специфической реакцией на стрессоры.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии HSP70

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к белкам теплового шока HSP70 не наблюдалась изменения степени экспрессии (иммунонегативная реакция) ИРМ в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных животных по сравнению с контрольной группой.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

При оценке результатов иммуногистохимического исследования дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител против СР отмечаются различия в локализации ИРМ в СА1. У стрессированных животных ИРМ локализован преимущественно в перикарионах нейронов пирамидного слоя (2 балла). В радиальном слое отмечается слабо выраженная экспрессия ИРМ (1 балл) лишь в единичных дендритах в отличие от контрольной группы животных, у которых в большинстве дендритах наблюдается умеренно выраженная степень экспрессии ИРМ (2 балла) (Рисунок 44).

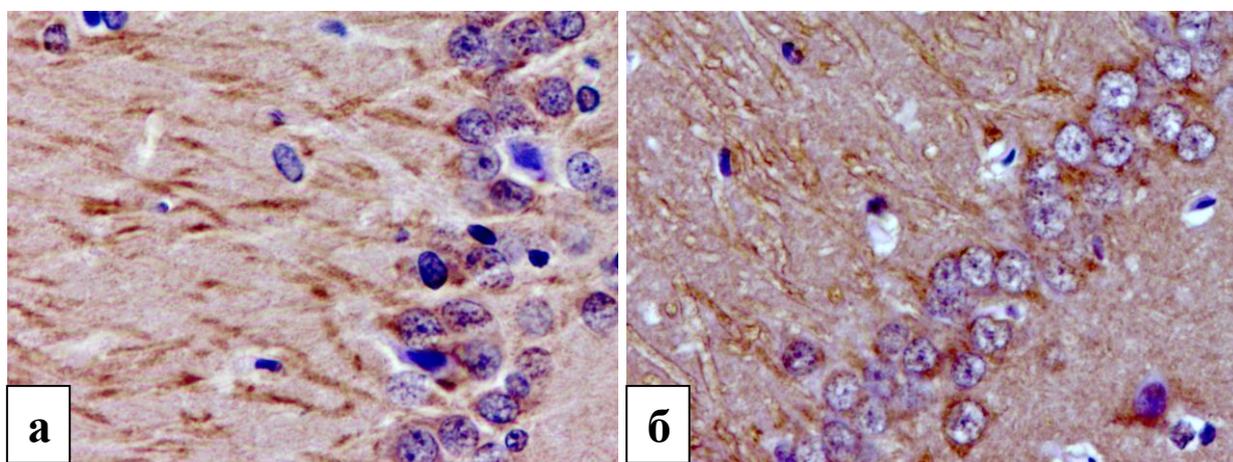


Рисунок 44. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя (а). Уменьшение содержания ИРМ в дендритах радиального слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя и относительной площади ИРМ в СА1 не обнаружено. В группе контрольных животных относительная площадь ИРМ составила 15,4 (11,9-22,8) %, удельное количество иммунопозитивных нейронов 85,9 (80,4-93,8) %, а в группе стрессированных животных – 8 (4,9-20,8) % ($p=0,090$) и 93,1 (66,1-100) % ($p=0,483$), соответственно.

У 12-ти месячных стрессированных животных в СА3 наряду с иммунопозитивными нейронами (2 балла) встречаются нейроны с иммунонегативной реакцией, которые характеризуются сморщиванием перикарионов, базофилией цитоплазмы и овальным гиперхромным ядром. Иммунопозитивные нейроны имели не всегда чётко различимые границы перикарионов. Отмечалось снижение экспрессии ИРМ в дендритах радиального слоя СА3 (1 балл) (Рисунок 45).

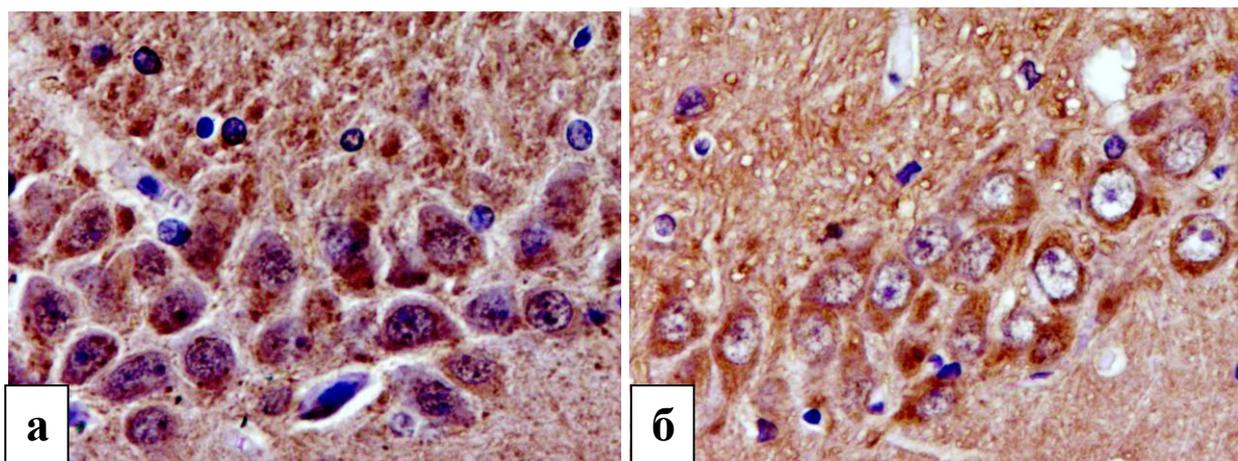


Рисунок 45. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя (а). Уменьшение содержания ИРМ в дендритах радиального слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя и относительной площади ИРМ в СА3 не обнаружено. В группе контрольных животных относительная площадь ИРМ составила 10,1 (9-14) %, удельное количество иммунопозитивных нейронов 96,8 (92,3-100) %, а в группе стрессированных животных – 7,9 (3,4-10,6) % ($p=0,049$) и 88,5 (75-97,9) % ($p=0,066$), соответственно.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев, в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечается перераспределением СР-ИМП, с его преимущественной локализацией в

цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, сопровождающееся снижением степени экспрессии СР в дендритах радиального слоя.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии синаптофизина

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител против СФ в нейропиле пирамидного слоя СА1 и СА3 отмечается умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла) (Рисунок 46).

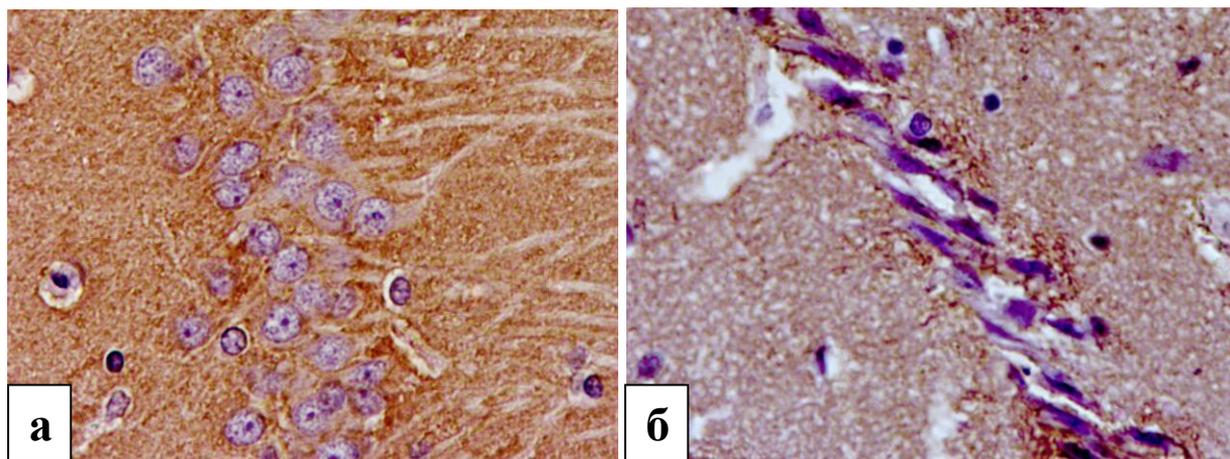


Рисунок 46. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле пирамидного, радиального, краевого слоях (а). Уменьшение содержания ИРМ в нейропиле пирамидного, радиального и краевого слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Однако, в отличие от контрольной группы, у большинства крыс в возрасте 12-ти месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, экспрессия носила неравномерный характер, в виде крупно- и мелкогранулярных вкраплений СФ-ИРМ в пирамидном, радиальном и молекулярном слоях. У некоторых животных в единичных полях зрения наблюдались участки с практически полным отсутствием экспрессии СФ-ИРМ.

При компьютерном морфометрическом анализе обнаружено достоверное снижение относительной площади ИРМ у 12-ти месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа (Рисунок 47).

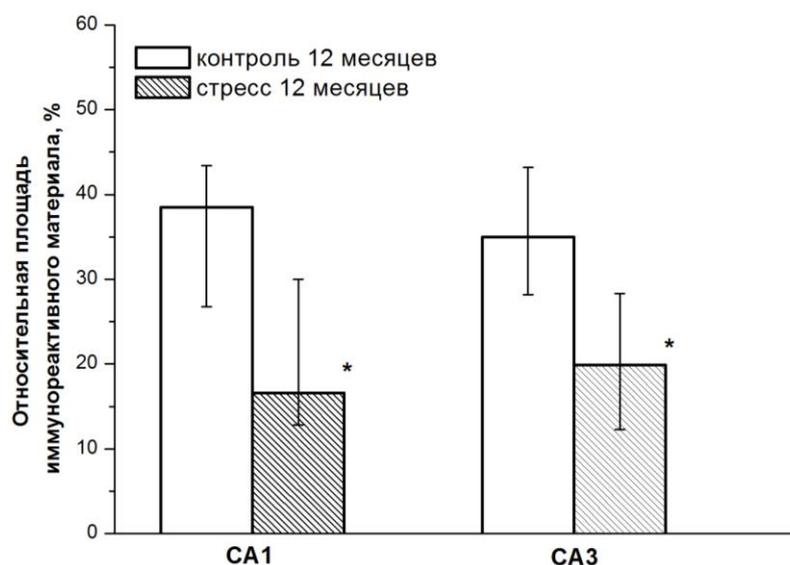


Рисунок 47. Динамика изменения относительной площади синаптофизин-иммунореактивного материала в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

В СА1 относительная площадь СФ-ИРМ уменьшилась на 21,9 % ($p < 0,001$) и составила 16,6 (12,8-30) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 19,9 (12,3-28,3) % и уменьшилась на 15,1 % ($p < 0,001$) (Рисунок 47).

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа обнаружено уменьшение относительной площади СФ-ИРМ.

3.2.3. Патоморфологическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев при моделировании комбинированного стресса

При нейрогистологическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных животных не было обнаружено существенных различий в строении цитоархитектонических областей СА1 и СА3 по сравнению с дорсальным отделом гиппокампа. Однако в ходе проведения морфометрического исследования только в СА1 было выявлено достоверное увеличение удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы на 17 % ($p < 0,001$), по сравнению с контрольной группой и составило 4,9 (3,1-15,1) % у контрольных животных и 21,9 (12,3-54,7) % - у стрессированных животных. В

CA3 не было обнаружено различий в изменении данного параметра. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 14,2 (4,8-34,9) % у контрольных крыс и 14,7 (6,6-43,3) % - у стрессированных животных. Также не наблюдалось достоверных различий в ширине пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа между исследуемыми группами животных. В пирамидном слое CA1 и CA3 нейроны располагались в 3-6 слоев. Ширина пирамидного слоя у контрольных животных составила 48,9 (44,6-61,2) мкм в CA1 и 58,6 (50,4-73,8) мкм в CA3, у стрессированных крыс в CA1 – 51,7 (44,4-62,4) мкм, в CA3 – 61,2 (54,4-68,9) мкм. Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое CA1 вентрального отдела гиппокампа продемонстрировала уменьшение средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов и увеличение ядерно-цитоплазматического отношения у 12-ти месячных стрессированных крыс по сравнению с контрольными животными ($p < 0,001$) (Таблица 6).

В CA3 отмечалось уменьшение средней площади перикарионов ($p < 0,001$), средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p < 0,001$), относительной площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p = 0,010$), увеличение ядерно-цитоплазматического отношения ($p < 0,001$) у 12-ти месячных стрессированных крыс по сравнению с контрольными животными (Таблица 6). Достоверных различий в средней площади перикарионов нейронов и относительных морфометрических параметрах в CA1, а также отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю и средней площади ядер нейронов в CA1 и CA3 между группами обнаружено не было (Таблица 6).

Таблица 6 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя вентрального отдела гиппокампа крыс, Ме (Q₁-Q₂)

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 12-ти месяцев
CA1	Площадь ядер нейронов, мкм ²	48,9 (37,7-62)	51 (38,7-63,2)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	105,5 (84,9-132,1)	100,4 (83-118,9)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	55,8 (44-71,3)	48* (37,7-60,4)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	18,4 (15,5-21,1)	19,9 (14,2-26)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	39,6 (35,1-44,9)	41,1 (30,2-46,8)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов, % нейронов	21,3 (19,1-24,2)	19,4 (15,3-22,9)
	Относительная площадь нейропиля, %	60,4 (55,1-64,9)	58,9 (53,2-69,8)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,9 (0,7-1)	1* (0,7-1,3)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,5-0,8)	0,7 (0,4-0,9)

Продолжение таблицы 6

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 12-ти месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 12-ти месяцев
CA3	Площадь ядер нейронов, мкм ²	67,1 (50,1-82,5)	60,9 (33,6-82,6)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	158,8 (130,4-190)	132,8* (89,8-166,7)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	88,7 (74,2-111,9)	66,8* (50,5-83,7)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	15,5 (13,9- 18,1)	18,4 (14,6-20,5)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	38,2 (33,3-43,6)	35,4 (31,3-42,5)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	22,1 (19,9-25,2)	18,6* (15,9-23)
	Относительная площадь нейропиля, %	61,8 (56,4-66,7)	64,6 (57,5-68,7)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,7 (0,6-0,9)	0,8* (0,6-1,1)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,6 (0,5-0,8)	0,5 (0,5-0,7)
* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).			

Таким образом, в отличие от дорсального отдела гиппокампа, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в

вентральном отделе наиболее уязвимой цитоархитектонической областью является СА1, что выражается увеличением на 17 % в пирамидном слое удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы.

3.2.4. Иммуногистохимическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса

Иммуногистохимическое исследование экспрессии caspase-3

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител к caspase-3 в цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 как и в контрольной группе животных отмечалась иммунонегативная реакция. В единичных полях зрения пирамидного слоя СА1 и СА3 встречались нейроны со слабовыраженной гранулярной цитоплазматической экспрессией в перикарионах. При этом достоверно значимых различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 между контрольными и стрессированными животными обнаружено не было.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса, у крыс в возрасте 12-ти месяцев в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа, нами не было выявлено различий в характере и степени экспрессии caspase-3, по сравнению с контрольной группой животных.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител против iNOS в СА1 и СА3 экспрессия ИРМ носила схожий характер со степенью экспрессии и распределением iNOS-ИРМ в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа. Увеличивалось количество нейронов с выраженной и умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (Рисунок 48, рисунок 50).

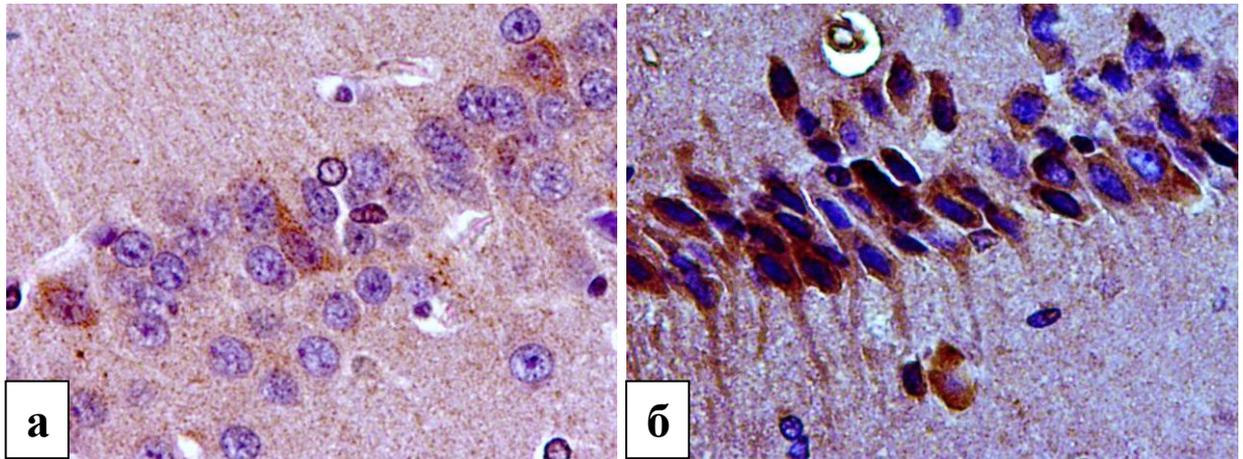


Рисунок 48. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя и в нейропиле радиального слоя (а). Увеличение содержания ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При проведении морфометрического исследования отмечалось увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА1 на 39 %, по сравнению с контрольной группой 12-ти месячных животных, достигающее 86,1 (69,5-100) % ($p < 0,001$) (Рисунок 49). Были обнаружены достоверные различия в изменении относительной площади iNOS-ИРМ в СА1 вентрального отдела гиппокампа между контрольными и стрессированными животными ($p < 0,001$). Относительная площадь ИРМ в СА1 у контрольной группы животных составила 12,8 (10,7-15) %, у 12-ти месячных стрессированных крыс – 29,8 (20,5-34,9) % (Рисунок 49).

Обнаружено увеличение удельного количества иммунопозитивных нейронов в пирамидном слое СА3 на 54,3 % ($p < 0,001$), которое составило 100 (82,4-100) %. Относительная площадь ИРМ в СА3 гиппокампа у стрессированных крыс увеличилась на 11,5 % ($p < 0,001$), что составило 34,5 (23,8-36,7) % (Рисунок 49).

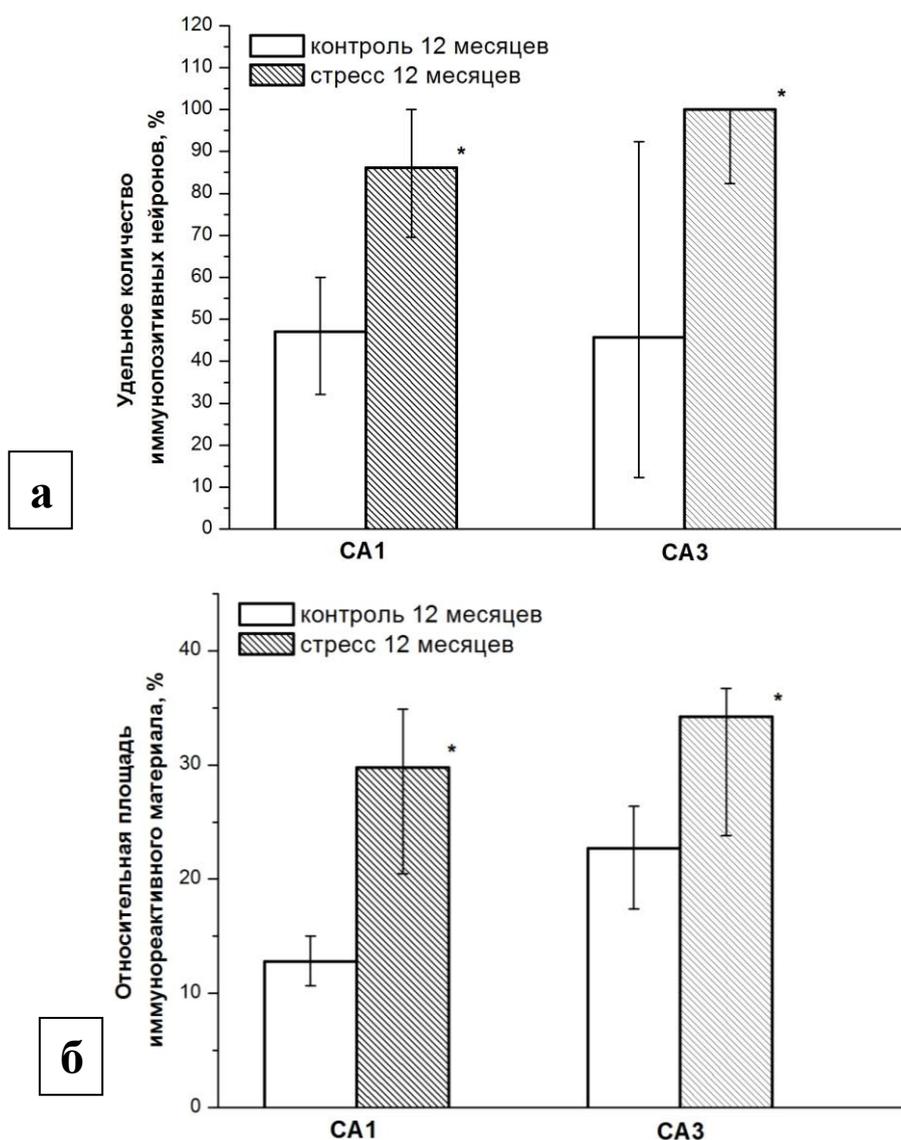


Рисунок 49. Динамика изменения удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (а). Динамика изменения относительной площади iNOS-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

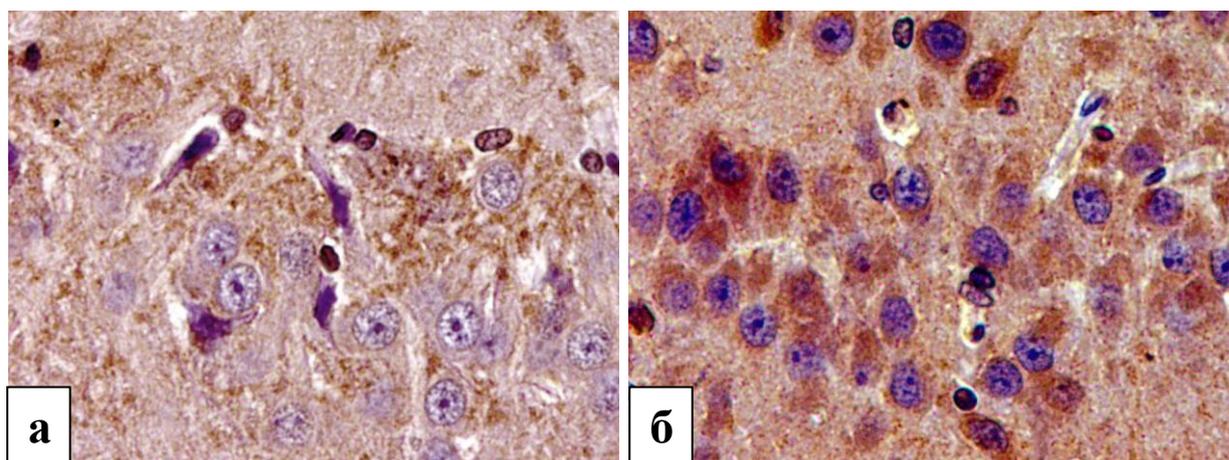


Рисунок 50. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле радиального слоя (а). Увеличение содержания ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у 12-ти месячных животных в пирамидном слое СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа выявлено увеличение степени цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов, в сочетании с увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя и увеличением относительной площади ИРМ. При этом в вентральном отделе гиппокампа изменения экспрессии биомаркера iNOS у стрессированных животных наиболее выражены, по сравнению с дорсальным.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS

При изучении СА1 вентрального отдела гиппокампа с использованием антител против eNOS у 12-ти месячных крыс, подвергнутых комбинированному стрессу, в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя отмечается умеренно выраженная экспрессия ИРМ (2 балла). В СА1, в отличие от контрольной группы животных встречаются поля зрения, характеризующиеся сморщиванием перикарионов, цитоплазма таких нейронов приобретает выраженную степень экспрессии eNOS, а в дендритах радиального слоя наблюдается слабая и умеренная степень экспрессии ИРМ (Рисунок 51).

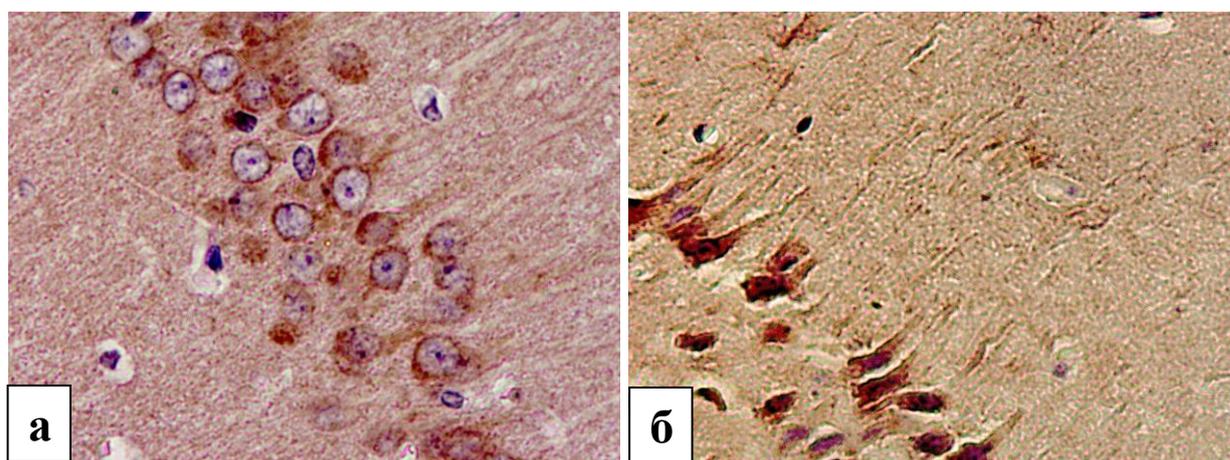


Рисунок 51. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме нейронов пирамидного слоя (а). Выраженная степень экспрессии в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В ходе проведения морфометрического исследования в СА1 не было обнаружено достоверных различий удельного количества иммунопозитивных нейронов и относительной площади ИРМ между 12-ти месячными контрольными и стрессированными животными. У контрольных и стрессированных животных в СА1 удельное количество иммунопозитивных нейронов составило 100 %. Относительная площадь eNOS-ИРМ в СА1 составила 11,4 (9,8-15) % - у контрольной группы животных и 12,5 (11,2-15,3) % у животных, подвергнутых комбинированному стрессу. В эндотелии большинства капилляров преобладала слабовыраженная экспрессия eNOS-ИРМ (1 балл).

При оценке результатов иммуногистохимического исследования СА3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител к eNOS не было обнаружено существенных различий в характере и степени экспрессии ИРМ, по сравнению с контрольной группой.

Удельное количество иммунопозитивных нейронов в СА3 составило 100 % у исследуемых групп животных. Также не было обнаружено достоверных различий в относительной площади ИРМ между группами. У контрольной группы животных относительная площадь eNOS-ИРМ в СА3 составила 13,9 (11,5-

17,1) %, у стрессированных животных – 14,9 (14,4-16,4) %. В эндотелии большинства капилляров преобладала слабовыраженная экспрессия eNOS-ИРМ.

Таким образом, у 12-ти месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа обнаружено снижение степени экспрессии eNOS только в эндотелии капилляров различных слоев гиппокампа.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии nNOS

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к nNOS различий в характере и степени экспрессии ИРМ (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии beclin- 1

У стрессированных крыс в возрасте 12-ти месяцев в пирамидном слое СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа преобладала умеренно выраженная гранулярная экспрессия beclin-1-ИРМ (2 балла) в перикарионах нейронов (Рисунок 52).

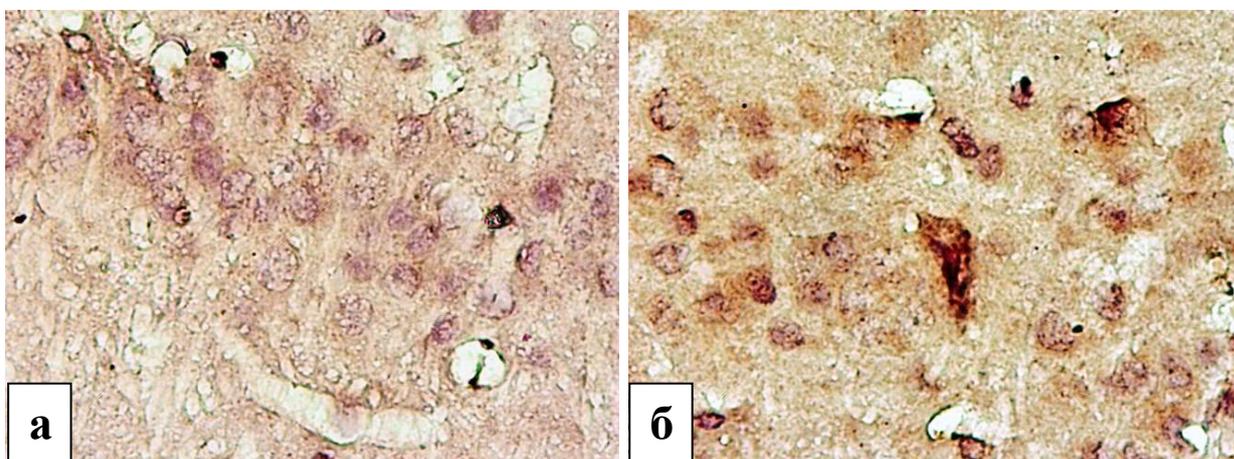


Рисунок 52. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабо выраженная цитоплазматическая экспрессия becline-1-ИРМ (а). Увеличение степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против beclin-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Значимых различий в изменении относительной площади beclin-1-ИРМ в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа по сравнению с контрольной группой животных обнаружено не было. У контрольной группы животных данный показатель в СА1 составил 4,6 (3,5-5,1) %, в СА3 – 2,5 (1,5-4,7), у животных, подвергнутых комбинированному стрессу в СА1 - 9,1 (6,2-12,7) %, в СА3 - 10 (8,1-15,5) %.

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа выявлено увеличение степени экспрессии beclin-1-ИРМ.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12-ти месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, с использованием антител к GFAP существенных различий в степени и характере распределения ИРМ в СА1 и СА3 в сравнении с дорсальным отделом гиппокампа стрессированных крыс выявлено не было (Рисунок 53).

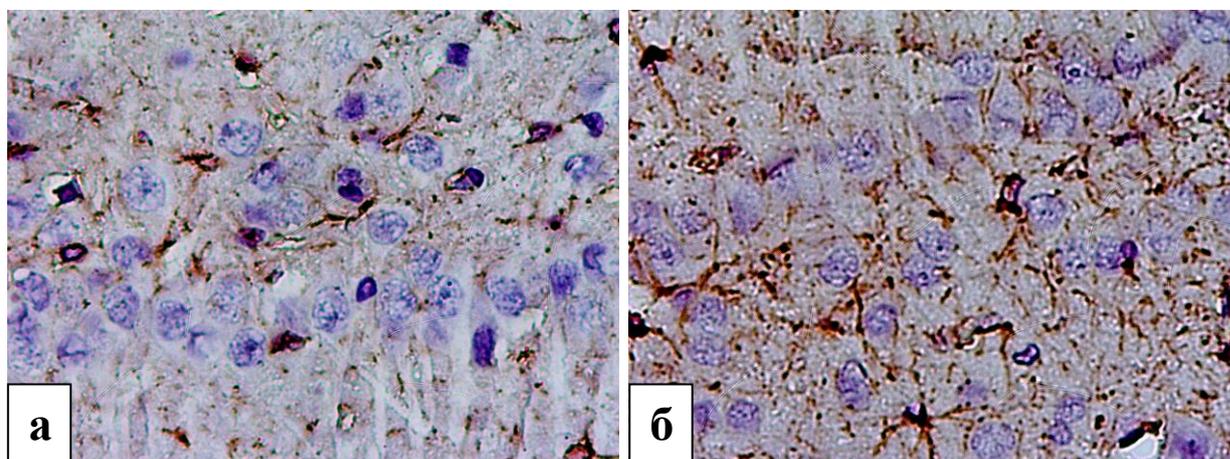


Рисунок 53. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в астроцитах (а, б). Увеличение содержания ИРМ в пирамидном, радиальном и краевом слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При морфометрическом исследовании CA1 и CA3 было обнаружено достоверное повышение относительной площади ИРМ в вентральном отделе гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных (Рисунок 54). У 12-ти месячных стрессированных крыс в CA1 относительная площадь GFAP-ИРМ увеличилась на 5,1 % ($p < 0,001$) и составила 12,7 (10,3-14,6) %. В CA3 относительная площадь ИРМ составила 11,8 (10,9-15) % и увеличилась на 2,6 % ($p < 0,001$).

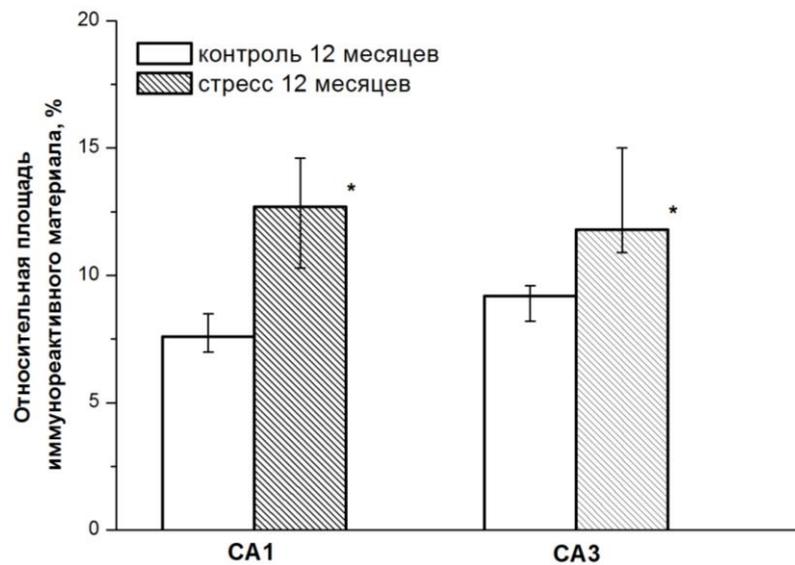


Рисунок 54. Динамика изменения относительной площади GFAP-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа отмечаются прогрессивные реакции астроцитарной глиии, наиболее выраженные в цитоархитектонической области CA1, характеризующиеся увеличением относительной площади GFAP-ИРМ в CA1 и CA3. Установлено, что у 12-ти месячных стрессированных животных регион специфические реакции астроцитарной глиии носили однонаправленный характер.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии BDNF

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа в СА1 и СА3 у 12-ти месячных крыс, подвергнутых комбинированному стрессу, не было обнаружено различий в степени и характере распределения BDNF-ИРМ, по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев, в вентральном отделе гиппокампа не было обнаружено существенных различий в степени и характере распределения BDNF-ИРМ, как в цитоплазме перикарионов нейронов, так и в цитоплазме астроцитов СА1 и СА3. При этом в дорсальном отделе гиппокампа стрессированных животных наблюдалось увеличение степени экспрессии BDNF-ИРМ, как в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя, так и в глиоцитах.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии HSP70

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа в СА1 и СА3 у 12-ти месячных стрессированных крыс не было обнаружено различий в степени и характере распределения ИРМ, по сравнению с СА1 и СА3 контрольной группы животных.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител против СР различий в локализации и степени экспрессии ИРМ в СА1, по сравнению с контрольной группой животных обнаружено не было. Удельное количество иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 составило 100 %. При компьютерном морфометрическом анализе достоверного изменения относительной площади ИРМ у 12-ти месячных стрессированных крыс, по сравнению с животными контрольной группы не наблюдалось ($p=0,034$) (Рисунок 55).

У 12-ти месячных стрессированных животных в СА3 вентрального гиппокампа особенностей экспрессии, по сравнению с СА3 дорсального отдела

гиппокампа выявлено не было (Рисунок 56). Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 не обнаружено. Однако отмечается снижение относительной площади ИРМ в СА3 на 8,1 % ($p < 0,001$) и составляет у стрессированных животных 19,1 (17,3-20,7) % (Рисунок 55).

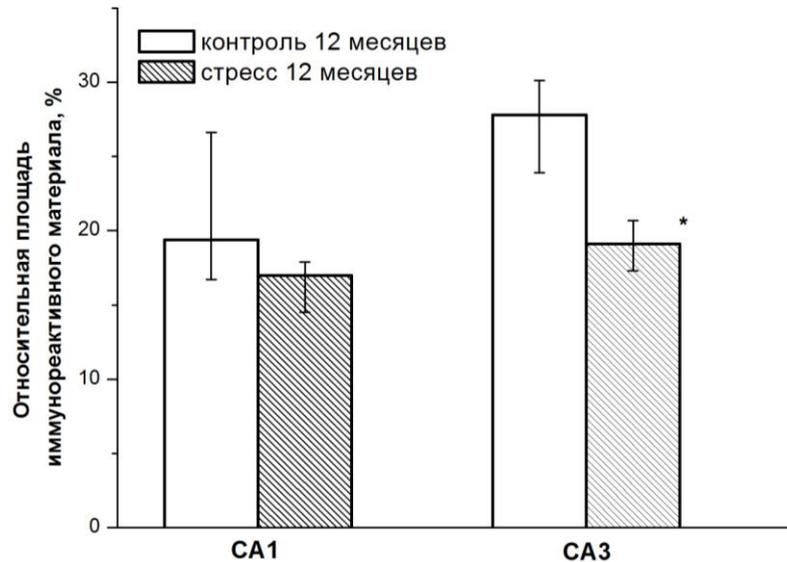


Рисунок 55. Динамика изменения относительной площади SR-иммунореактивного материала пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

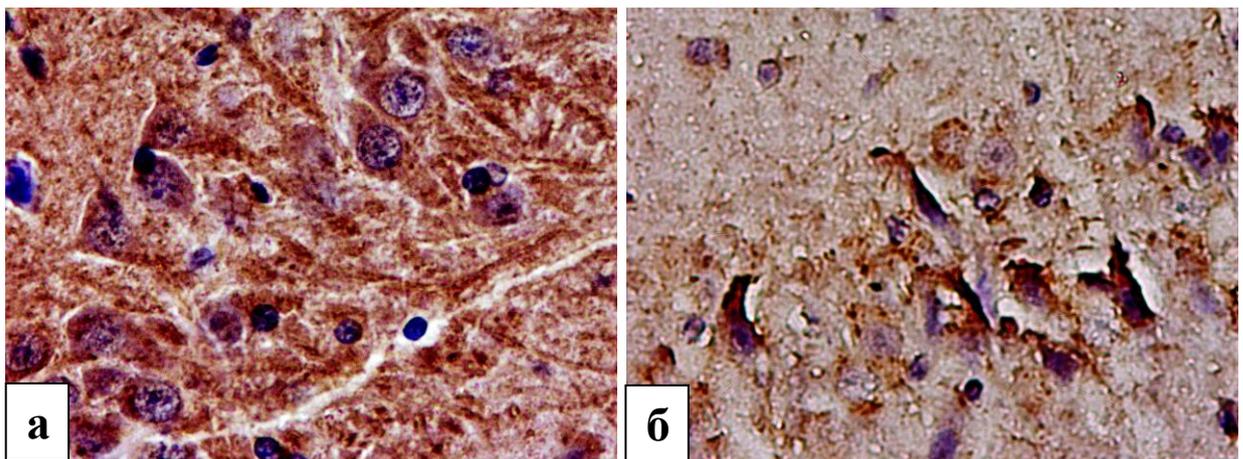


Рисунок 56. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя (а). Уменьшение содержания ИРМ в дендритах радиального слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев, в вентральном отделе гиппокампа отмечается снижение относительной площади СР-ИРМ в СА3, перераспределение ИРМ с преимущественной его локализацией в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя в СА1 и СА3, а также снижение степени экспрессии СР в дендритах радиального слоя только в СА3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии синаптофизина

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных стрессированных крыс с использованием антител против СФ сохраняется умеренно выраженное гранулярное распределение ИРМ по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв СА1 и СА3. Однако в отличие от контрольной группы животных ИРМ располагался более разрозненно (Рисунок 57, рисунок 58).

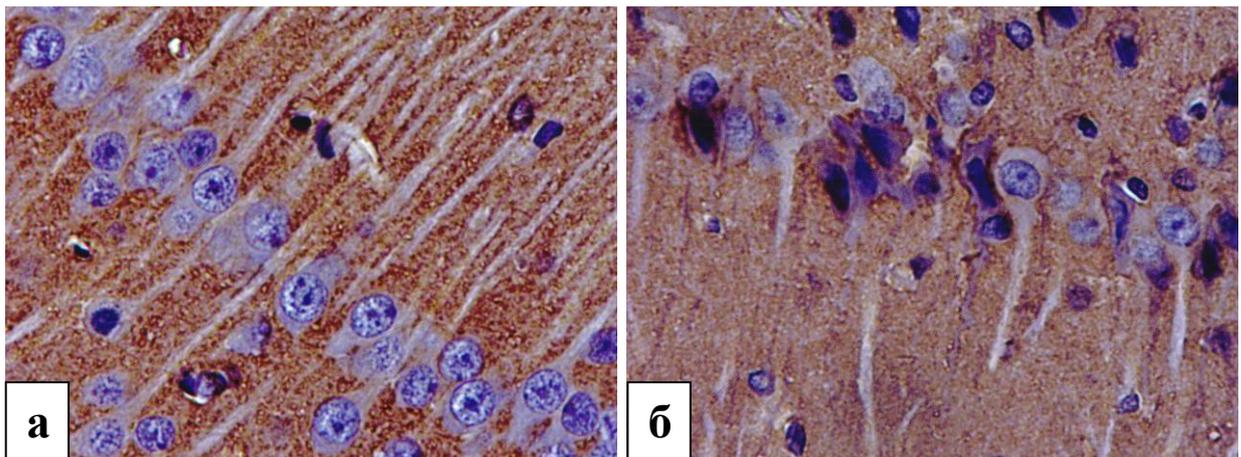


Рисунок 57. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв (а). Уменьшение содержания ИРМ в нейроне пирамидного, радиального и краевого слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

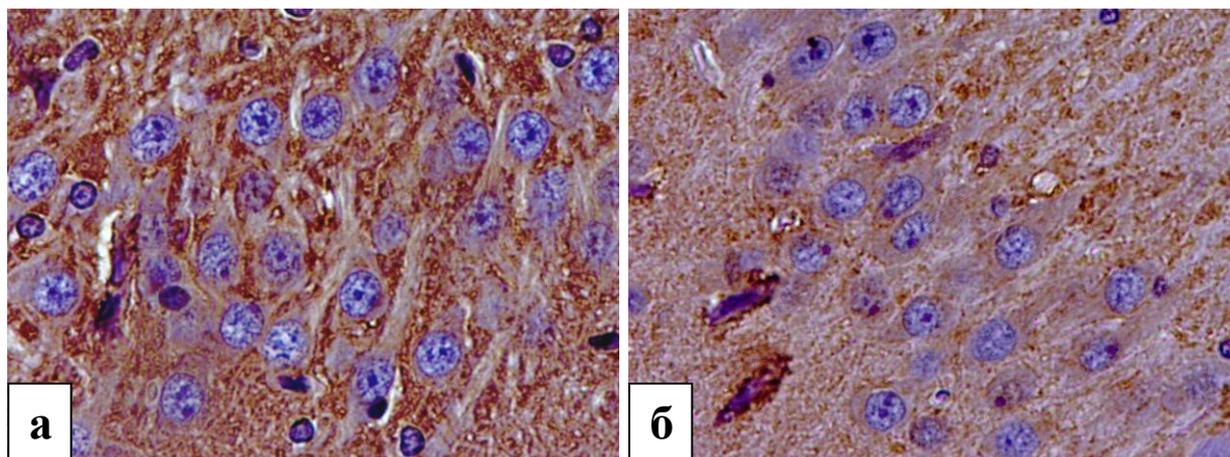


Рисунок 58. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12-ти месяцев (а) и крысы в возрасте 12-ти месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия по поверхности дендритов пирамидного и радиального слоёв (а). Уменьшение содержания ИРМ в нейропиле пирамидного, радиального и краевого слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В цитоплазме большинства перикарионов нейронов пирамидного слоя наблюдается иммунонегативная реакция. В СА1 встречались поля зрения, содержащие сморщенные нейроны в цитоплазме которых отмечалась умеренно выраженная гранулярная экспрессия СФ-ИРМ и поля зрения характеризующиеся равномерным распределением ИРМ в радиальном слое.

При компьютерном морфометрическом анализе обнаружено достоверное снижение относительной площади ИРМ у 12-ти месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных (Рисунок 58) в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа (Рисунок 59).

В СА1 относительная площадь СФ-ИРМ уменьшилась на 18,1 % ($p < 0,001$) и составила 17,5 (14,7-22,9) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 14,7 (12,3-28,3) % и уменьшилась на 19 % ($p < 0,001$) (Рисунок 59).

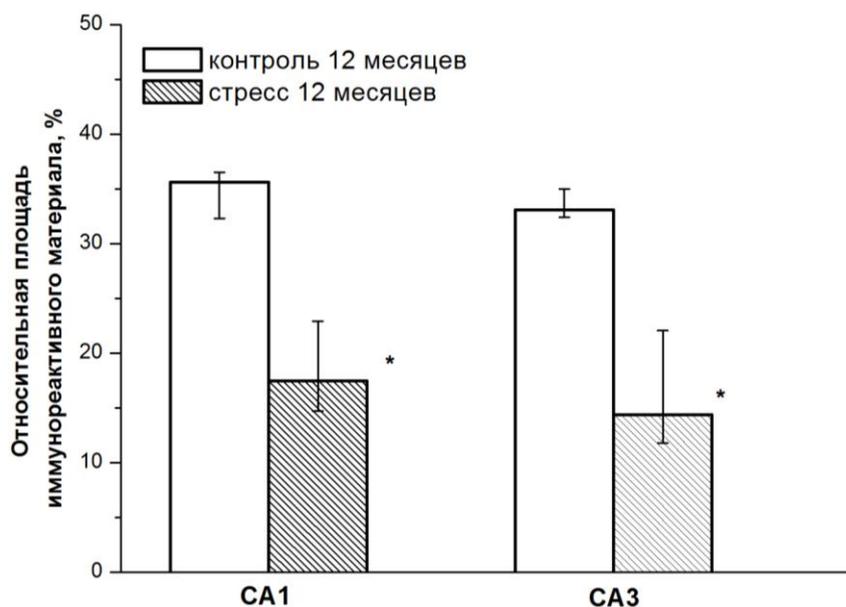


Рисунок 59. Динамика изменения относительной площади синаптофизин-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 12-ти месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, у крыс в возрасте 12-ти месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса в CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа, как и в дорсальном отделе, обнаружено уменьшение относительной площади СФ-ИРМ.

3.3. Морфофункциональные изменения гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса

3.3.1. Патоморфологическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса

При исследовании микропрепаратов, окрашенных тионином по методу Ниссля, у крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых комбинированному стрессу, не наблюдалось существенных различий в строении пирамидного слоя CA1 (Рисунок 60) и CA3 дорсального отдела гиппокампа, по сравнению с контрольной группой животных.

Достоверных различий в изменении удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в пирамидном слое CA1 и CA3

дорсального отдела гиппокампа между контрольной и стрессированной группой животных обнаружено не было. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы у 24-х месячных контрольных крыс в СА1 составило 7,1 (3,7-15) %, в СА3 – 29,6 (17-41,5) %. У стрессированных 24-х месячных крыс данный показатель в СА1 составил 9,1 (2,8-29,7) %, в СА3 – 16,2 (9,3-64) %.

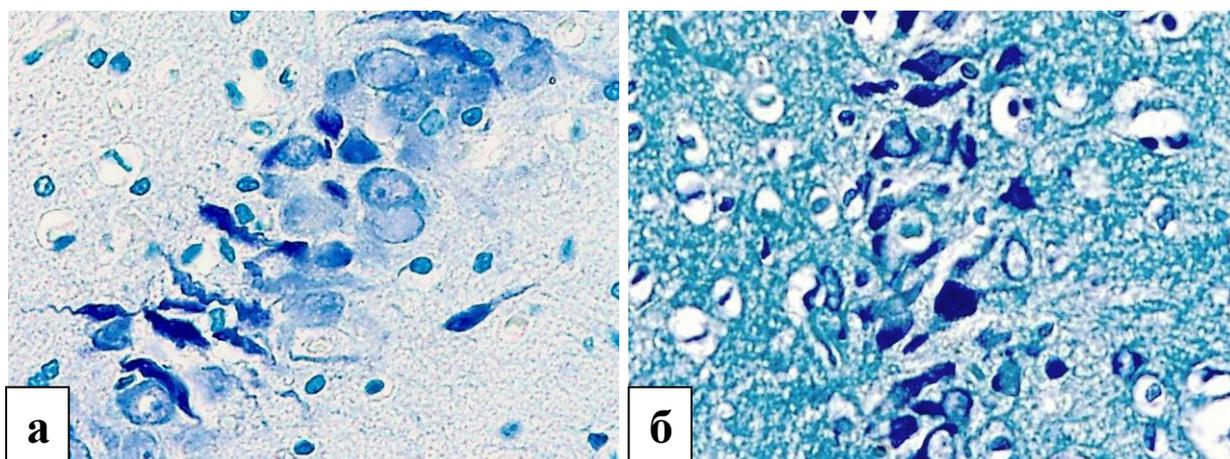


Рисунок 60. Гистологическое строение пирамидного слоя СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Наличие в пирамидном слое сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы (а, б). Окраска тионином по методу Ниссля. Ув. X 400.

Также не наблюдалось достоверных различий в ширине пирамидного слоя СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа между исследуемыми группами животных. В пирамидном слое СА1 нейроны располагались в 2-3 слоя, в СА3 – в 2-5 слоёв. Ширина пирамидного слоя у контрольных животных составила 33,4 (30-39,1) мкм в СА1 и 54 (42,8-65,6) мкм в СА3, у стрессированных крыс в СА1 – 33,3 (29,5-36,3) мкм, в СА3 – 50,6 (39,2-61,5) мкм.

Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа продемонстрировала уменьшение средней площади ядер, средней площади перикарионов и средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов у 24-х месячных стрессированных крыс по сравнению с контрольными животными ($p < 0,001$) (Таблица 7).

Таблица 7 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя дорсального отдела гиппокампа крыс, Me (Q₁-Q₂)

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 24-х месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 24-х месяцев
CA1	Площадь ядер нейронов, мкм ²	61,4 (50,3-73,6)	50* (33,9-65)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	126,9 (106,4-151,9)	102,6* (81,9-130,5)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	63,1 (50,6-81)	52,9* (40,8-65,3)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	20,7 (16,1-24,1)	20,2 (15,4-23,1)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	43,6 (36,9-47,4)	42,4 (33,4-48,4)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	22,1 (19,9-24,2)	22,1 (18,2-25,1)
	Относительная площадь нейропиля, %	56,4 (52,6-63,1)	57,6 (51,6-66,6)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,9 (0,7-1,1)	0,9 (0,7-1,2)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,8 (0,6-0,9)	0,7 (0,5-0,9)
CA3	Площадь ядер нейронов, мкм ²	65,1 (44,6-83,5)	60,7 (40,7-82,3)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	154,2 (111,2-193,6)	142,3* (98,4-183,1)

Продолжение таблицы 7

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 24-х месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 24-х месяцев
CA3	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	86,2 (63,4-109,8)	74,6* (52,2-103,7)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	16,9 (14,8-19,8)	14,8 (12,5-19,6)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	41,9 (35,2-46,7)	36,5* (28-44,1)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	23,1 (19,5-27,2)	19,9* (15,7-23,9)
	Относительная площадь нейропиля, %	58,1 (53,3-64,8)	63,5* (56-72,1)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,7 (0,6-0,9)	0,8* (0,6-1,1)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,7 (0,5-0,9)	0,6* (0,4-0,8)
* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).			

Достоверных различий относительных морфометрических параметров, ядерно-цитоплазматического отношения и отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю в CA1 между группами обнаружено не было (Таблица 7).

Морфометрическая оценка абсолютных показателей в пирамидном слое CA3 дорсального отдела гиппокампа продемонстрировала снижение средней

площади перикарионов ($p=0,001$) и цитоплазмы перикарионов нейронов ($p<0,001$) у 24-х месячных стрессированных крыс по сравнению с животными контрольной группы (Таблица 7). Достоверные различия обнаруживались в снижении относительных площадей перикарионов ($p=0,004$), цитоплазмы перикарионов нейронов ($p=0,010$), увеличении относительной площади нейропиля ($p=0,009$) в пирамидном слое СА3 у животных 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса по сравнению с контролем (Таблица 7). Также у стрессированных крыс отмечалось увеличение ядерно-цитоплазматического отношения ($p<0,001$) и снижение отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропилю ($p=0,009$) (Таблица 7).

Таким образом, при длительном комбинированном стрессовом воздействии у крыс в возрасте 24-х месяцев в дорсальном отделе гиппокампа обнаружены признаки атрофических изменений нейронов пирамидного слоя, наиболее выраженные в СА3 и выражающиеся в уменьшении средней площади ядер в СА3, средней площади перикарионов нейронов, средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов как в СА1, так и СА3, а также в уменьшении относительной площади перикарионов нейронов, относительной площади цитоплазмы перикарионов нейронов, отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропилю и в повышении относительной площади нейропиля и ядерно-цитоплазматического отношения.

3.3.2. Иммуногистохимическая характеристика дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса

Иммуногистохимическое исследование экспрессии caspase-3

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс с использованием антител против caspase-3 в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя СА1 отмечалась иммунонегативная реакция. Наряду с нейронами, в которых отсутствовала экспрессия, обнаруживались нейроны неизменной формы с мелкогранулярной

слабо- и умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией caspase-3-ИРМ (Рисунок 61).

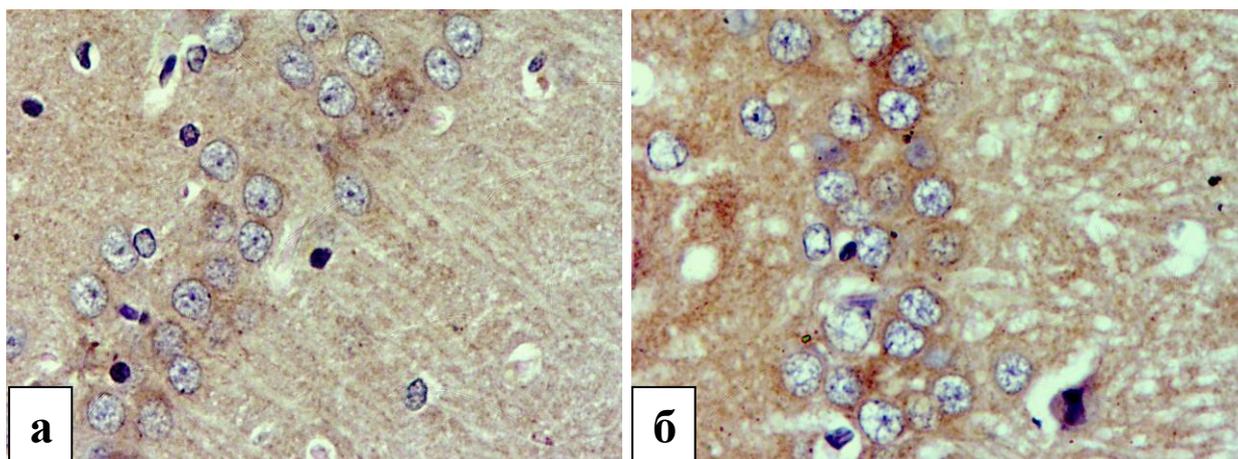


Рисунок 61. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Мелкогранулярная слабо- и умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против caspase-3, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Достоверных различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1, по сравнению с животными контрольной группы обнаружено не было ($p=0,088$). У контрольных животных данный показатель составил 35,5 (7,1-40,9) %, у стрессированных – 18,2 (5-24) %.

Как и в контрольной группе животных, в цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа стрессированных 24-х месячных крыс преобладала умеренно выраженная экспрессия caspase-3-ИРМ (2 балла). Также встречались нейроны со слабовыраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ. ИРМ локализовался как в нейронах со сморщиванием перикарионов, так и в нейронах неизменной формы. Встречались единичные сморщенные нейроны, цитоплазма которых, характеризовалась иммунонегативной реакцией.

Достоверных различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА3, по сравнению с животными контрольной

группы обнаружено не было ($p=0,314$). У контрольных животных данный показатель составил 22,2 (14,8-30) %, у стрессированных – 16,7 (6,5-30) %.

Необходимо отметить, что в отдельных глиоцитах пирамидного, молекулярного и радиального слоев СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа экспрессия носила выраженный характер.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса, у крыс в возрасте 24-х месяцев в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, не было выявлено изменения удельного количества caspase-3 иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя, по сравнению с контрольной группой животных.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

В пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс обнаруживались нейроны с гранулярной умеренно выраженной степенью экспрессии (2 балла) iNOS-ИРМ в цитоплазме и единичные нейроны с максимально выраженным окрашиванием ИРМ, по сравнению с контрольной группой животной (1 балл) (Рисунок 62).

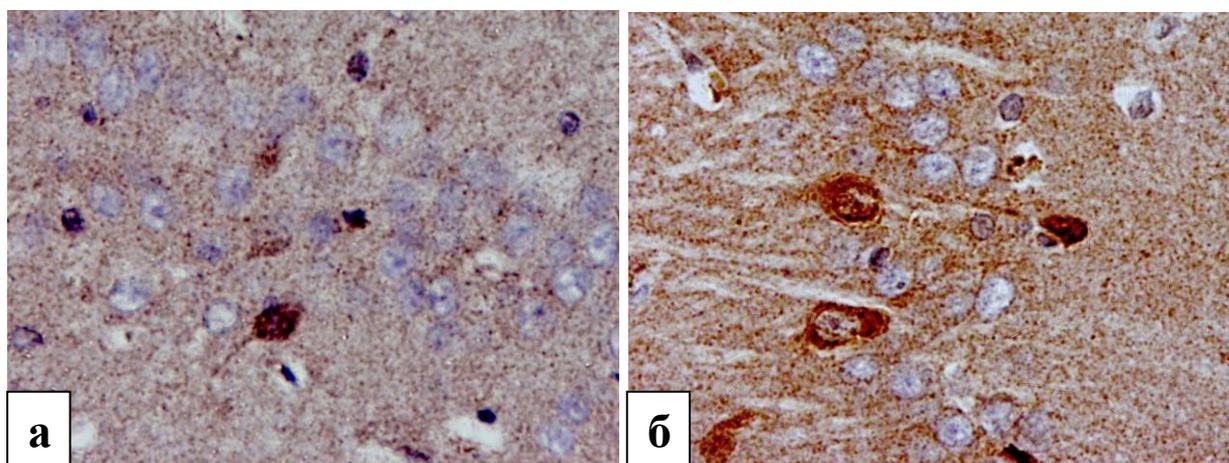


Рисунок 62. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя (а). Увеличение содержания ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При проведении морфометрического исследования у 24-х месячных животных, подвергнутых комбинированному стрессу обнаружено увеличение

удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 на 90,7 % ($p < 0,001$). У контрольных крыс данный показатель составляет 9,3 (6,3-16,7) %, у стрессированных – 100 (69,2-100) % (Рисунок 64). Относительная площадь ИРМ у стрессированных животных увеличивалась на 8,8 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. У контрольной группы животных относительная площадь ИРМ составила 4 (1,8-5,2) %, у стрессированных животных 12,8 (7,8-14,1) % (Рисунок 64).

В перикарионах нейронов *st. pyramidalis* СА3 гиппокампа наблюдалось увеличение количества нейронов с умеренно выраженной степенью экспрессии (2 балла) ИРМ, встречались единичные нейроны с максимально выраженной экспрессией ИРМ (Рисунок 63).

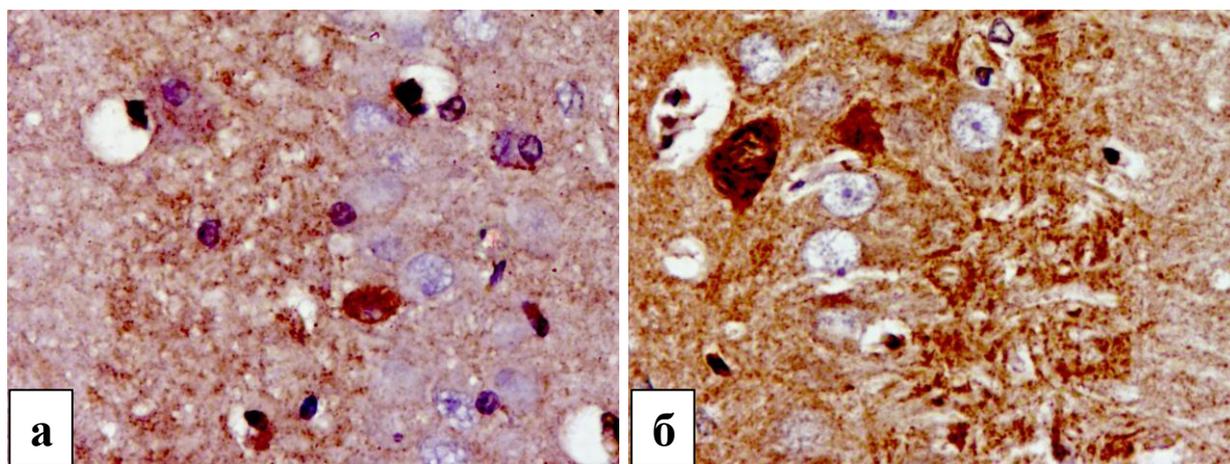


Рисунок 63. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя и умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле радиального слоя (а). Увеличение степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Удельное количество iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 составило 100 (80,8-100) %, что выше контрольных значений на 53,4 % ($p < 0,001$) (Рисунок 64). Наблюдалось сохранение умеренно выраженной экспрессии ИРМ (2 балла) в нейропиле *st. pyramidalis*, *st. radialis* СА3. Достоверных различий относительной площади ИРМ в СА3 гиппокампа

обнаружено не было. У контрольной группы животных относительная площадь ИРМ составила 21,2 (16,3-24,6) %, у стрессированных животных 21,4 (11,8-37,8) % (Рисунок 64).

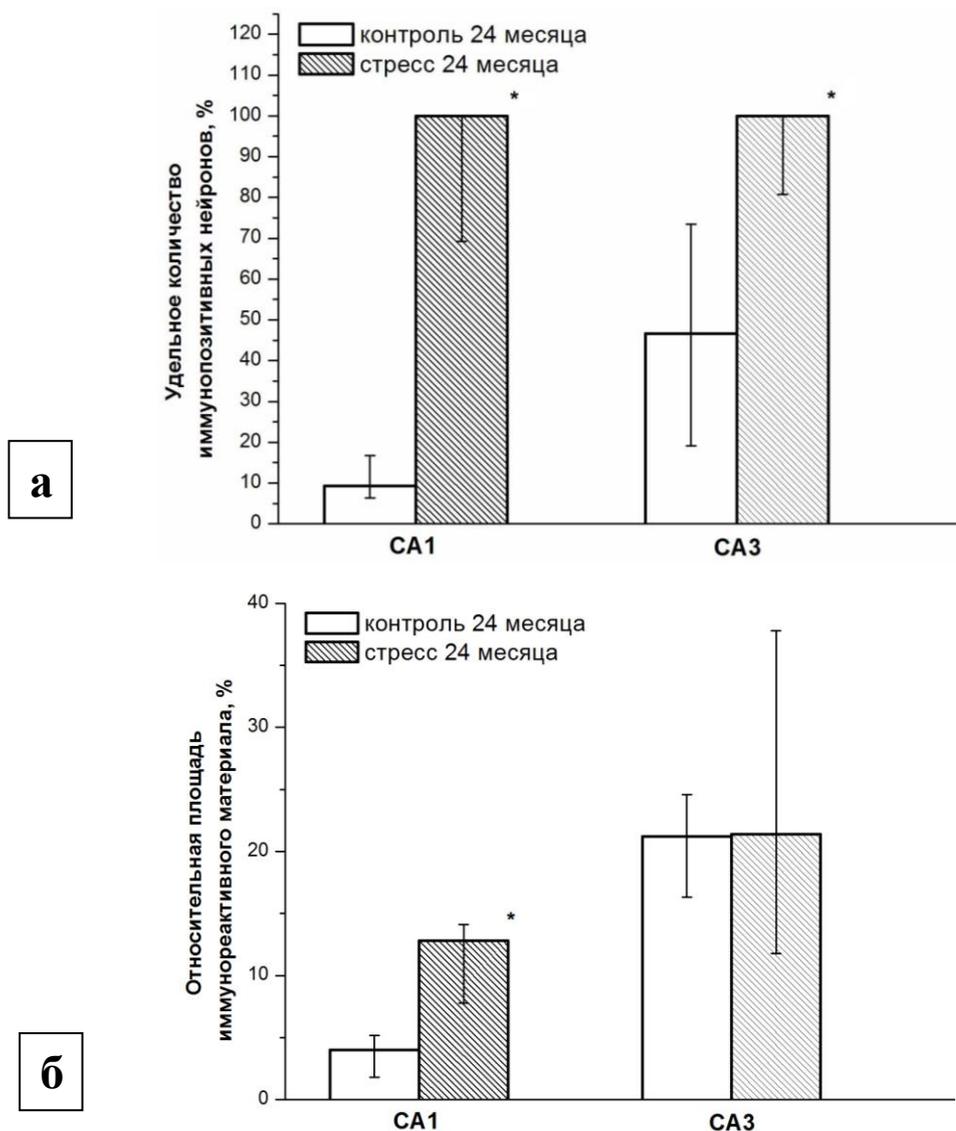


Рисунок 64. Динамика изменения удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс (а) Динамика изменения относительной площади iNOS-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонфферони).

У стрессированных крыс отмечалось сохранение разной выраженности экспрессии ИРМ в нейропиле радиального слоя CA3, CA2 и CA1 дорсального отдела гиппокампа в виде полумесяца.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у 24-х месячных животных в пирамидном слое CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа выявлено увеличение степени цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов, в сочетании с увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов, а также увеличение относительной площади ИРМ в цитоархитектонической области CA1. При этом у 24-х месячных стрессированных животных в нейропиле радиального слоя CA1-CA3 дорсального отдела гиппокампа сохраняется распределение iNOS-ИРМ в виде полумесяца, что отражает иммунофенотипические регион-специфические особенности гиппокампа. Необходимо отметить, что у стрессированных животных в возрасте 24-х месяцев, по сравнению с 12-ти месячными крысами, изменения в экспрессии биомаркера iNOS в дорсальном отделе гиппокампа носят более выраженный характер.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS

У 24-х месячных стрессированных крыс, как и в контрольной группе животных, в цитоплазме нейронов пирамидного слоя CA1 дорсального отдела гиппокампа отмечается мелкогранулярная умеренно выраженная экспрессия eNOS (2 балла) (Рисунок 65).

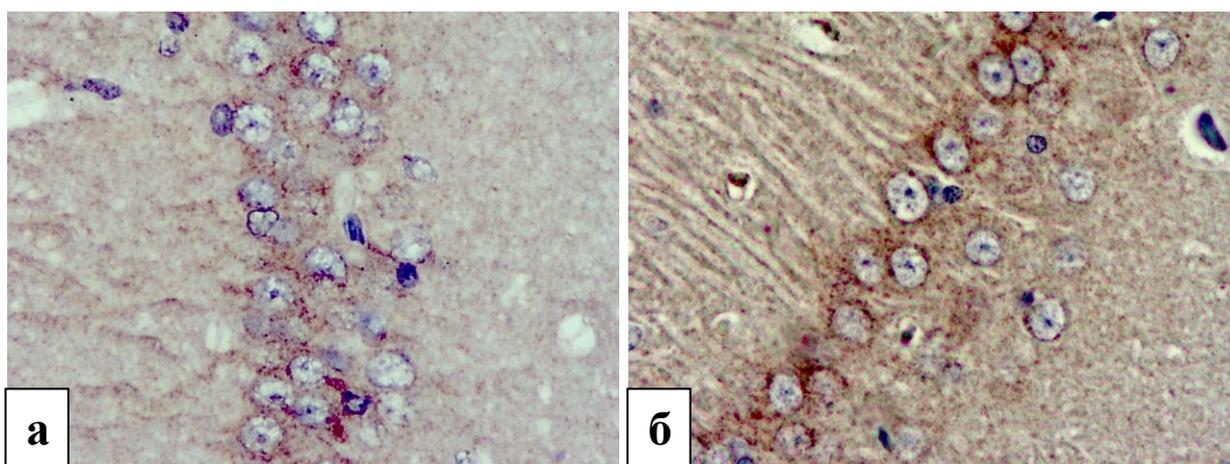


Рисунок 65. Гистологическое строение CA1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Обнаруживается увеличение удельного количества нейронов с цитоплазматической экспрессией eNOS (2 балла) на 50,8 % ($p < 0,001$), что составляет 89,7 (70,2-96,1) % (Рисунок 66).

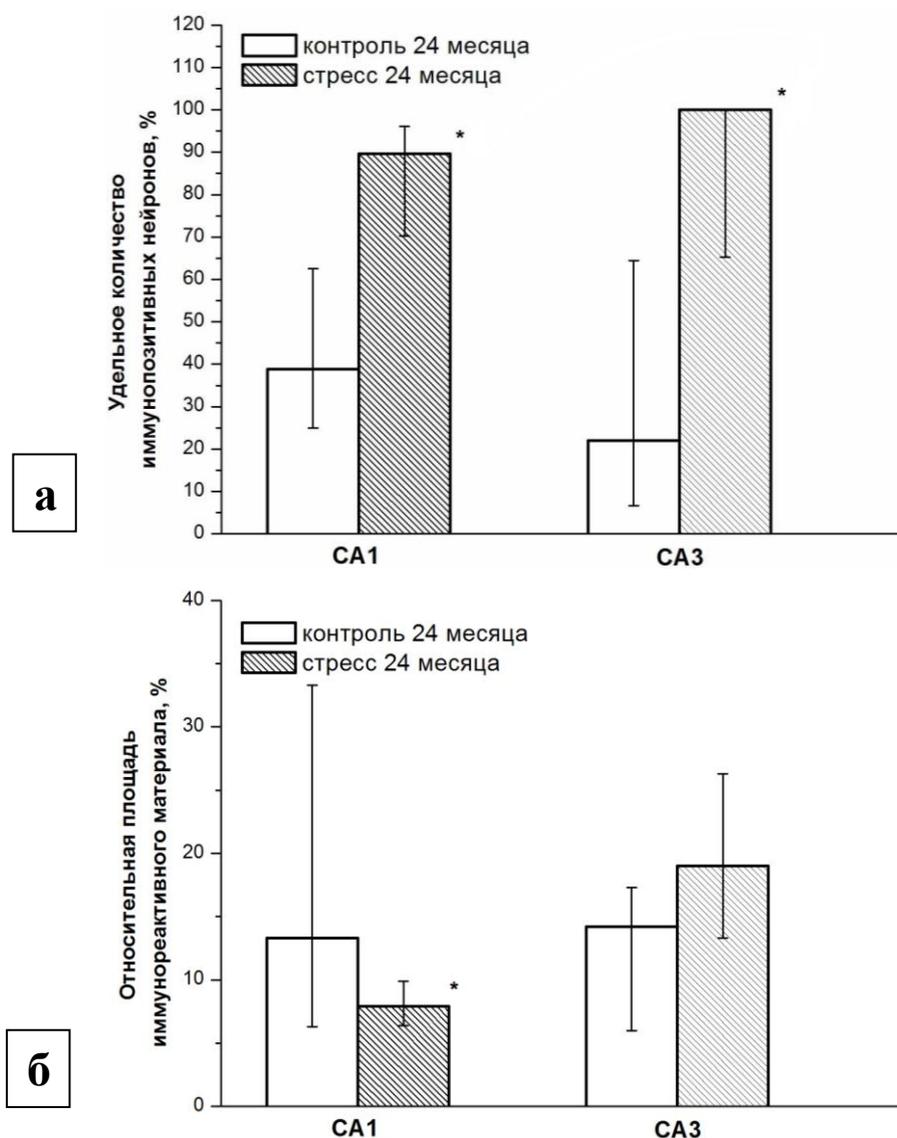


Рисунок 66. Динамика изменения удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс (а). Динамика изменения относительной площади eNOS-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Относительная площадь ИРМ в CA1 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных крыс уменьшается на 5,4 % ($p = 0,004$), что составило 7,9 (6,4-9,9) % (Рисунок 66). В нейрорпиле экспрессия практически отсутствовала.

В цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа наблюдалось повышение степени экспрессии eNOS-ИРМ (2 балла) (Рисунок 67). Обнаруживалось увеличение удельного количества нейронов с цитоплазматической экспрессией eNOS (2 балла) (Рисунок 67) на 78 % ($p < 0,001$), что составляет 100 (65,2-100) % (Рисунок 66).

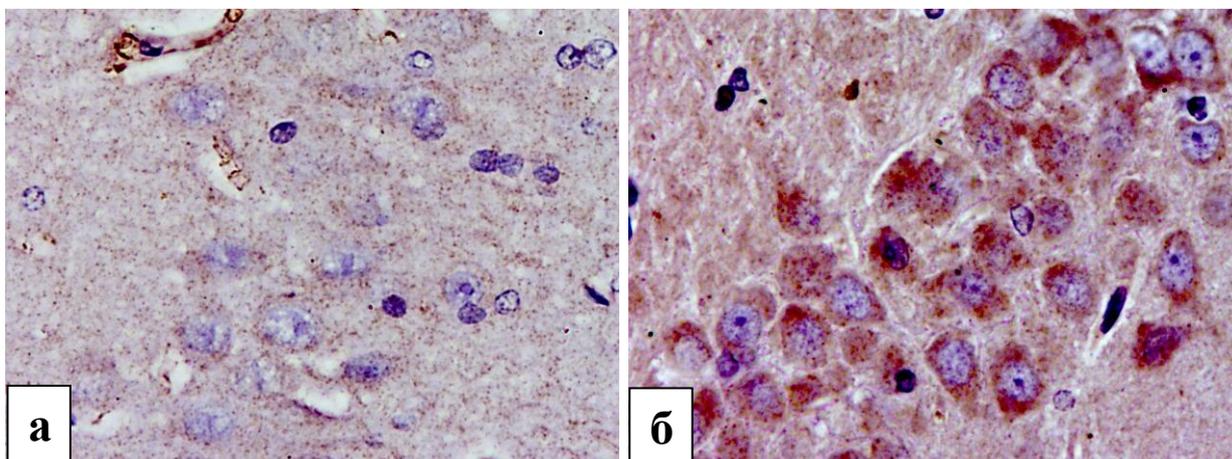


Рисунок 67. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме нейронов пирамидного слоя и эндотелии капилляров (а). Увеличение содержания ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Достоверных изменений относительной площади ИРМ в СА3 дорсального отдела гиппокампа у стрессированных крыс не наблюдалось ($p = 0,027$). В группе контрольных животных данный параметр составил 14,2 (6-17,3) %, в группе стрессированных животных - 19 (13,3-26,3) % (Рисунок 66).

В эндотелии сосудов микроциркуляторного русла гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс отмечалась слабая экспрессии eNOS (1 балл).

Таким образом, у 24-х месячных стрессированных животных в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа обнаружены разнонаправленные изменения экспрессии биомаркера eNOS, характеризующиеся увеличением степени экспрессии eNOS-ИРМ в нейронах пирамидного слоя СА3, в сочетании с повышением удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 и СА3, а также снижением относительной площади eNOS-ИРМ в СА1, что, по-видимому,

связано со снижением степени экспрессии ИРМ в нейропиле радиального слоя СА1. При этом наиболее выраженное увеличение экспрессии биомаркера eNOS наблюдалось в цитоархитектонической области СА3. Необходимо отметить, что у 12-месячных стрессированных крыс, в отличие от стрессированных животных в возрасте 24-х месяцев, в дорсальном отделе гиппокампа экспрессия eNOS-ИРМ снижалась, как в перикарионах нейронов и нейропиле, так и в эндотелии капилляров СА1 и СА3.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии pNOS

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к pNOS различий в характере и степени экспрессии ИРМ (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии beclin-1

При изучении СА1 дорсального отдела гиппокампа с использованием антител против beclin-1 у стрессированных крыс в возрасте 24-х месяцев в цитоплазме нейронов пирамидного слоя преобладала слабовыраженная экспрессия becline-1-ИРМ (1 балл) (Рисунок 68).

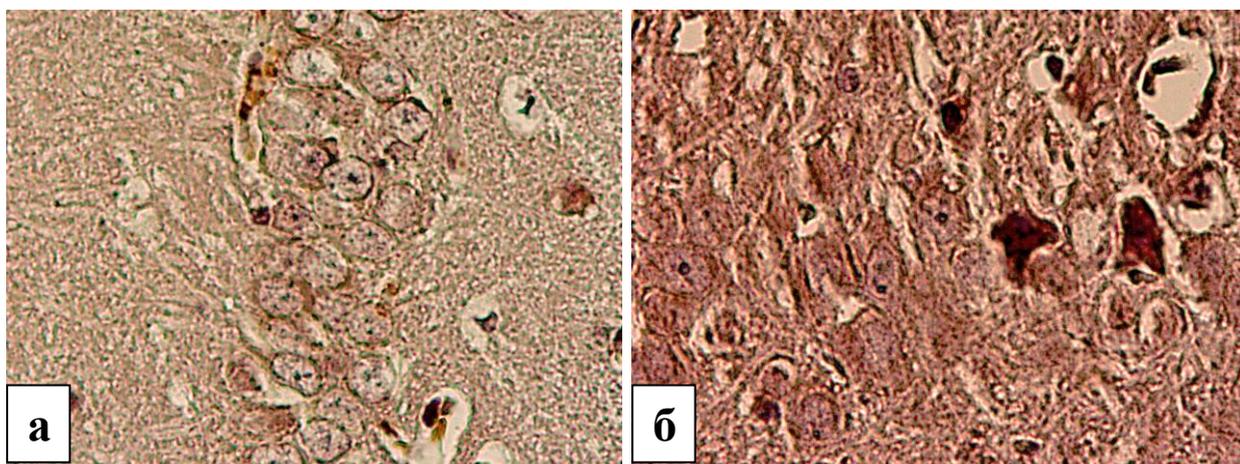


Рисунок 68. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в перикарионах нейронов пирамидного слоя (а). Слабовыраженная и выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против becline-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Встречались единичные пирамидные нейроны с выраженной цитоплазматической экспрессии ИРМ.

У стрессированных крыс в возрасте 24-х месяцев в пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа преобладала умеренно выраженная экспрессия beclin-1-ИРМ (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя (Рисунок 69).

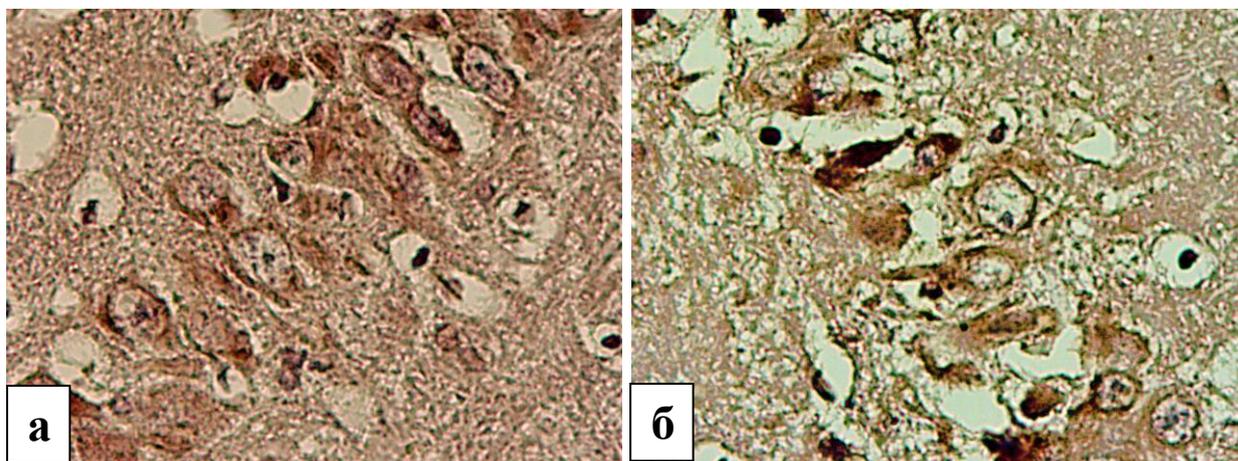


Рисунок 69. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против becline-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Необходимо отметить, что в пирамидном слое СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, встречались извитые сморщенные нейроны, которые характеризовались выраженной цитоплазматической степенью экспрессии becline-1-ИРМ.

При оценке результатов компьютерного морфометрического анализа относительной площади beclin-1-ИРМ в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа достоверных различий между контрольными и стрессированными животными не выявлено. В СА1 относительная площадь becline-1-ИРМ у контрольной группы животных составила 4 (3,2-6,9) %, у стрессированных животных – 6,2 (3,2-7,5) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 5,1

(3,6-9,6) % у контрольных крыс и 9,2 (6,5-15,9) %- у крыс, подвергнутых комбинированному стрессу.

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа не было выявлено увеличение степени экспрессии becline 1-ИРМ.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, с использованием антител наблюдалась выраженная цитоплазматическая экспрессия в астроцитах пирамидного, радиального и молекулярного слоев СА1 и СА3 (3 балла) (Рисунок 70).

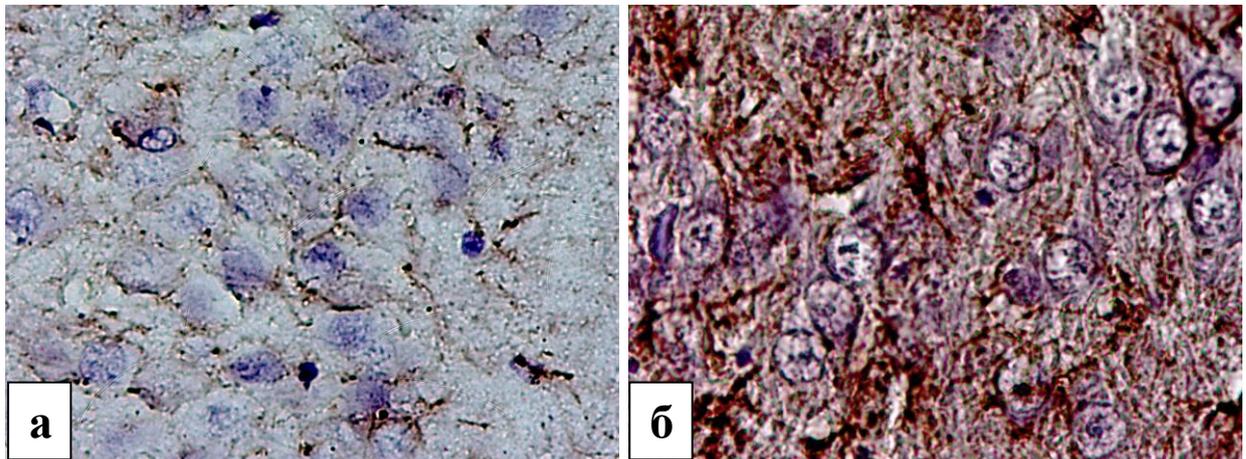


Рисунок 70. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в астроцитах (а, б). Увеличение содержания ИРМ в пирамидном, радиальном и краевом слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Однако, в отличие от контрольной группы животных, увеличивалось количество астроцитов в пирамидном слое дорсального отдела гиппокампа. При морфометрическом исследовании в СА1 и СА3 не было обнаружено достоверного изменения относительной площади ИРМ в дорсальном отделе гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных. У 24-х месячных контрольных животных в СА1 относительная площадь GFAP-ИРМ составила 11,2 (10,2-12,6) %, а у стрессированных - 13,2 (12,2-14,9) % ($p=0,036$). В СА3 относительная площадь ИРМ в группе контрольных крыс составила 14,1 (11,8-18,3) %, а в группе стрессированных крыс - 21,7 (15,7-24,9) % ($p=0,032$).

Таким образом, установлено, что у 24-х месячных стрессированных животных GFAP-иммунопозитивные астроциты концентрируются преимущественно в пирамидном слое дорсального отдела гиппокампа.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии BDNF

При оценке результатов иммуногистохимического исследования с использованием антител против BDNF у животных в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в цитоплазме нейронов пирамидного слоя, а также в нейроне пирамидного, молекулярного и радиального слоёв СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, по сравнению с контрольной группой животных, наблюдалось увеличение степени экспрессии до умеренно выраженной (2 балла) (Рисунок 71). Отдельные нейроны пирамидного слоя характеризовались выраженной цитоплазматической экспрессией BDNF-ИРМ. В астроцитах пирамидного и молекулярного слоёв СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечалась выраженная цитоплазматическая экспрессия BDNF-ИРМ (3 балла).

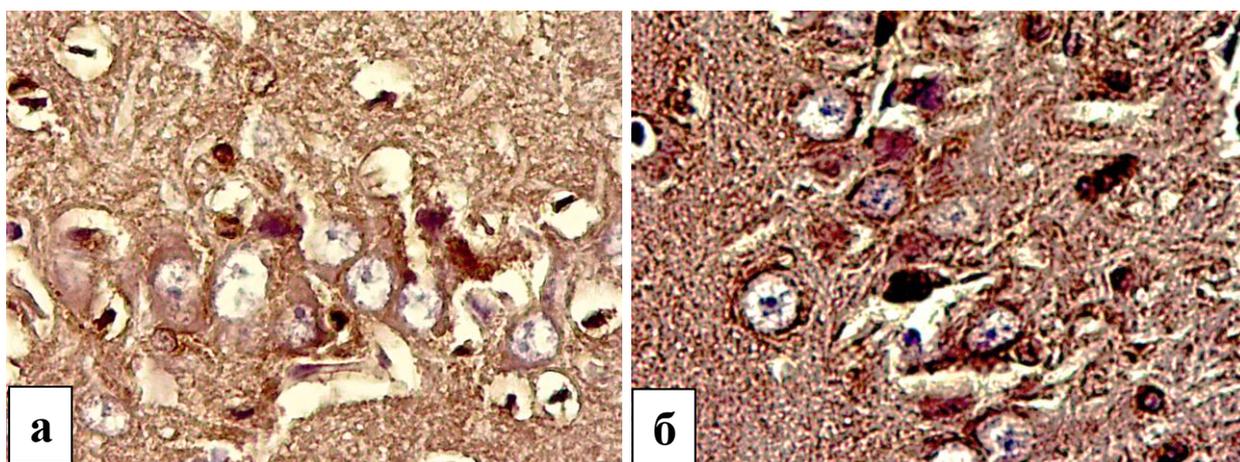


Рисунок 71. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя и в нейропиле (а). Увеличение степени экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против BDNF, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, у стрессированных животных в возрасте 24-х месяцев в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа наблюдается увеличение степени экспрессии BDNF-ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии HSP70

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к белкам теплового шока HSP70 в СА1 дорсального отдела гиппокампа у крыс в возрасте 24-х месяцев и крыс в возрасте 24-х месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, различий в степени экспрессии ИРМ не обнаружено. В пирамидном слое СА1 иммунонегативная реакция наблюдалась как в нейронах округлой и близкой к округлой форме, так и в нейронах со сморщиванием перикарионов.

У стрессированных животных в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя СА3, в отличие от контрольной группы животных, наблюдалась слабовыраженная мелкогранулярная экспрессия HSP70-ИРМ (1 балл) (Рисунок 72). ИРМ локализовался в основном в нейронах неизменной формы. В единичных сморщенных нейронах отмечалась выраженная цитоплазматическая экспрессия HSP70-ИРМ.

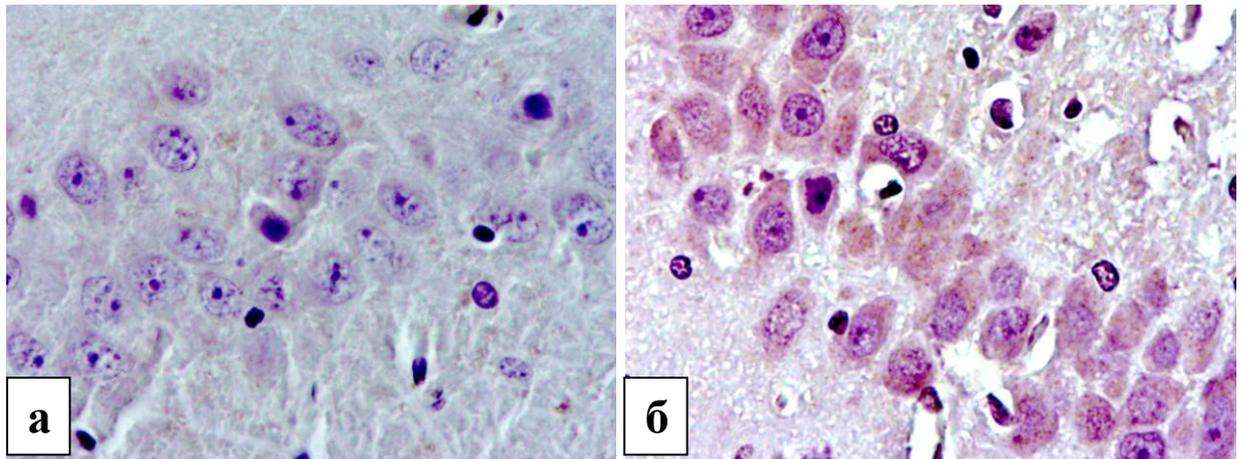


Рисунок 72. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Отсутствие экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против HSP70, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 24-х месяцев, в СА3 дорсального отдела гиппокампа наблюдается активация белков теплового шока, выражающаяся в появлении в цитоплазме нейронов пирамидного слоя экспрессии биомаркера HSP70.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

У 24-х месячных стрессированных крыс в пирамидном слое СА1 дорсального отдела гиппокампа отмечается преобладание нейронов с умеренно выраженной экспрессией ИРМ (2 балла), лишь в единичных перикарионах отмечается максимально выраженное окрашивание. В то же время в радиальном слое СА1 отмечается равномерное распределение гранулярного ИРМ, сопоставимое с контролем, однако, у контрольной группы животных в радиальном слое выявляются дендриты с иммунонегативной реакцией.

Суммарная экспрессия ИРМ (т.е. относительная площадь ИРМ) в пирамидном и радиальном слоях СА1 статистически не различается ($p=0,691$). У контрольных животных в СА1 относительная площадь ИРМ составила 11,7 (9-18,5) %, у стрессированных – 13 (7,1-17,4) %. Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 также

не обнаружено ($p=0,091$). В группе контрольных животных данный параметр составил 93,9 (76,5-100) %, в группе стрессированных животных – 100 (93,7-100) %.

У 24-х месячных стрессированных животных степень экспрессии иммуногистохимического окрашивания в СА3 носила умеренно выраженный характер (2 балла) (Рисунок 73). Статистически значимых различий исследуемых параметров обнаружено не было. Относительная площадь ИРМ у контрольных животных составила 11,7 (9,6-21,7) %, а у стрессированных 16,7 (9,3-22,4) % ($p=0,719$). Удельное количество иммунопозитивных нейронов в исследуемых группах составило 100 %.

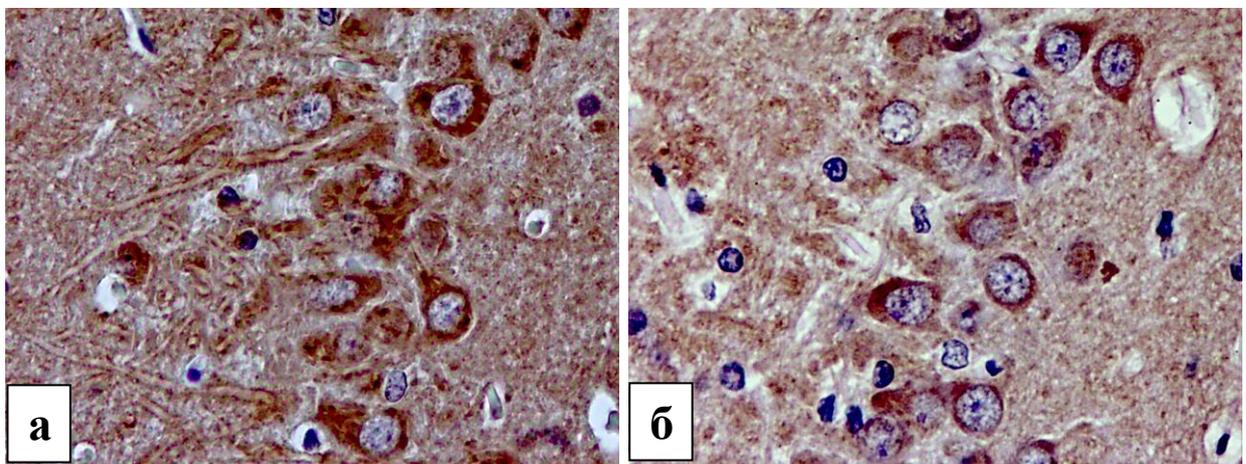


Рисунок 73. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 24-х месяцев, в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа не было обнаружено существенных различий в степени и характере распределения СР-ИРМ с контрольной группой животных.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии синаптофизина

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс с использованием антител

против СФ в нейропиле пирамидного слоя СА1 и СА3 отмечается снижение степени экспрессии СФ-ИРМ, по сравнению с контрольной группой животных, до умеренно выраженной (2 балла) (Рисунок 74). В молекулярном и радиальном слоях экспрессия также носила умеренно выраженный характер (2 балла). Наблюдалось снижение плотности расположения ИРМ, как в пирамидном, так и в радиальном и молекулярном слоях СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа. В цитоплазме нейронов пирамидного слоя наблюдалась умеренно выраженная гранулярная экспрессия СФ-ИРМ, так и её отсутствие. Отдельные нейроны со сморщиванием перикарионов и нейроны неизменённой формы характеризовались выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ.

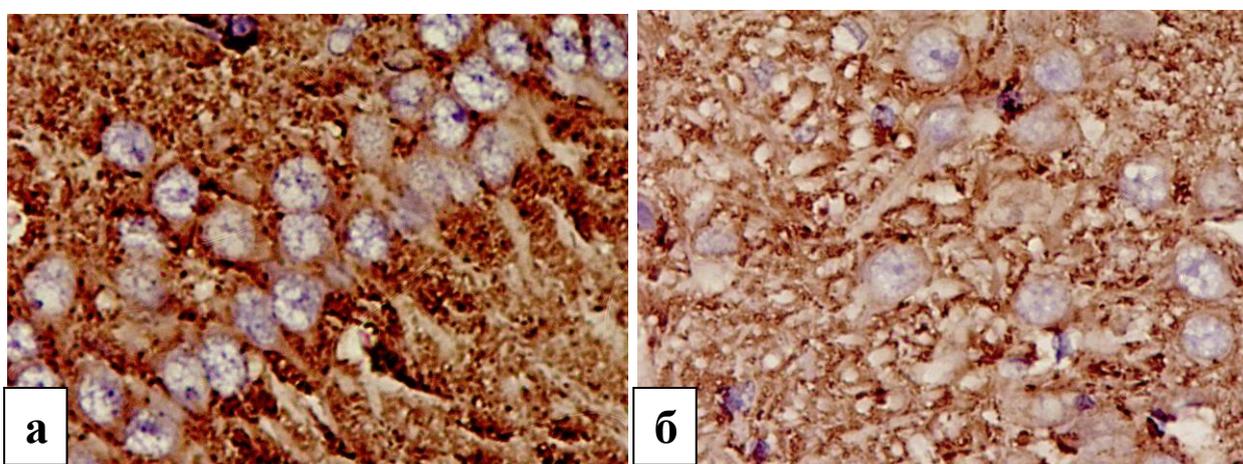


Рисунок 74. Гистологическое строение СА1 дорсального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в нейропиле пирамидного, радиального и краевого слоях (а). Уменьшение содержания ИРМ в нейропиле пирамидного, радиального и краевого слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При компьютерном морфометрическом анализе обнаружено достоверное снижение относительной площади ИРМ у 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных (Рисунок 75) в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа. В СА1 относительная площадь СФ-ИРМ уменьшилась на 21,3 % ($p < 0,001$) и составила 13,8 (11,7-19,1) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 16,5 (12,3-28,3) % и уменьшилась на 14,8 % ($p < 0,001$).

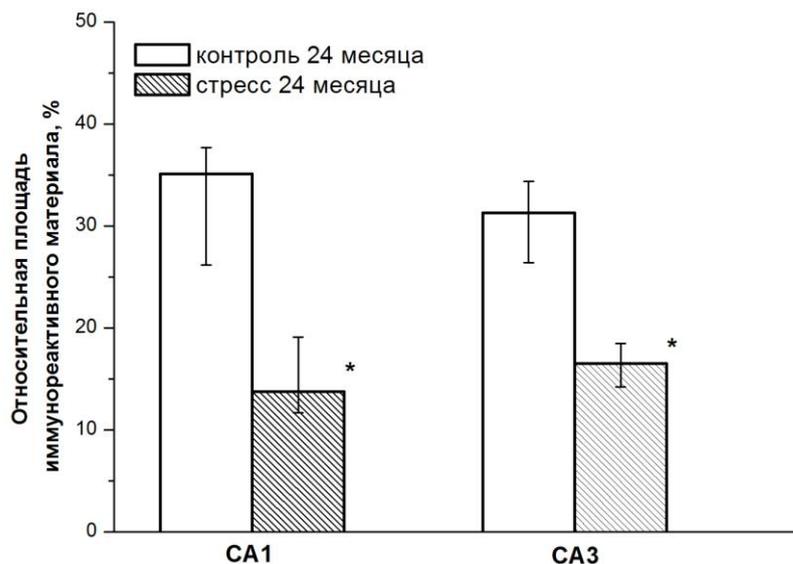


Рисунок 75. Динамика изменения относительной площади синаптофизин-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа обнаружено снижение степени экспрессии в нейроне всех слоёв в сочетании с уменьшением относительной площади СФ-ИРМ, наиболее выраженное в цитоархитектонической области CA1.

3.3.3. Патоморфологическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев при моделировании комбинированного стресса

При нейрогистологическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных животных, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, не было обнаружено существенных различий в строении цитоархитектонических областей CA1 и CA3 как по сравнению с контрольной группой животных, так и по сравнению с дорсальным отделом гиппокампа. Достоверных различий в изменении удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы в пирамидном слое CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа между контрольной и стрессированной группой животных обнаружено не было.

Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы у 24-х месячных контрольных крыс в СА1 составило 18,3 (6,8-77,9) %, в СА3 – 12,4 (4,8-50,8) %. У стрессированных 24-х месячных крыс данный показатель в СА1 составил 13,2 (7,8-43,5) %, в СА3 – 20,8 (6,3-63,6) %.

В пирамидном слое СА1 и СА3 нейроны располагались в 3-6 слоев. Не наблюдалось достоверных различий в ширине пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа между исследуемыми группами животных. У контрольных животных в СА1 ширина пирамидного слоя составила 52,8 (44,3-61,7) мкм, в СА3 - 61,8 (51,7-69) мкм, у стрессированных крыс в СА1 – 48,9 (40,3-56,3) мкм, в СА3 - 56,2 (50-62,8) мкм.

Оценка морфометрических показателей в пирамидном слое СА1 вентрального отдела гиппокампа продемонстрировала достоверное уменьшение средней площади перикарионов ($p=0,002$), средней площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p<0,001$), относительной площади перикарионов нейронов ($p=0,014$), относительной площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p<0,001$), отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю ($p=0,014$), а также увеличение относительной площади нейропилия ($p=0,014$) и ядерно-цитоплазматического отношения ($p<0,001$) у 24-х месячных стрессированных крыс по сравнению с контрольной группой животных (Таблица 8). В СА3 достоверное снижение отмечалось только средней ($p=0,002$) и относительной площади цитоплазмы перикарионов нейронов ($p=0,005$).

Таблица 8 – Изменение морфометрических параметров нейронов пирамидного слоя вентрального отдела гиппокампа крыс, Me (Q₁-Q₂)

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 24-х месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 24-х месяцев
CA1	Площадь ядер нейронов, мкм ²	60,8 (46,7-76,2)	61,8 (42,2-85,4)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	132,2 (108,9-161,6)	120,8* (90,1-157,5)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, мкм ²	70,9 (56,6-89,5)	58,1* (44,9-75,7)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	19,4 (16,3-21,8)	19,6 (14,2-22,8)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	43,3 (31,1-47,9)	36,5* (33,8-42,7)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	24,2 (20,6-26,1)	18,1* (17,3-20,5)
	Относительная площадь нейропиля, %	56,7 (52,1-62,9)	63,5* (57,3-66,2)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,8 (0,6-1)	1* (0,7-1,3)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейропиллю, число	0,8 (0,6-0,9)	0,6* (0,5-0,7)

Продолжение таблицы 8

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Крысы в возрасте 24-х месяцев	Стрессированные крысы в возрасте 24-х месяцев
CA3	Площадь ядер нейронов, мкм ²	66,2 (39,9-86,8)	58,3 (39,2-84,5)
	Площадь перикарионов нейронов, мкм ²	154,3 (110-196,1)	140,3 (104,4-179,5)
	Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов,	85,7 (65,8-117,5)	77* (59,6-98,4)
	Относительная площадь ядер нейронов, %	15,3 (12,5-17,1)	13,1 (12,3-16,7)
	Относительная площадь перикарионов нейронов, %	35,4 (30,1-41,3)	30,7 (30-32,1)
	Относительная площадь цитоплазмы перикарионов нейронов, %	21,1 (17,3-25,2)	17,2* (14,7-18,2)
	Относительная площадь нейрита, %	64,4 (58,7-69,9)	69,3 (67,9-70)
	Ядерно-цитоплазматическое отношение, число	0,7 (0,5-0,9)	0,8 (0,5-1)
	Отношение относительной площади перикарионов нейронов к нейриту, число	0,6 (0,4-0,7)	0,4 (0,4-0,5)
* - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).			

Таким образом, при длительном комбинированном стрессовом воздействии у крыс в возрасте 24-х месяцев в вентральном отделе гиппокампа обнаружены

признаки атрофических изменений нейронов пирамидного слоя, наиболее выраженные в СА1 и характеризующиеся уменьшением абсолютных и относительных площадей перикарионов нейронов, цитоплазмы перикарионов нейронов, отношения относительной площади перикарионов нейронов к нейропилю и повышением относительной площади нейропиля и ядерно-цитоплазматического отношения.

3.3.4. Иммуногистохимическая характеристика вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса

Иммуногистохимическое исследование экспрессии caspase-3

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс с использованием антител против caspase-3 характер и степень экспрессии ИРМ в СА1 и СА3 не отличались от распределения ИРМ в СА1 и СА3 контрольной группы животных. Достоверных различий в изменении удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 между контрольными и стрессированными животными также обнаружено не было.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса, у крыс в возрасте 24-х месяцев в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа не было обнаружено существенных различий в степени и характере распределения caspase-3-ИРМ, по сравнению с контрольной группой животных.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии iNOS

В пирамидном слое СА1 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных отмечалось снижение степени экспрессии iNOS-ИРМ в цитоплазме нейронов пирамидного слоя до слабовыраженной (1 балл). В пирамидном, молекулярном, радиальном и краевом слоях встречались единичные нейроны с умеренно выраженным окрашиванием ИРМ. Нейропилль всех слоёв, а также эндотелий капилляров характеризовался иммунонегативной реакцией.

При проведении морфометрического исследования у 24-х месячных животных, подвергнутых комбинированному стрессу обнаружено уменьшение удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 на 55,8 % ($p < 0,001$). У контрольных крыс данный показатель составляет 100 (93,2-100) %, у стрессированных – 44,2 (27,2-90) % (Рисунок 76). Не было обнаружено достоверных различий в изменении относительной площади у стрессированных и контрольных животных (Рисунок 76).

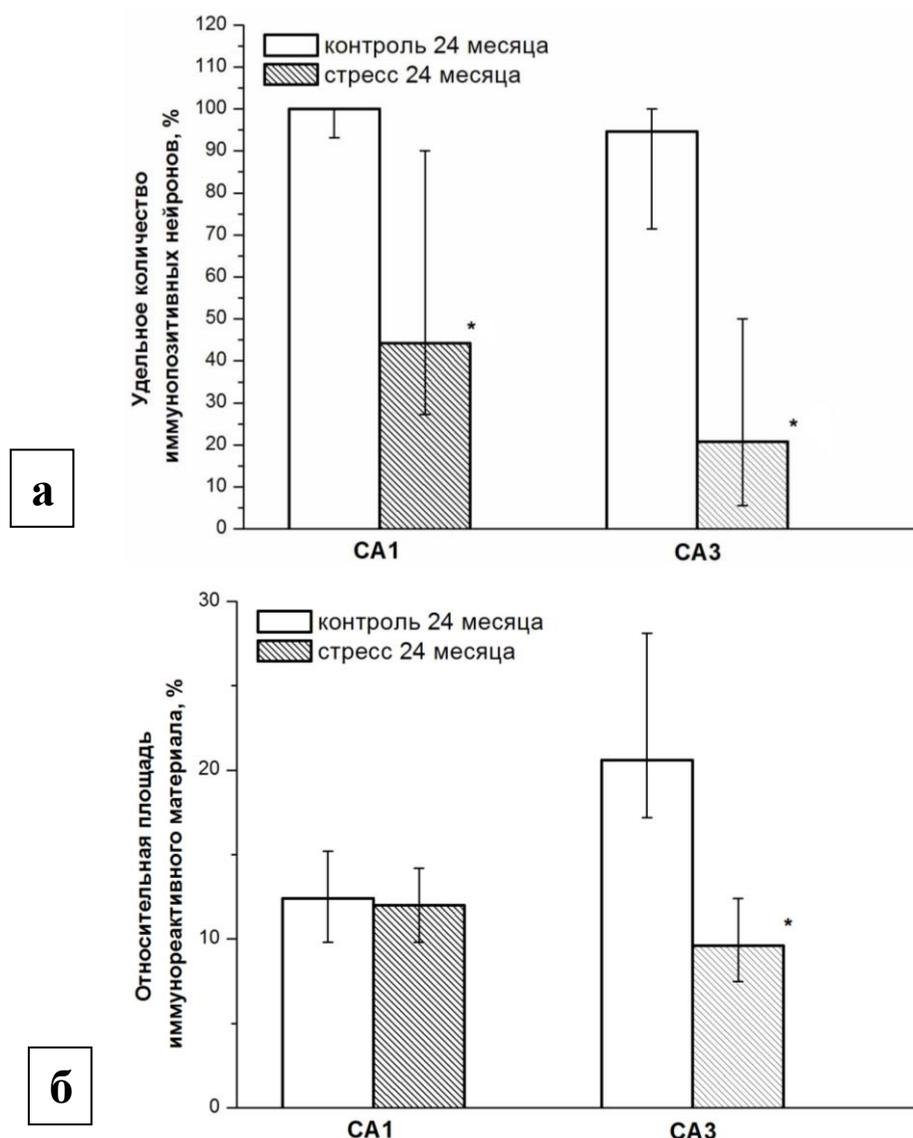


Рисунок 76. Динамика изменения удельного количества iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс (а). Динамика изменения относительной площади iNOS-иммунореактивного материала пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс (б). * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

У 24-х месячных стрессированных крыс в нейропиле СА3 радиального слоя отмечалась гранулярная умеренно выраженная экспрессия iNOS-ИРМ (2 балла), однако, в отличие от крыс контрольной группы ИРМ располагался более разрозненно. В нейронах пирамидного слоя наблюдалась слабая экспрессия ИРМ (1 балл) (Рисунок 77). В краевом, молекулярном, радиальном и пирамидном слоях встречались нейроны с умеренно выраженной цитоплазматической экспрессией ИРМ (2 балла). В эндотелии капилляров наблюдалась иммунонегативная реакция.

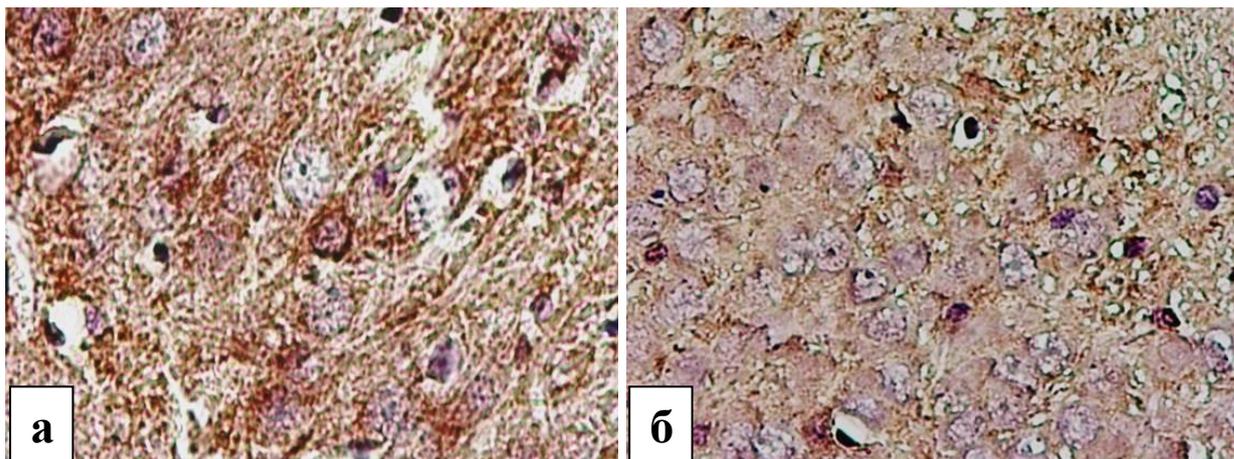


Рисунок 77. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в нейропиле радиального слоя и в перикарионах нейронов пирамидного слоя (а). Уменьшение содержания ИРМ в цитоплазме нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против iNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Удельное количество iNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 составило 20,8 (5,6-50) %, что ниже контрольных значений на 73,8 % ($p < 0,001$) (Рисунок 76). Относительная площадь ИРМ у стрессированных животных уменьшалась на 11 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (Рисунок 76). У контрольной группы животных относительная площадь ИРМ составила 20,6 (17,2-28,1) %, у стрессированных животных 9,6 (7,5-12,4) %.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у 24-х месячных животных в пирамидном слое СА1 вентрального отдела гиппокампа выявлено снижение степени цитоплазматической экспрессии iNOS-ИРМ в перикарионах нейронов, в сочетании с уменьшением удельного количества

иммунопозитивных нейронов как в СА1, так и в СА3, а также снижение относительной площади ИРМ в цитоархитектонической области СА3. Наиболее выраженные изменения в экспрессии биомаркера iNOS наблюдаются в СА3. При этом у 24-х месячных стрессированных животных в дорсальном отделе гиппокампа наблюдалось повышение экспрессии биомаркера iNOS.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии eNOS

У 24-х месячных стрессированных крыс в цитоплазме нейронов пирамидного слоя СА1 вентрального отдела гиппокампа отмечается мелкогранулярная умеренно выраженная экспрессия eNOS (2 балла) (Рисунок 78). Обнаруживается увеличение удельного количества нейронов с цитоплазматической экспрессией eNOS (2 балла) на 10 % ($p=0,006$), что составляет 100 % (Рисунок 79). При этом достоверного изменения относительной площади ИРМ в СА1 вентрального отдела гиппокампа у стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных не наблюдается ($p=0,021$). Данный параметр у контрольных крыс составил 10,5 (8,2-20,2) %, а у стрессированных - 7,9 (6,4-8,5) %. В нейроне и эндотелии капилляров экспрессия практически отсутствовала.

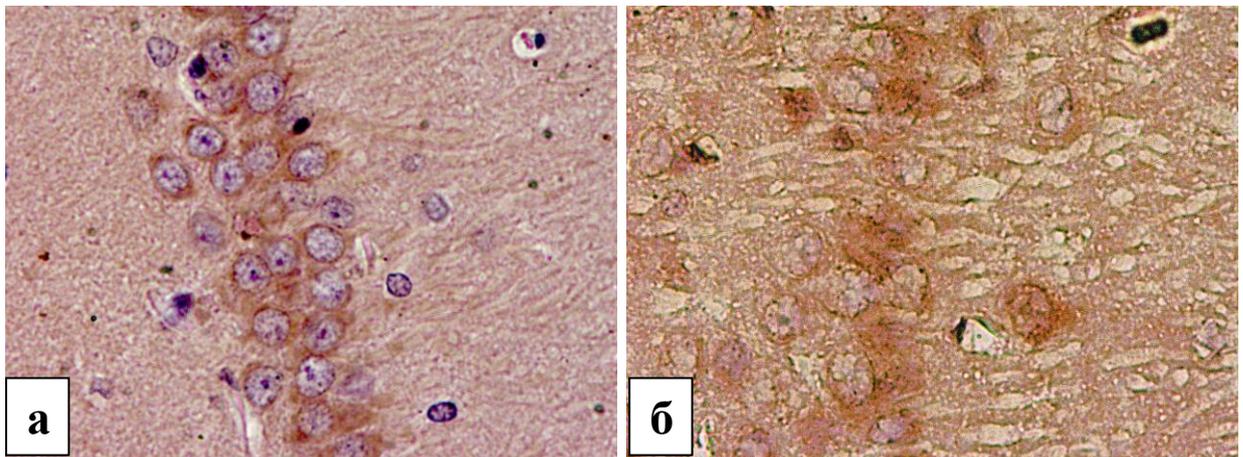


Рисунок 78. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При оценке результатов иммуногистохимического исследования в СА3 вентрального отдела гиппокампа крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, не было обнаружено существенных различий в степени и характере экспрессии eNOS-ИРМ, по сравнению с контрольной группой животных.

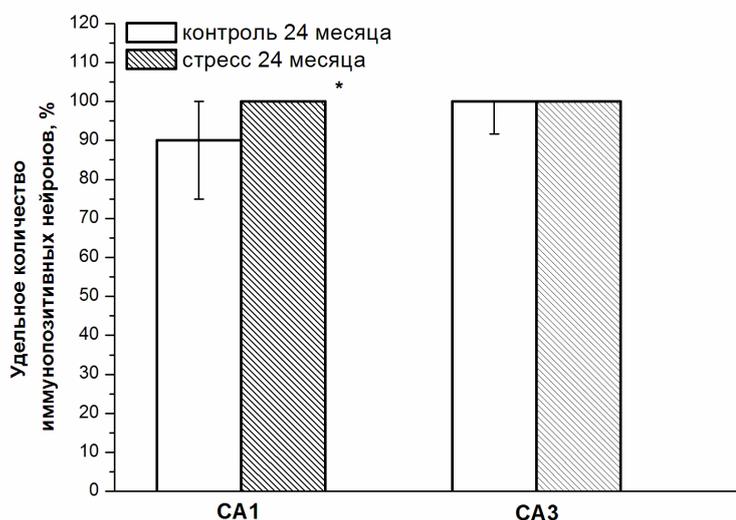


Рисунок 79. Динамика изменения удельного количества eNOS-иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Удельное количество иммунопозитивных нейронов в СА3 составило 100 % ($p=0,045$) у исследуемых групп животных (Рисунок 79). Также не было обнаружено достоверных различий в относительной площади ИРМ между группами ($p=0,327$). У контрольной группы животных относительная площадь eNOS-ИРМ в СА3 составила 21,8 (19,4-23,2) %, у стрессированных животных – 34,5 (13,8-35,2) %.

Таким образом, у стрессированных крыс в возрасте 24-х месяцев в СА1 дорсального отдела гиппокампа обнаружены разнонаправленные изменения экспрессии биомаркера eNOS, характеризующиеся как практически полным отсутствием экспрессии ИРМ в нейроне радиального слоя и эндотелии капилляров, так и увеличением удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя. Необходимо отметить, что у 24-х месячных

стрессированных животных в дорсальном отделе гиппокампа наблюдалось преимущественное увеличение экспрессии, биомаркера eNOS.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии pNOS

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к pNOS различий в характере и степени экспрессии ИРМ (1-2 балла) в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа у животных исследуемых групп обнаружено не было.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии beclin-1

При изучении СА1 вентрального отдела гиппокампа с использованием антител против beclin-1 у стрессированных крыс в возрасте 24-х месяцев, как и в контрольной группе животных в цитоплазме нейронов пирамидного слоя преобладала умеренно выраженная экспрессия beclin-1-ИРМ (2 балла) (Рисунок 80).

При оценке результатов компьютерного морфометрического анализа отмечалось увеличение относительной площади ИРМ в СА1 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса на 5,9 % ($p=0,003$), по сравнению с контрольной группой (Рисунок 81), и составила 9,4 (9-11,7) %.

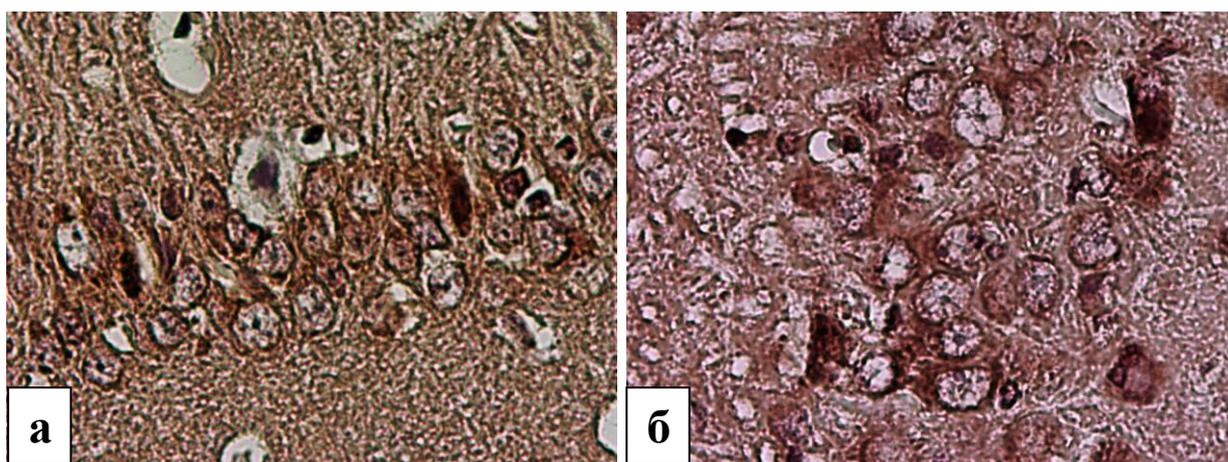


Рисунок 80. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме большинства нейронов пирамидного слоя (а, б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против beclin-1, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

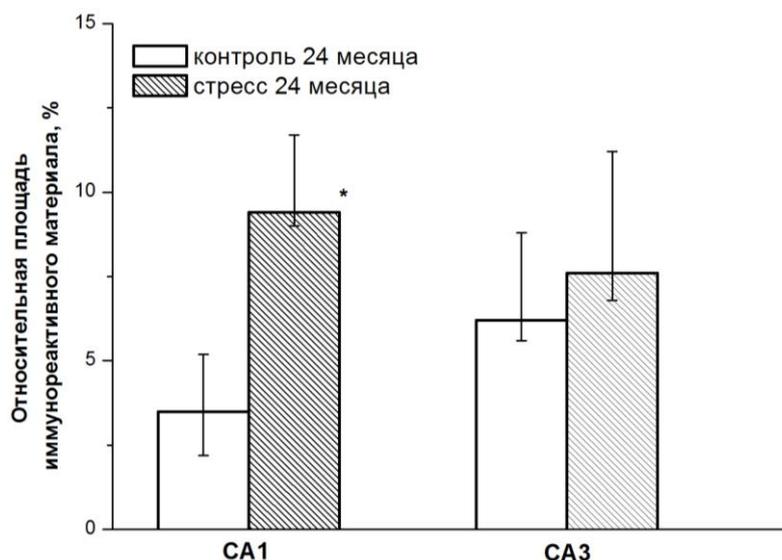


Рисунок 81. Динамика изменения относительной площади beclin-1-иммунореактивного материала пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

У 24-х месячных стрессированных животных, по сравнению с контрольной группой животных, в СА3 вентрального отдела гиппокампа не было обнаружено существенных различий в степени и характере распределения ИРМ.

При оценке результатов компьютерного морфометрического анализа относительной площади beclin-1-ИРМ в СА3 вентрального отдела гиппокампа достоверных различий между контрольными и стрессированными животными не выявлено ($p=0,134$).

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в СА1 вентрального отдела гиппокампа выявлено увеличение относительной площади beclin-1-ИРМ.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии GFAP

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа крыс в возрасте 24-х месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса, с использованием антител к GFAP существенных различий в степени и характере распределения ИРМ в СА1 и СА3

в сравнении с дорсальным отделом гиппокампа стрессированных крыс выявлено не было (Рисунок 82).

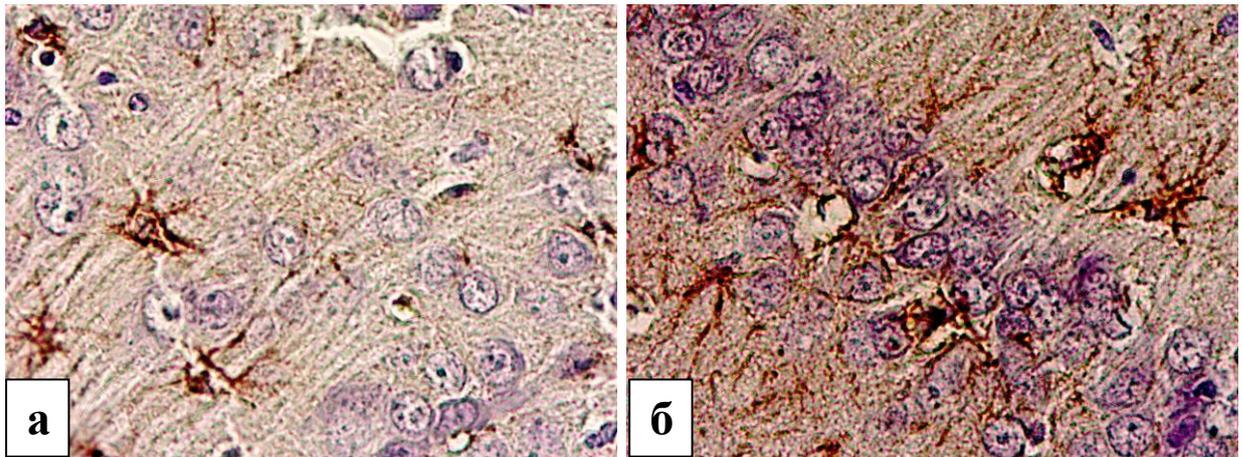


Рисунок 82. Гистологическое строение CA1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Выраженная степень экспрессии ИРМ в астроцитах (а, б). Увеличение содержания ИРМ в пирамидном, радиальном и краевом слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

При морфометрическом исследовании CA1 и CA3 было обнаружено достоверное повышение относительной площади ИРМ в вентральном отделе гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных (Рисунок 83).

У 24-х месячных стрессированных крыс в CA1 относительная площадь GFAP-ИРМ увеличилась на 4,7 % ($p < 0,001$) и составила 7,3 (5,2-9,9) %. В CA3 относительная площадь ИРМ составила 12,8 (9-18,5) % и увеличилась на 10,3 % ($p < 0,001$).

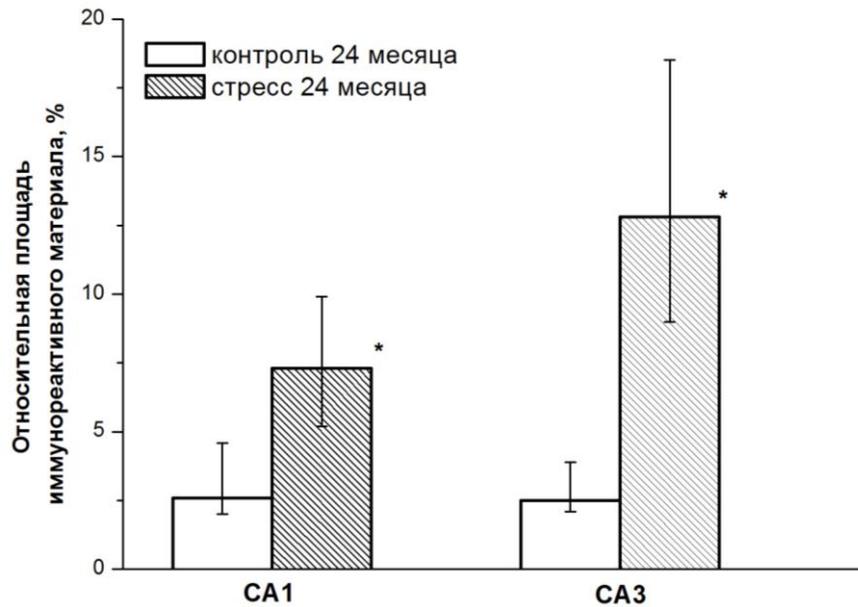


Рисунок 83. Динамика изменения относительной площади GFAP-иммунореактивного материала пирамидного слоя CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, подвергнутых воздействию комбинированного стресса, в CA1 и CA3 вентрального отдела гиппокампа отмечаются прогрессивные реакции астроцитарной глиии, наиболее выраженные в цитоархитектонической области CA3, характеризующиеся увеличением относительной площади GFAP-ИРМ в CA1 и CA3. Установлено, что у стрессированных животных GFAP-иммунопозитивные астроциты концентрируются преимущественно в пирамидном слое вентрального отдела гиппокампа. В вентральном отделе гиппокампа 24-х месячных стрессированных животных наблюдается более выраженный прогрессивный характер реакций астроцитарной глиии, по сравнению с дорсальным отделом.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии BDNF

При оценке результатов иммуногистохимического исследования вентрального отдела гиппокампа в CA1 и CA3 у 24-х месячных крыс, подвергнутых комбинированному стрессу, не было обнаружено различий в степени и характере распределения BDNF-ИРМ, по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, у 24-х месячных стрессированных крыс, как и в контрольной группе животных не было обнаружено существенных различий в степени и характере распределения BDNF-ИРМ, как в цитоплазме перикарионов нейронов, так и в цитоплазме астроцитов СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии HSP70

При оценке результатов иммуногистохимического исследования с использованием антител к белкам теплового шока HSP70 большинство нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс характеризовалось иммунонегативной реакцией. Однако в отличие от контрольной группы животных, у 24-х месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса в цитоплазме некоторых неизмененных по форме нейронов пирамидного слоя СА1 и СА3 обнаруживалась слабовыраженная пылевидная экспрессия HSP70-ИРМ (Рисунок 84). Сморщенные извитые нейроны характеризовались иммунонегативной реакцией.

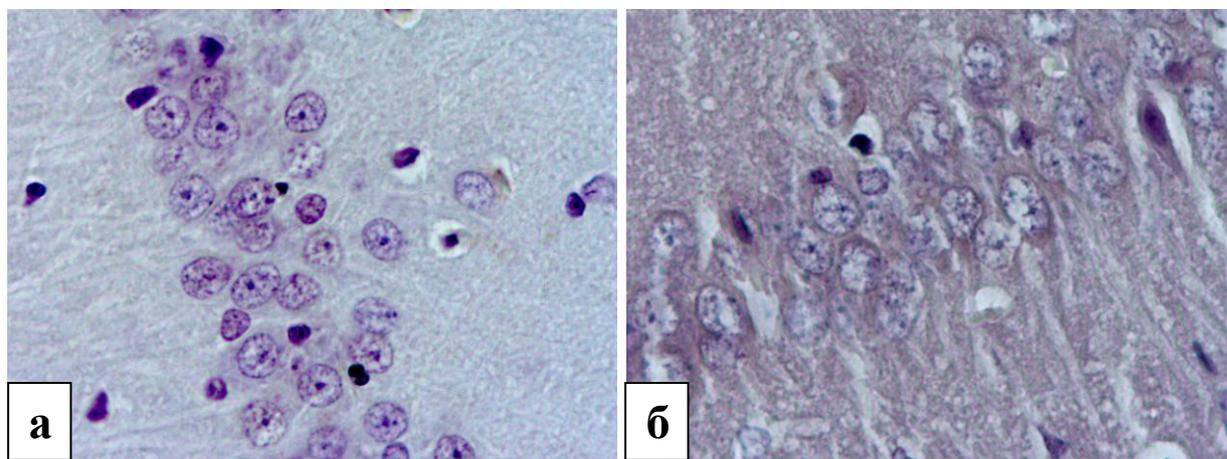


Рисунок 84. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Иммунонегативной реакция в цитоплазме нейронов пирамидного слоя (а). Слабовыраженная экспрессия ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против HSP70, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 24-х месяцев, в СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа наблюдается

активация белков теплового шока, выражающаяся в появлении в цитоплазме нейронов пирамидного слоя экспрессии биомаркера HSP70.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии сериновой рацемазы

У 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных в пирамидном слое СА1 вентрального отдела гиппокампа отмечается преобладание нейронов с выраженной экспрессией ИРМ (3 балла). В дендритах нейронов радиального слоя СА1 отмечается иммунонегативная реакция. Удельное количество иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 составило 100 %. При компьютерном морфометрическом анализе наблюдается увеличение относительной площади ИРМ у 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с животными контрольной группы на 8,3 % ($p=0,004$), которая составила 20,3 (19,6-26,4) % (Рисунок 85).

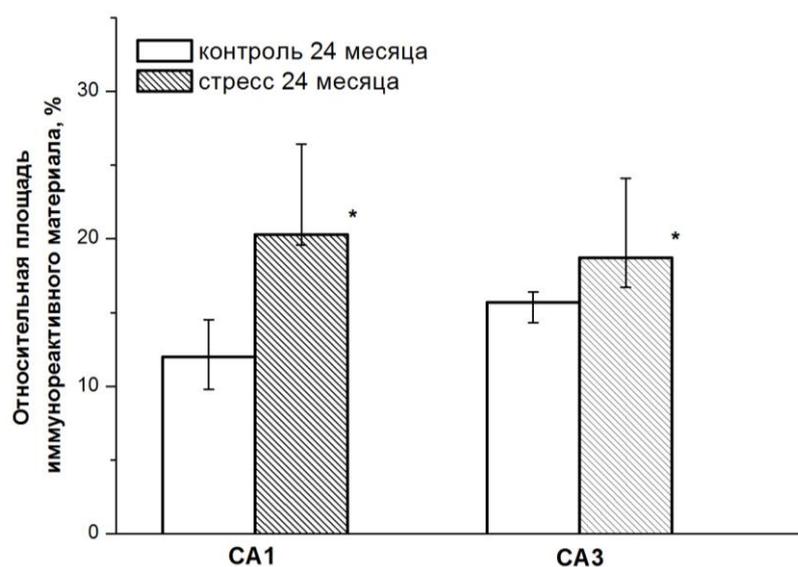


Рисунок 85. Динамика изменения относительной площади SR-иммунореактивного материала пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

У 24-х месячных стрессированных животных степень экспрессии иммуногистохимического окрашивания в СА3 носила выраженный характер (3 балла) (Рисунок 86).

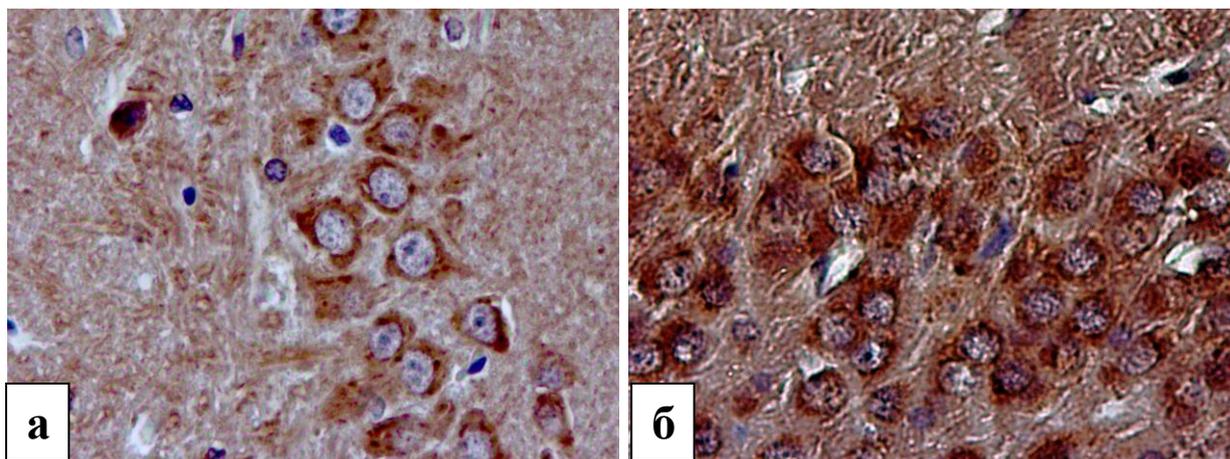


Рисунок 86. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИРМ в нейронах пирамидного слоя (а). Увеличение экспрессии ИРМ в цитоплазме перикарионов нейронов пирамидного слоя (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

В большинстве дендритов нейронов радиального слоя экспрессия ИРМ отсутствовала. В единичных полях зрения СА3 встречались нейроны, дендриты которых характеризовались выраженной цитоплазматической степенью экспрессии ИРМ. Удельное количество иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА3 составило 100 %. Отмечается увеличение относительной площади ИРМ в СА3 на 3 % ($p=0,004$) и составляет у стрессированных животных 18,7 (16,7-24,1) % (Рисунок 85).

Таким образом, при моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 24-х месяцев, в вентральном отделе гиппокампа отмечается увеличение степени экспрессии биомаркера СР в нейронах пирамидного слоя в сочетании с увеличением относительной площади СР-ИРМ в СА1 и СА3. Наиболее выраженные изменения в экспрессии СР отмечены в цитоархитектонической области СА1.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии синаптофизина

При иммуногистохимическом исследовании вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных стрессированных крыс с использованием антител против СФ в нейроне пирамидного, радиального, молекулярного и краевого

слоев СА1 и СА3, в отличие от контрольной группы животных преобладало слабо выраженное распределение СФ-ИРМ (1 балл) (Рисунок 87). В радиальном слое СА1 и СА3 встречались единичные дендриты с умеренно выраженной нитевидной гранулярной экспрессией ИРМ. Большинство нейронов пирамидного слоя характеризовались отсутствием цитоплазматической экспрессии СФ в перикарионах. Необходимо отметить, что у некоторых животных экспрессия СФ-ИРМ во всех слоях гиппокампа имела умеренно выраженный характер.

При компьютерном морфометрическом анализе обнаружено достоверное снижение относительной площади ИРМ у 24-х месячных стрессированных крыс, по сравнению с контрольной группой животных (Рисунок 88) в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа. В СА1 относительная площадь СФ-ИРМ уменьшилась на 30,7 % ($p < 0,001$) и составила 6,9 (4-30,7) %. В СА3 относительная площадь ИРМ составила 7,7 (4,4-17,4) % и уменьшилась на 20,2 % ($p < 0,001$).

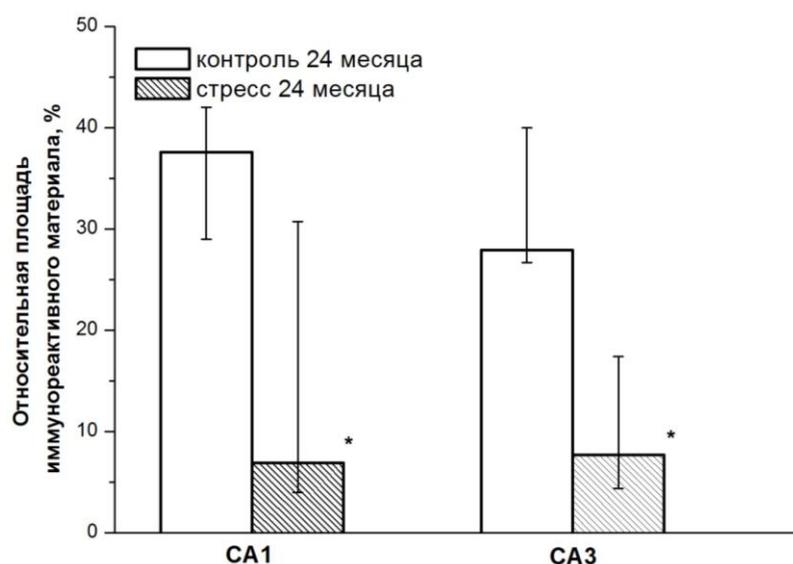


Рисунок 87. Динамика изменения относительной площади синаптофизин-иммунореактивного материала пирамидного слоя СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа 24-х месячных контрольных и стрессированных крыс. * - различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

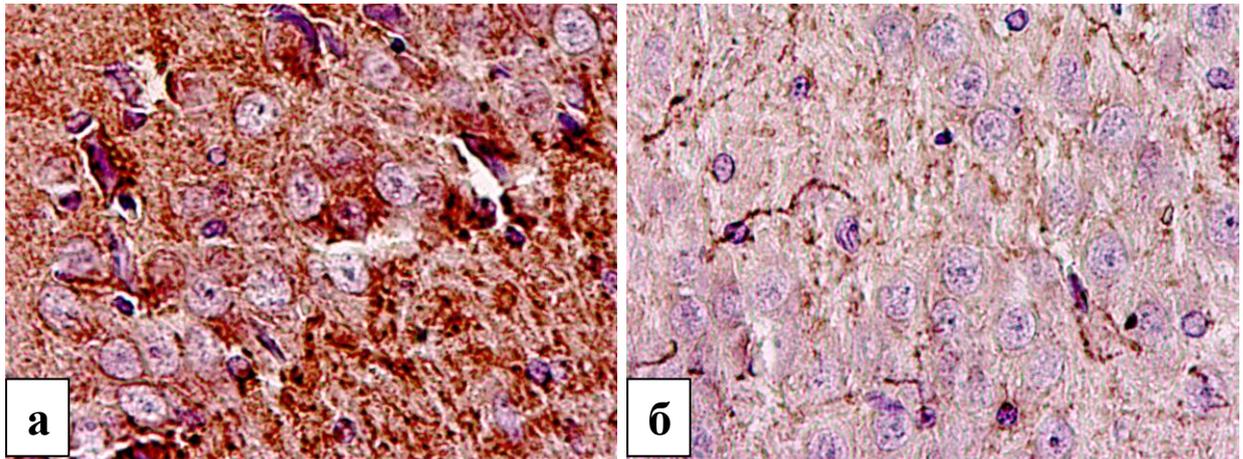


Рисунок 88. Гистологическое строение СА3 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 24-х месяцев (а) и крысы в возрасте 24-х месяцев находившейся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса (б). Умеренно выраженное распределение ИРМ в нейроне пирамидного и радиального и краевого слоях (а). Уменьшение содержания ИРМ в нейроне пирамидного, радиального и краевого слоях (б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против синаптофизина, докраска гематоксилином. Ув. X 400.

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев, находившихся в течение 7 суток под влиянием комбинированного стресса в СА1 и СА3 вентрального отдела гиппокампа обнаружено снижение степени экспрессии в нейроне всех слоёв в сочетании с уменьшением относительной площади СФ-ИРМ, наиболее выраженное в цитоархитектонической области СА1. Необходимо отметить, что в вентральном отделе гиппокампа, у 24-х месячных стрессированных животных, снижение относительной площади СФ-ИРМ имело более выраженный характер.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение средней продолжительности жизни населения ведет к возрастанию доли лиц пожилого и старческого возраста [76, 92, 180, 214], и как следствие, из-за отсутствия эффективного лечения, подверженность стрессовому воздействию, наряду с возрастным фактором, признается рядом авторов фактором риска в возникновении и прогрессировании нейродегенеративной патологии [63, 190, 220]. Изменения в когнитивных процессах, связанных со стрессом и старением, таких как обучение и память, а также поведенческие нарушения зависят от нейропластических механизмов в гиппокампе [173]. Дисфункция и атрофия гиппокампа, выявленные у взрослых крыс [230, 231] и пожилых людей [90] связаны с повышением уровня глюкокортикоидов. Известно, что высокая концентрация рецепторов глюкокортикоидных гормонов, присутствующих в гиппокампе, делает его особенно уязвимым к различного рода стрессогенным факторам [93], которые приводят к гибели нейронов, их сморщиванию, дендритной ретракции и снижению процессов глиогенеза [63].

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 при старении 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 [12]. 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, 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, характеризующиеся увеличением удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы, у

24-х месячных старых крыс и 12-ти месячных стрессированных крыс были более выражены в пирамидном слое цитоархитектонической области СА3 дорсального отдела гиппокампа, а в вентральном отделе гиппокампа – в цитоархитектонической области СА1, что в процессе старения может быть связано с метаболическими и морфофункциональными особенностями нейронов различных отделов гиппокампа и с недостаточностью компенсаторно-приспособительных реакций у крыс [13], 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 СА1 и на 22,2 % ($p<0,001$) в СА3 у старых крыс, на 36,4 % ($p=0,007$) в СА1 и на 13,8 % ($p<0,001$) в СА3 у 12-ти месячных стрессированных животных, что свидетельствует о необратимых изменениях нейронов пирамидного слоя [8]. 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 С 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 [168]. 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 [124, 125]. 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 [277], запуск механизмов клеточной гибели путём активации сигнальных нейрональных комплексов смерти (NDC) [91, 154, 277]. 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 [124]. Активность белков клеточной гибели caspase-3 и PARP-1 увеличивается в клетках головного мозга во время нормального процесса старения [168].

Известно, что мягкий стресс может вызывать аутофагический ответ, который повышает порог индукции апоптоза [164]. Аутофагия представляет собой путь деградации лизосом, посредством которого клетки захватывают внутриклеточные белки, липиды и органеллы и доставляют их в лизосомы, где они деградируют [56]. Многочисленные исследования показывают, что при многих нейродегенеративных нарушениях происходит накопление аутофагических вакуолей в нейронах. В настоящее время в контексте нейродегенеративных нарушений индукция аутофагии представляет собой нейропротективный ответ, а aberrантная аутофагия способствует гибели нейронов в большинстве этих расстройств [57]. Цитозольная форма beclin-1 регулирует аутофагию [222]. Выявлено снижение регуляции генов аутофагии (ATG5, ATG7 и BECN1) в мозге пожилых людей по сравнению с молодыми [57]. 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-ИМР 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 [55]. 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.

Нарушения кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла в головном мозге в процессе старения и при длительном комбинированном стрессе в результате активации стресс-реализующих систем и реализации каскада нейрогуморальных реакций приводит к ишемии, снижению нейротрофных и нейропротекторных факторов эндотелия сосудов и активации различных компонентов системы синтеза оксида азота [21, 194]. 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 [27, 72, 75, 192, 221]. 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. Экспрессия индуцибельной NOS была обнаружена в гипоталамусе и другие областях головного мозга стареющих крыс, а также в ускоренной модели старения у мышей [75, 143, 194]. Действие хронического стресса вызывает усиление экспрессии iNOS как в новой коре, так и в гиппокампе у крыс и мышей [27, 143]. 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 % ($p < 0,001$), 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 [287], 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 [130]. 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 pNOS в головном мозге при старении и стрессе [27, 35, 54, 72, 73, 118, 192, 194, 221]. Нами не обнаружено достоверного изменения экспрессии pNOS в гиппокампе.

Важная роль системы оксида азота в процессе старения головного мозга обусловлена не только нейротоксическим, но и нейропротекторным действием NO [194, 271], 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 [270]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что потеря NO в культуре эндотелиоцитов церебральных сосудов человека вызывает повышенную экспрессию APP и β -сайта APP расщепляющего фермента 1 (BACE1), что приводит к увеличению секреции β пептидов ($A\beta$ 1-40 и $A\beta$ 1-42) амилоида. Поскольку $A\beta$ пептиды рассматриваются как основные цитотоксические молекулы, ответственные за патогенез БА, потеря эндотелиального NO может значительно способствовать инициации и прогрессированию когнитивных нарушений [149]. 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 [286]. 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 % ($p < 0,001$), 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 мышах продемонстрировано участие eNOS в механизмах защиты нейронов головного мозга при ишемии [54, 115], 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 [149]. 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 [194]. Вместе с этим у 12-ти месячных крыс, подвергнутых воздействию комбинированного стресса в СА1 и СА3 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) СА1 и СА3, в сочетании с уменьшением удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 61,2 % ($p < 0,001$), в СА3 - на 44 % ($p < 0,001$) и относительной площади ИРМ в СА1 на 33,5 % ($p < 0,001$), в СА3 - 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 СА3 (2 балла), в сочетании с повышением удельного количества иммунопозитивных нейронов в СА1 на 50,8 % ($p < 0,001$), в СА3 - на 78 % ($p < 0,001$) и снижением относительной площади eNOS-ИРМ в СА1 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 СА1 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 [2]. 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 CP и тем самым снижает уровень D-серина, что, в свою очередь, приводит к уменьшению NMDA-зависимой нейротрансмиссии [109, 127, 195, 239]. 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 [239]. Согласно «шатл гипотезе» L-серин в основном синтезируется из глюкозы в астроцитах и экспортируется в нейроны с помощью нейтрального переносчика аминокислот (ASCT или аналогичных). Нейрональная CP синтезирует D-серин, который захватывается и аккумулируется астроцитами. Астроцитарный и нейрональный D-серин могут стимулировать NMDA рецепторы [283]. 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 *CR* наряду с дефицитом памяти [108] наблюдается уменьшение ветвлений, общей длины и плотности расположения шипиков апикальных и базальных дендритов пирамидных нейронов в первичной соматосенсорной коре [269]. Стресс-индуцированные изменения характеризовались в дорсальном отделе гиппокампа снижением степени экспрессии *CR* (0-1 балл) в дендритах радиального слоя CA1 и CA3, в вентральном отделе гиппокампа отмечалось снижение относительной площади *CR*-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 *CR* (3 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя в сочетании с увеличением относительной площади *CR*-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 *CR* 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 [2].

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 [266]. Снижение ширины пирамидного слоя цитоархитектонических областей СА1 на 8,4 % ($p=0,010$) и СА3 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 СА1, поскольку сопровождалась не только увеличением средней площади перикарионов на 25,3 % ($p<0,001$), но и увеличением средней площади ядер на 24,3 % ($p<0,001$), 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 СА1 и СА3, у 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 [136, 156, 288]. 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 [187], атрофию дендритов и исчезновение дендритных шипиков в пирамидном слое СА3 зоны гиппокампа, а также приводит к нарушению синаптических механизмов пластичности [125], что сопровождается когнитивными нарушениями [2], приводит к потере памяти и способствует снижению способности к обучению [31, 153, 193]. У людей с синдромом Кушинга и пациентов, получающих глюкокортикоиды в качестве терапии, может наблюдаться атрофия гиппокампа [187]. Под влиянием комбинированного 14-суточного стрессового воздействия (наклонное положение

клетки, использование подкисленной уксусной кислотой воды, воздействие светом стробоскопа, использование запаха и звуков, издаваемых хищниками) у 3 месячных крыс наблюдались структурные отличия в вентральном и дорсальном субрегионах гиппокампа [99]. 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 [61, 79, 167, 229, 278].

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 [61].

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 CA1 и CA3, а в дорсальном отделе только в CA3 (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 [142].

Считается, что СФ, расположенный на цитоплазматической поверхности мембраны пресинаптических пузырьков, может участвовать в формировании синаптических пузырьков и экзоцитозе [280]. Увеличение площади экспрессии СФ-ИРМ рассматривается как маркер увеличения количества синапсов [9, 19]. При этом нами не было обнаружено достоверного увеличения относительной площади ИРМ у старых животных, что согласуется с данными литературы об отсутствии количественных возрастных различий экспрессии СФ в гиппокампе при старении [41, 137, 259]. Однако, у 24-х месячных животных нами выявлено увеличение степени экспрессии 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. [14], у 18 месячных крыс линии Вистар и ОХYS, 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” [1], большое количество таких контактов определено на дендритах пирамидных нейронов гиппокампа [119, 179]. 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 нейропиле всех слоев гиппокампа может свидетельствовать о снижении процессов синаптической пластичности при воздействии комбинированного стресса, так как численность СФ отражает синаптическую плотность [9, 19]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о снижении экспрессии СФ в гиппокампе при моделировании различных видов стрессового воздействия [110, 178, 218, 248].

В последнее время важная роль, как в процессе старения, так и в развитии нейродегенеративных заболеваний отводится нейроглии, дисфункция которой приводит к снижению гомеостаза в центральной нервной системе и истощению защитных возможностей нервной ткани [20, 51, 86]. Однако концепция нейроглиального старения еще не определена. До сих пор преобладает общее убеждение об астроглиозе, как чисто патологической, вредной реакции, связанной с «нейровоспалением». В последнее десятилетие появились экспериментальные данные и новые концепции, указывающие на гораздо более широкие и более сложные изменения в астроглии при различных формах нейропатологии [66, 199, 244, 275]. Восприятие реактивного астроглиоза как чисто патологического ремоделирования с отрицательным результатом было заменено понятием реактивности как защитного процесса, который представляет широкий спектр клеточных изменений, характерных для отдельных патологических состояний [199, 244]. Астроглиозный ответ приводит к различным клеточным фенотипам, оптимизированным для нейропротекции конкретных патологий центральной нервной системы. Реактивные астроциты увеличивают нейропротекцию и трофическую поддержку стрессовых нейронов, способствуют образованию

глиального рубца, который изолирует область повреждения от остальной ткани центральной нервной системы, обеспечивают реконструкцию гематоэнцефалического барьера и незаменимы при регенерации. 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 [66, 199]. 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 [66, 199]. Однако при определенных обстоятельствах глиотические изменения могут принимать негативный характер, что способствует нейротоксичности [185, 284]. Многочисленные формы нейропатологии связаны с острой или хронической астроглиопатологией, которая проявляется в утрате или ремоделировании основных астроглиальных функций. Астроглиальная астения, характеризующаяся атрофией астроцитов и их функциональной слабостью, описана при различных типах неврологических заболеваний от психиатрической патологии до нейродегенерации [216, 275]. Атрофия астроглии может уменьшить охват эндотелия сосудов головного мозга, что будет способствовать развитию дефицита кровоснабжения, наблюдаемому уже на ранних стадиях БА [62, 288]. 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 СА1 и СА3,

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 [51]. Астроглиальная атрофия может быть напрямую связана с сокращением астроглиальной гомеостатической поддержки, что приводит к снижению выживаемости нейронов и может влиять на функциональную активность синапсов. Все это может привести к утрате синаптических контактов, влияющих на передачу и ослаблению синаптической пластичности, которые являются именно ранними патологическими событиями, наблюдаемыми при БА [83, 261]. Астроциты поддерживают синаптическую передачу через множественные механизмы. Эти механизмы включают контроль над ионами в синаптической щели, поглощением нейротрансмиттеров и транспортом в нейронные терминалы глутамата, который является обязательным предшественником глутамата и ГАМК. Снижение синаптического охвата астроглией, возможно, уменьшает эту поддержку, вызывая функциональную синаптическую слабость [275].

Таким образом, у крыс в возрасте 24-х месяцев и у животных, подвергнутых комбинированному стрессу в нейронах гиппокампа определены прогрессирующие морфологические признаки повреждения, изменения синаптического аппарата, что может отражать не только нарушения молекулярных нейропротекторных механизмов, связанных с изменением локализации СФ, с образованием D-серина и NO, а также со снижением eNOS в эндотелии капилляров гиппокампа. Поскольку потеря астроглиальной функции в регулировании концентрации глутамата в интерстиции играет ведущую роль в нарушениях, связанных с эксайтотоксической гибелью нейронов, например, при энцефалопатии Вернике [132], амиотрофическом латеральном склерозе [120, 268], депрессии [92], некоторых видах деменции [48, 83, 84], развитии отека головного мозга [273], что обуславливает широкий спектр возраст- и стрессзависимой патологии нервной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования были получены новые морфологические данные об особенностях изменений нейронов различных цитоархитектонических 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 [7, 184], 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 нейронах 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 CA1, 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 CA1 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, нейропиле радиального слоя и в эндотелии капилляров различных слоёв (до 0 баллов) CA1 и CA3. У 24-х месячных животных стрессовое воздействие приводит к снижению относительной площади eNOS-иммунореактивного материала в CA1 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 нейропиле.

7. При моделировании комбинированного стресса у крыс в возрасте 12-ти месяцев происходят наиболее выраженные изменения экспрессии сериновой рацемазы в CA3 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 СОКРАЩЕНИЙ

- БА – болезнь Альцгеймера
БП – болезнь Паркинсона
ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ИРМ – иммунореактивный материал
КРФ – кортикотропин-релизинг фактор
КРФ1 – КРФ-рецептор 1
СР – сериновая рацемаза
СФ – синаптофизин
УКР – умеренные когнитивные расстройства
AIF – апоптоз индуцирующий фактор
AMPA – рецептор аминокислоты-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
APP – белок предшественник амилоида
A β – β -амилоид
BDNF – нейротрофический фактор мозга
Becl-1 – белок регулятор аутофагии и клеточной гибели
CA1 - область I аммонова рога (*regio I cornus ammonis*)
CA2 - область II аммонова рога (*regio II cornus ammonis*)
CA3 - область III аммонова рога (*regio III cornus ammonis*)
CA4 - область IV аммонова рога (*regio IV cornus ammonis*)
CaMKII – кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II
eNOS – эндотелиальная нитрооксидсинтаза
GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок
GS – глутаминсинтетаза
HSP70 – белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа
iNOS – индуцибельная нитрооксидсинтаза
LTP – длительная потенция
NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата
nNOS – нейрональная нитрооксидсинтаза
PARP-1 – поли (АДФ-рибоза) полимеразы-1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боголепов, Н. Н. Современные проблемы синапсоархитектоники мозга [Текст] / Н. Н. Боголепов // Морфологические ведомости. – 2010. – № 1. – С. 7 – 12.
2. Влияние фенибута на память и поведение крыс различных возрастных групп, подвергшихся 7-дневному комбинированному стрессорному воздействию [Текст] / Е. В. Волотова, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин, И. С. Филина, И. Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1. – С. 23–26.
3. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. — М.: «Практика», 1999. — 459 с.
4. Гудошников, В. И. Роль глюкокортикоидов при старении и возрастзависимой фармакотерапии [Текст] / В. И. Гудошников // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 48 – 53.
5. Гуляева, Н. В. Влияние стрессорных факторов на функционирование гиппокампа взрослого организма: молекулярно-клеточные механизмы и дорсовентральный градиент [Текст] / Н. В. Гуляева // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова – 2013. – Т. 99, № 1. – С. 3-16.
6. Гуцол, А. А. Практическая морфометрия органов и тканей [Текст] / А. А. Гуцол, Б. Ю. Кондратьева. – Томск: Изд-во Томского ун-та. – 1988. – 135 с.
7. Депрессивное состояние у крыс при хроническом комбинированном стрессе, вызванном сочетанием разномодальных стрессоров [Текст] / И. Н. Тюренков, В. В. Багметова, Ю. В. Чернышева, Д. Д. Бородин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 9. – С. 1045–1056.
8. Жаботинский, Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона [Текст] / Ю. М. Жаботинский – Л.: Медицина, 1965. – 328 с.
9. Колос, Е. А. Маркер синаптических контактов – синаптофизин [Текст] / Е. А. Колос, И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 1. – С. 78–82.

10. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники [Текст] / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
11. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте [Текст] / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.
12. Максимова, К. Ю. Морфологическая характеристика гиппокампа крыс линий ОХУС и Вистар в процессе старения [Текст] / К. Ю. Максимова, С. В. Логвинов, Н. А. Стефанова // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 3. – С. 11–16.
13. Максимова, К. Ю. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении [Текст] / К. Ю. Максимова, Н. А. Стефанова, С. В. Логвинов // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 56–61.
14. Максимова, К. Ю. Ультраструктура синапсов в гиппокампе крыс в процессе старения [Текст] / К. Ю. Максимова, С. В. Логвинов, Н. А. Стефанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 49–54.
15. Меркулов, Г. А. Курс патологистологической техники [Текст] / Г. А. Меркулов. – Л.: Медгиз, 1969. – 424 с.
16. Морфологическая реакция астроцитов различных отделов головного мозга мышей при моделировании лихорадки Западного Нила [Текст] / М. В. Шмидт, В. Б. Писарев, А. В. Смирнов, А. М. Бутенко // Архив патологии. – 2006. – Т. 68, № 4. – С. 25–26.
17. Морфологические изменения нейронов областей СА1 и СА3 гиппокампа крыс при хроническом иммобилизационном стрессе (морфометрическое исследование) [Текст] / А. В. Тверской, А. А. Должиков, И. И. Бобынцев, А. А. Крюков, А. Е. Белых // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2014. – № 3. – С. 37–41.
18. Морфология гиппокампа нелинейных белых крыс в постнатальном онтогенезе [Текст] / П. В. Косарева, Н. А. Зимушкина, М. В. Черанёва, В. П.

- Хоринко // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – Т. 49, № 3. – С. 199-200.
19. Одновременное выявление глутаматдекарбоксилазы и синаптофизина в парафиновых срезах мозжечка крыс [Текст] / Д. Э. Коржевский, Е. Г. Гилерович, О. В. Кирик, О. С. Алексеева, И. П. Григорьев // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 1. – С. 74–77.
20. Павлов, А. В. Иммуногистохимическая характеристика возрастных трансформаций клеточного состава сосцевидных тел головного мозга людей разных полов [Текст] / А. В. Павлов, С. В. Савельев // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2013. – № 4. – С. 12–16.
21. Протеомное исследование гиппокампа крыс в условиях эмоционального стресса [Текст] / Н. Э. Шаранова, С. С. Перцов, Н. В. Кирбаева, И. Ю. Торопыгин, Л. С. Калиниченко, М. М. Г. Гаппаров // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 11. – С. 532–536.
22. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинский данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA [Текст] / О. Ю. Реброва – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
23. Роль AMPA-рецепторов в механизмах нейропротективного эффекта ишемического посткондиционирования головного мозга [Текст] / Н. С. Щербак, М. М. Галагудза, Г. Ю. Юкина, Е. Р. Баранцевич, В. В. Томсон, Е. В. Шляхто // Артериальная гипертензия. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 155–163.
24. Саркисов, Д. С. Руководство по гистологической технике [Текст] / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина. – 1996. – 242 с.
25. Стресс, кортикостероидные повреждения гиппокампа и нервно-психическая патология [Текст] / А. А. Должиков, Бобынцев И. И., Белых А. Е., Должикова И. Н. // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2017. – № 2. – С. 98–105.

26. Ультроструктурные и иммуногистохимические изменения миелиновых волокон и олигодендроцитов гигантоклеточного ядра растущих крысят под влиянием острого стресса [Текст] / П. А. Хлопонин, В. Б. Писарев, А. В. Смирнов, А. Я. Почепцов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2004. – № 2. – С. 3–6.
27. Участие NO-синтазной системы в стресс-опосредованных реакциях головного мозга [Текст] / А. В. Ховряков, Е. П. Подрезова, П. П. Кругляков, Н. П. Шиханов, М. Н. Балыкова, Н. В. Семибратова, А. А. Сосунов, Г. Маккханн II, М. Г. Айрапетянц // Морфология. – 2009. – Т. 135, № 2. – С. 7–11.
28. A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory [Text] / J.-P. Mothet, E. Rouaud, P.-M. Sinet, B. Potier, A. Jouvenceau, P. Dutar, C. Videau, J. Epelbaum, J. M. Billard // Aging Cell. – 2006. – Vol. 5. – P. 267–274.
29. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat [Text] / D. A. Clayton, M. H. Mesches, E. Alvarez, P. C. Bickford, M. D. Browning // J. Neurosci. – 2002. – Vol. 22. – P. 3628–3637.
30. A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats [Text] / L. Givalois, G. Naert, F. Rage, G. Ixart, S. Arancibia, L. Tapia-Arancibia // Mol. Cell. Neurosci. – 2004. – Vol. 27. – P. 280–295.
31. Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus [Text] / G. Whitehead, J. Jo, E. L. Hogg, T. Piers, D. H. Kim, G. Seaton, H. Seok, G. Bru-Mercier, G. H. Son, P. Regan, L. Hildebrandt, E. Waite, B. C. Kim, T. L. Kerrigan, K. Kim, D. J. Whitcomb, G. L. Collingridge, S. L. Lightman, K. Cho // Brain. – 2013. – Vol. 136, № 12. – P. 3753–3765.

32. Acute stress regulates phosphorylation of N-methyl-d-aspartate receptor GluN2B at S1284 in hippocampus [Text] / H. Ai, X. F. Shi, X. P. Hu, W. Q., Fang, B. Zhang, W. Lu // *Neuroscience*. – 2017. – Vol. 351. – P. 24-35.
33. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-d-aspartate receptor subtype expression in rats [Text] / W. E. Sonntag, S. A. Bennett, A. S. Khan, P. L. Thornton, X. Xu, R. L. Ingram, J. K. Brunso-Bechtold // *Brain Res. Bull.* – 2000. – Vol. 51. – P. 331–338.
34. Age-dependent requirement of AKAP150-anchored PKA and GluR2-lacking AMPA receptors in LTP [Text] / Y. Lu, M. Allen, A. R. Halt, M. Weisenhaus, R. F. Dallapiazza, D. D. Hall, Y. M. Usachev, G. S. McKnight, J. W. Hell // *EMBO J.* – 2007. – Vol. 26. – P. 4879–4890.
35. Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats [Text] / J. B. Strosznajder, H. Jęćska, A. Zambrzycka, A. Eckert, M. Chalimoniuka // *Neuroscience Letters*. – 2004. – Vol. 370. – P. 175–179.
36. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats [Text] / M. Silhol, V. Bonnichon, F. Rage, L. Tapia-Arancibia // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 132. – P. 613–624.
37. Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex [Text] / P. Liu, P. F. Smith, I. Appleton, C. L. Darlington, D. K. Bilkey // *Neurobiol. Aging*. – 2004. – Vol. 25, № 4. – P. 547–552.
38. Age-related changes in the hippocampus (loss of synaptophysin and glial-synaptic interaction) are modified by systemic treatment with an NCAM-derived peptide, FGL [Text] / B. Ojo, P. Rezaie, P. L. Gabbott, H. Davies, F. Colyer, T. R. Cowley, M. Lynch, M. G. Stewart // *Brain Behav. Immun.* – 2012. – Vol. 26, № 5. – P. 778–788.
39. Age-related changes in the rat hippocampus [Text] / M. Is, N. U. Comunoglu, C. Comunoglu, B. Eren, I. D. Ekici, F. Ozkan // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2008. – Vol. 15. – P. 568–574.

40. Aging in Down syndrome and the development of Alzheimer's disease neuropathology [Text] / E. Head, I. T. Lott, D. M. Wilcock, C. A. Lemere // *Curr. Alzheimer Res.* – 2016. – Vol. 13. – P. 18–29.
41. Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum [Text] / Y. Geinisman, O. Ganeshina, R. Yoshida, R. W. Berry, J. F. Disterhoft, M. Gallagher // *Neurobiology of Aging.* – 2004. – Vol. 25. – P. 407–416.
42. Aging-related alterations in the expression and distribution of GluR2 and PICK1 in the rat hippocampus [Text] / D. F. Yu, P. F. Wu, H. Fu, J. Cheng, Y. J. Yang, T. Chen, L. H. Long, J. G. Chen, F. Wang // *Neurosci. Lett.* – 2011. – Vol. 497, № 1. – P. 42–45.
43. Aging-related impairments of hippocampal mossy fibers synapses on CA3 pyramidal cells [Text] / C. Villanueva-Castillo, C. Tecuatl, G. Herrera-López, E. J. Galván // *Neurobiol. Aging.* – 2017. – Vol. 49. – P. 119–137.
44. Ahima, R. S. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system [Text] / R. S. Ahima, R. E. Harlan // *Neuroscience.* – 1990. – Vol. 39. – P. 579–604.
45. Alkadhi, K. A. Chronic psychosocial stress exposes Alzheimer's disease phenotype in a novel at-risk model [Text] / K. A. Alkadhi // *Front. Biosci.* – 2012. – Vol. 4. – P. 214–229.
46. Alleva, E. Psychosocial vs. “physical” stress situations in rodents and humans: role of neurotrophins [Text] / E. Alleva, D. Santucci // *Physiol Behav.* – 2001. – Vol. 73, №3. – P. 313–320.
47. Altered functional brain network connectivity and glutamate system function in transgenic mice expressing truncated Disrupted-in-Schizophrenia 1 [Electronic resource] / N. Dawson, M. Kurihara, D. M. Thomson, C. L. Winchester, A. McVie, J. R. Hedde, A. D. Randall, S. Shen, P. A. Seymour, Z. A. Hughes, J. Dunlop, J. T. Brown, N. J. Brandon, B. J. Morris, J. A. Pratt // *Transl. Psychiatry.* 2015. – Vol. – 5. – Режим доступа: <http://www.nature.com/tp/journal/v5/n5/full/tp201560a.html?foxtrotcallback=true>

48. Armstrong, R. A. What causes alzheimer's disease? [Text] / R. A. Armstrong // *Folia Neuropathol.* 2013. Vol. 51. P. 169–188.
49. Arszovszki, A., Three axonal projection routes of individual pyramidal cells in the ventral CA1 hippocampus [Text] / A. Arszovszki, Z. Borhegyi, T. Klausberger // *Front. Neuroanat.* – 2014. – Vol. 25. – P. 8-53.
50. Arundine, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity [Text] / M. Arundine, M. Tymianski // *Cell Calcium.* – 2003. – Vol. 34. – P. 325–337.
51. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease [Text] / J. J. Rodriguez-Arellano, V. Parpura, R. Zorec, A. Verkhratsky // *Neuroscience.* – 2016. – Vol. 323. – P. 170–182.
52. Astrocytic hypertrophy and altered GFAP degradation with age in subcortical white matter of the rhesus monkey [Text] / J. A. Sloane, W. Hollander, D. L. Rosene, M. B. Moss, T. Kemper, C. R. Abraham // *Brain Res.* – 2000. – Vol. 862. – P. 1–10.
53. Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats [Text] / P. Sampedro-Piquero, P. De Bartolo, L. Petrosini, C. Zancada-Menendez, J. L. Arias, A. Begega // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2014. – Vol. 114. – P. 16–25.
54. Austin, S. A. Endotelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein [Text] / S. A. Austin, A. V. Santhanam, Z. S. Katusic // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 107, № 12. – P. 1498–1502.
55. Autophagic death of adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal [Text] / S. W. Yu, S. H. Baek, R. T. Brennan, C. J. Bradley, S. K. Park, Y. S. Lee, E. J. Jun, K. J. Lookingland, E. K. Kim, H. Lee, J. L. Goudreau, S. W. Kim // *Stem. Cells.* – 2008. – Vol. 26, №10. – P. 2602-2610.
56. Autophagy activation aggravates neuronal injury in the hippocampus of vascular dementia rats [Text] / B. Liu, J. Tang, J. Zhang, S. Li, M. Yuan, R. Wang // *Neural. Regen. Res.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1288-1296.

57. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy [Text] / C. C. Tan, J. T. Yu, M. S. Tan, T. Jiang, X. C. Zhu, L. Tan // *Neurobiol Aging*. – 2014. – Vol. 35. – P. 941-957.
58. BACE1 in Alzheimer's disease [Text] / M. Sathya, P. Premkumar, C. Karthick, P. Moorthi, R. S. Jayachandran, M. Anusuyadevi // *Clin. Chim. Acta*. – 2012. – Vol. 414. – P. 171–178.
59. Bartsch, T. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability [Text] / T. Bartsch, P. Wulff // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 309. – P. 1-16.
60. Bartzokis, G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease [Text] / G. Bartzokis // *Neurobiol. Aging*. 2004. – Vol. 25. – P. 5–18.
61. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity [Electronic resource] / P. Kowiański, G. Lietzau, E. Czuba, M. Waśkow, A. Steliga, J. Moryś // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2017. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>.
62. Bell, R. D. Neurovascular mechanisms and blood brain barrier disorder in Alzheimer's disease [Text] / R. D. Bell, B. V. Zlokovic // *Acta Neuropathol.* – 2009. – Vol. 118. – P. 103–113.
63. Bettio, L. E. B. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline [Text] / L. E. B. Bettio, L. Rajendran, J. Gil-Mohapel // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2017. – Vol. 79. P. 66-86.
64. Billard, J. M. D-Serine in the aging hippocampus [Text] / J. M. Billard // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – Vol. 116. P. 18–24.
65. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease [Text] / E. R de Kloet, E. Vreugdenhil, M. S Oitzl, M. Joëls // *Endocr. Rev.* – 1998. – Vol. 19, № 3. – P. 269–301.
66. Burda, J. E. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease [Text] / J. E. Burda, M. V. Sofroniew // *Neuron*. – 2014. – Vol. 81. P. 229–248.

67. Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression [Text] / K. Eckles-Smith, D. Clayton, P. Bickford, M. D. Browning // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2000. – Vol. 78. – P. 154–162.
68. Castro, S. L. Stress-induced increase in extracellular dopamine in striatum: role of glutamatergic action via N-methyl-D-aspartate receptors in substantia nigra [Text] / S. L. Castro, M. J. Zigmond // *Brain Res.* – 2001. – Vol. 901. – P. 47–54.
69. Cenquizca, L. A. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex [Text] / L. A. Cenquizca, L. W. Swanson // *Brain. Res. Rev.* – 2007. – Vol. 56. – P. 1–26.
70. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness [Text] / J. P. Herman, H. Figueiredo, N. K. Mueller, Y. Ulrich-Lai, M. M. Ostrander, D. C. Choi, W. E. Cullinan // *Front. Neuroendocrinol.* – 2003. – Vol. 24. – P. 151–180.
71. Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins [Text] / J. Xia, H. J. Chung, C. Wihler, R. L. Huganir, D. J. Linden // *Neuron.* – 2000. – Vol. 28. – P. 499–510.
72. Chakraborti, A. Involvement of nitric oxide in the protective effects of dehydroepiandrosterone sulphate on stress induced neurobehavioral suppression and brain oxidative injury in rats [Text] / A. Chakraborti, K. Gulati, A. Ray // *Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 652. – P. 55–59.
73. Chalimoniuk, M. Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain [Text] / M. Chalimoniuk, J. B. Strosznajder // *Neurochem. Int.* – 2003. – Vol. 42. – P. 315–322.
74. Chambers, R. A. Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions: an animal model of dual diagnosis schizophrenia [Text] / R. A. Chambers, D. W. Self // *Neuropsychopharmacology.* – 2002. – Vol. 27. – P. 889–905.
75. Changes in iNOS, GFAP and NR1 expression in various brain regions and elevation of sphingosine-1-phosphate in serum after immobilized stress [Text] /

- S. Jang, S. H. Suh, H. S. Yoo, Y. M. Lee, S. Oh // *Neurochem. Res.* – 2008. – Vol. 33. – P. 842–851.
76. Chronic restraint stress triggers the dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration: possible role of chronic stress for the onset of Parkinson's disease [Electronic resource] / S. Sugama, K. Sekiyama, T. Kodama, Y. Takamatsu, T. Takenouchi, M. Hashimoto, C. Bruno, Y. Kakinuma // *Brain, Behavior, and Immunity.* – 2015. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.015>.
77. Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy [Text] / J. C. Carroll, M. Iba, D. A. Bangasser, R. J. Valentino, M. J. James, K. R. Brunden, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski // *The Journal of Neuroscience.* – 2011. – Vol. 31, № 40. – P.14436–14449.
78. Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors [Text] / K. M. Christian, A. D. Miracle, C. L. Wellman, K. Nakazawa // *Neuroscience.* – 2011. – Vol. 174. – P. 26-36.
79. Cirulli, F. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology [Text] / F. Cirulli, E. Alleva // *Front Neuroendocrinol.* – 2009. – Vol. 30. – P. 379–395.
80. Clayton, D.A. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats [Text] / D. A. Clayton, M. D. Browning // *Neurobiol. Aging.* – 2001. – Vol. 22. – P. 165–168.
81. Cloned glutamate receptors [Text] / M. Hollmann, S. Heinemann // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1994. – Vol. 17. – P. 31–108.
82. Cognitive correlates of white matter growth and stress hormones in female squirrel monkey adults [Text] / D. M. Lyons, C. Yang, S. Eliez, A. L. Reiss, A. F. Schatzberg // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. – P. 3655–3662.

83. Coleman, P. A. focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias [Text] / P. Coleman, H. Federoff, R. Kurlan // *Neurology*. – 2004. – Vol. 63. – P. 1155–1162.
84. Comparison of methods for measuring longitudinal brain change in cognitive impairment and dementia [Text] / V. A. Cardenas, A. T. Du, D. Hardin, F. Ezekiel, P. Weber, W. J. Jagust, H. C. Chui, N. Schuff, M. W. Weiner // *Neurobiol. Aging*. – 2003. – Vol. 24. – P. 537–544.
85. Comparison of the influence of two models of mild stress on hippocampal brain-derived neurotrophin factor (BDNF) immunoreactivity in old age rats [Text] / E. Badowska-Szalewska, B. Ludkiewicz, R. Krawczyk, N. Melka, J. Moryś // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. – 2017. – Vol. 77, № 1. – P. 68–76.
86. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain [Text] / J. J. Rodriguez, C. Y. Yeh, S. Terzieva, M. Olabarria, M. Kulijewicz-Nawrot, A. Verkhratsky // *Neurobiol. Aging*. – 2014. – Vol. 35. – P. 15–23.
87. Conrad, C. D. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory [Text] / C. D. Conrad // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2010. – Vol. 34, № 5. – P. 742-755.
88. Conrad, C. D. Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations [Text] / C. D. Conrad, J. B. Ortiz, J. M. Judd // *Physiol. Behav.* – 2017. – Vol. 178. – P. 66-81.
89. Conrad, C. D. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis [Text] / C. D. Conrad // *Reviews in the Neurosciences*. – 2008. – Vol. 19, № 6. – P. 395-412.
90. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits [Text] / S. J. Lupien, M. de Leon, S. de Santi, A. Convit, C. Tarshish, N. P. Nair, M. Thakur, B. S. McEwen, R. L. Hauger, M. J. Meaney // *Nat. Neurosci.* – 1998. – Vol. 1, № 4. – P. 69–73.
91. DAPK1 Interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [Text] / W. Tu, X. Xu, L. Peng, X. Zhong, W. Zhang, M. M.

- Soundarapandian, C. Balel, M. Wang, N. Jia, W. Zhang, F. Lew, S. L. Chan, Y. Chen, Y. Lu // *Cell*. – 2010. – Vol. 140, № 2. – P. 222–234.
92. Daulatzai, M. A. Role of stress, depression, and aging in cognitive decline and Alzheimer's disease [Text] / M.A. Daulatzai // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* – 2014. – Vol. 18. – P. 265–296.
93. de Kloet, E. R. Stress and the brain: from adaptation to disease [Text] / E. R. de Kloet, M. Joëls, F. Holsboer // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. – P. 463–475.
94. Depression and incident Alzheimer disease: the impact of disease severity [Text] / P. Gracia-Garcia, C. de-la-Camara, J. Santabarbara, R. Lopez-Anton, M. A. Quintanilla, T. Ventura, G. Marcos, A. Campayo, P. Saz, C. Lyketsos, A. Lobo // *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. – 2015. – Vol. 23. – P. 119–129.
95. Depressive symptoms, clinical AD, and cortical plaques and tangles in older persons [Text] / R. S. Wilson, J. A. Schneider, J. L. Bienias, S. E. Arnold, D. A. Evans, D. A. Bennett // *Neurology*. – 2003. – Vol. 61. – P. 1102–1107
96. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine [Electronic resource] / K. Suzuki, K. Okada, T. Wakuda, C. Shinmura, Y. Kamenno, K. Iwata, T. Takahashi, S. Suda, H. Matsuzaki, Y. Iwata, K. Hashimoto, N. Mori // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009260>.
97. Different implications of the dorsal and ventral hippocampus on contextual memory retrieval after stress [Electronic resource] / C. Pierard, R. Dorey, N. Henkous, N. Mons, D. Béracochéa // *Hippocampus*. – 2017. – Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.22748/abstract>.
98. Differential palmitoylation directs the AMPA receptor-binding protein ABP to spines or to intracellular clusters [Text] / S. DeSouza, J. Fu, B. A. States, E. B. Ziff // *J. Neurosci.* – 2002. – Vol. 22. – P. 3493–3503.
99. Differential response of hippocampal subregions to stress and learning [Electronic resource] / D. F. Hawley, K. Morch, B. R. Christie, J. L. Leasure //

PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 12. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053126>.

100. DISC1 regulates trafficking and processing of APP and Abeta generation [Text] / N. Shahani, S. Seshadri, H. Jaaro-Peled, K. Ishizuka, Y. Hirota-Tsuyada, Q. Wang, M. Koga, T. W. Sedlak, C. Korth, N. J. Brandon, A. Kamiya, S. Subramaniam, T. Tomoda, A. Sawa // *Mol. Psychiatry*. – 2015. – Vol. 20. – P. 874–879.
101. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within subject, within-task comparison of reference and working spatial memory [Text] / H. H. J. Pothuizen, W.-N. Zhang, A. L. Jongen-Re[^]lo, J. Feldon, B. K. Yee // *Eur. J. Neurosci*. – 2004. – Vol. 19. – P. 705–712.
102. Doherty, G. N. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories [Text] / G. N. Doherty // *Neurosci. Bull*. – 2011. – Vol. 27, № 6. – P. 366-382.
103. Dolorfo, C. L. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections [Text] / C. L. Dolorfo, D. G. Amaral // *J. Comp. Neurol*. – 1998. – Vol. 398. – P. 49-82.
104. Domek-Łopacińska, K. U. Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and Alzheimer's disease [Text] / K. U. Domek-Łopacińska, J. B. Strosznajder // *Mol. Neurobiol*. – 2010. – Vol. 41. – P. 129–137.
105. Dorsal and ventral hippocampus modulate autonomic responses but not behavioral consequences associated to acute restraint stress in rats [Electronic resource] / A. A. Scopinho, S. F. Lisboa, F. S. Guimarães, F. M. Corrêa, L. B. Resstel, S. R. Joca // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 10. – Режим доступа: <http://doi.org.oiolo.sci-hub.ac/10.1371/journal.pone.0077750>.
106. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia [Text] / D. M. Bannerman, R. M. J. Deacon, S. Offen, J. Friswell, M. Grubb, J. N. P. Rawlins // *Behav. Neurosci*. – 2002. – Vol. 116. – P. 884–901.

107. Driscoll, I. The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments [Text] / I. Driscoll, R. J. Sutherland // *Reviews in the Neurosciences*. – 2005. – Vol. 16. – P. 87-121.
108. D-serine prevents cognitive deficits induced by acute stress [Text] / G. D. Guercio, L. Bevictori, C. Vargas-Lopes, C. Madeira, A. Oliveira, V. F. Carvalho, J. C. d'Avila, R. Panizzutti // *Neuropharmacology*. – 2014. – Vol. 86. – P. 1–8.
109. Dual cross-talk between nitric oxide and D-Serine in astrocytes and neurons in the brain [Text] / E. Darra, F. H. Ebner, K. Shoji, H. Suzuki, S. Mariotto // *Cent. Nerv. Syst. Agents. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 289–294.
110. Early mood behavioral changes following exposure to monotonous environment during isolation stress is associated with altered hippocampal synaptic plasticity in male rats [Text] / S. K. Das, I. Baitharu, K. Barhwal, S. K. Hota, S. B. Singh // *Neuroscience Letters*. – 2016. – Vol. 612. – P. 231–237.
111. Effect of aging on the basal expression of c-Fos, c-Jun, and Egr-1 proteins in the hippocampus [Text] / S. Desjardins, W. Mayo, M. Vallee, D. Hancock, M. Le Moal, H. Simon, D. N. Abrous // *Neurobiology of Aging*. – 1997. – Vol. 18, № 1. – P. 37– 44.
112. Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions [Text] / L. H. Burns, L. Annett, A. E. Kelley, B. J. Everitt, T. W. Robbins // *Behav. Neurosci.* – 1996. – Vol. 110. – P. 60–73.
113. Effects of unpredictable chronic stress on behavior and brain-derived neurotrophic factor expression in CA3 subfield and dentate gyrus of the hippocampus in different aged rats [Text] / Y. Li, Y. J. Ji, H. Jiang, D. X. Liu, Q. Zhang, S. J. Fan, F. Pan // *Chin. Med. J.* – 2009. – Vol. 122. – P. 1564–1569.
114. Electron microscopic analysis of hippocampal axo-somatic synapses in a chronic stress model for depression [Text] / D. Csabai, L. Seress, Z. Varga, H. Ábrahám, A. Miseta, O. Wiborg, B. Czéh // *Hippocampus*. – 2017. – Vol. 27, № 1. – P.17-27.

115. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice [Text] / J. Chen, A. Zacharek, C. Zhang, H. Jiang, Y. Li, C. Roberts, M. Lu, A. Kapke, M. Chopp // *The Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 25, № 9. – P. 2366–2375.
116. Enriched environment and physical activity reverse astroglial degeneration in the hippocampus of AD transgenic mice [Electronic resource] / J. J. Rodriguez, S. Terzieva, M. Olabarria, R. G. Lanza, A. Verkhratsky // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – Режим доступа: <http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n6/full/cddis2013194a.html?foxtrotcallback=true>.
117. Environmental stress increases extracellular dopamine in striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats: in vivo microdialysis studies [Text] / K. A. Keefe, E. M. Stricker, M. J. Zigmond, E. D. Abercrombie // *Brain Res.* – 1990. – Vol. 527. – P. 350–353.
118. Experimental research on nitric oxide and the therapy of Alzheimer disease: a challenging bridge [Text] / R. Siciliano, E. Barone, V. Calabrese, V. Rispoliv, D. A. Butterfield, C. Mancuso // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2011. – Vol. 10, № 7. – P. 766–776.
119. Falougy, El. The microscopical structure of the hippocampus in the rat [Text] / El. Falougy, E. Kubikova, J. Benuska // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2008. – Vol. 109, №3. – P. 106–110.
120. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis [Text] / D. Rossi, L. Brambilla, C. F. Valori, C. Roncoroni, A. Crugnola, T. Yokota, D. E. Bredesen, A. Volterra // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol. 15. – P. 1691–1700.
121. Foster, T. C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain [Text] / T. C. Foster // *Aging Cell.* – 2007. – Vol. 6. – P. 319–325.
122. Freund, T. F. Interneurons of the hippocampus [Text] / T. F. Freund, G. Buzsa'ki // *Hippocampus.* – 1996. – Vol. 6, № 4. – P. 347–470.

123. Frodl, T. Is there an association between peripheral immune markers and structural/functional neuroimaging findings? [Text] / T. Frodl, F. Amico // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. – 2014. – Vol. 48. – P. 295–303.
124. Fujikawa, D. G. *Acute Neuronal Injury: the role of excitotoxic programmed cell death mechanisms* [Text] / D. G. Fujikawa. – New York: Springer, 2010. – 306 p.
125. Functional connectivity from the amygdala to the hippocampus grows stronger after stress [Text] / S. Ghosh, T. R. Laxmi, S. Chattarji // *The Journal of Neuroscience*. – 2013. – Vol. 33. – P. 7234–7244
126. Genetic variation in white matter hyperintensity volume in the Framingham Study [Text] / L. D. Atwood, P. A. Wolf, N. L. Heard-Costa, J. M. Massaro, A. Beiser, R. B. D'Agostino, C. DeCarli // *Stroke*. – 2004. – Vol. 35. – P. 1609–1613.
127. Glutamatergic regulation of serine racemase via reversal of PIP2 inhibition [Text] / A. K. Mustafa, D. B. van Rossum, R. L. Patterson, D. Maag, J. T. Ehmsen, S. K. Gazi, A. Chakraborty, R. K. Barrow, L. M. Amzel, S. H. Snyder // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol.106. – P. 2921–2926.
128. Gray, J. D. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors [Text] / J. D. Gray, T. A. Milner, B. S. McEwen // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. –239. – P. 214–227.
129. Grigoryan, G. Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus [Electronic resource] / G. Grigoryan, M. Segal // *Neural. Plasticity*. – 2016. – Vol. 2016. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2540462>.
130. Hall, E. D. Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury [Text] / E. D. Hall, J. A. Wang, D. M. Miller // *Exp. Neurol*. – 2012. – Vol. 238, № 2. – P. 176–182.
131. Hayflick, L. Biological aging is no longer an unsolved problem [Text] / L. Hayflick // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 1100. – 1–13.

132. Hazell, A. S. Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy [Text] / A. S. Hazell // *Neurochem. Int.* – 2009. – Vol. 55. – P. 129–135.
133. Hemmerle, A. M. Stress, depression and Parkinson's disease [Text] / A. M. Hemmerle, J. P. Herman, K. B. Seroogy // *Experimental. Neurology.* – 2012. – Vol. 233. – P. 79–86.
134. Herman, J. P. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis [Text] / J. P. Herman, W. E. Cullinan // *Trends. Neurosci.* – 1997. – Vol. 20. – P. 78–84.
135. Herman, J. P. Regulation of adrenocorticosteroid receptor mRNA expression in the central nervous system [Text] / J. P. Herman // *Cell Mol. Neurobiol.* – 1993. – Vol. – 13. – P. 349–372.
136. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression [Text] / T. Frodl, E. M. Meisenzahl, T. Zetzsche, C. Born, C. Groll, M. Jager, G. Leinsinger, R. Bottlender, K. Hahn, H.-J. Moller // *Am. J. Psychiatr.* – 2002. – Vol. 159. – P. 1112–1118.
137. Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice [Text] / M. E. Calhoun, D. Kurth, A. L. Phinney, J. M. Long, J. Hengemihle, P. R. Mouton, D. K. Ingram, M. Jucker // *Neurobiol. Aging.* – 1998. – Vol. 19, №6. – P. 599–606.
138. Hippocampal nitric oxide synthase and arginase and age-associated behavioral deficits [Text] / P. Liu, P. F. Smith, I. Appleton, C. L. Darlington, D. K. Bilkey // *Hippocampus.* – 2005. – Vol. 15, № 5. – P. 642–655.
139. Hippocampal size and memory function in the ninth and tenth decades of life: the Sydney older persons study [Text] / T. C. Lye, O. Piguet, D. A. Grayson, H. Creasey, L. J. Ridley, H. P. Bennett, G. A. Broe // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* – 2004. – Vol. 75. – P. 548–554.
140. Homocysteine and B vitamins relate to brain volume and white-matter changes in geriatric patients with psychiatric disorders [Text] / T. M. Scott, K. L. Tucker, A. Bhadelia, B. Benjamin, S. Patz, R. Bhadelia, E. Liebson, L. L. Price,

- J. Griffith, I. Rosenberg, M. F. Folstein // *Am. J. Geriatr. Psychiatr.* – 2004. – Vol. 12. – P. 631–638.
141. Hosseini-Sharifabad, M. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus [Text] / M. Hosseini-Sharifabad, H. Hadinedoushan // *Anatomical Science International.* – 2007. – Vol. 82. – P. 211–217.
142. HSP70 expression in the hippocampal CA3 subfield in different chronic stress models [Text] / Q. Li, F. Pan, X. Y. Chen, H. Jiang, H. J. Zhang, H. L. Yu, C. Y. Lu // *Chin. J. Physiol.* – 2006. – Vol. 49, № 3. – P. 119–125.
143. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress [Electronic resource] / Y. L. Peng, Y. N. Liu, L. Liu, X. Wang, C.-L. Jiang, Y.-X. Wang // *Journal of Neuroinflammation.* – 2012. – Vol. 75. – Режим доступа: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/75>.
144. Jacobson, L. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis [Text] / L. Jacobson, R. Sapolsky // *Endocr. Rev.* – 1991. – Vol. 12. P. 118–134.
145. Jernigan, T. L. White matter mapping is needed [Text] / T. L. Jernigan, C. Fennema-Notestine // *Neurobiol. Aging.* – 2004. – Vol. 25. – P. 37–39.
146. Jiang, T. Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age [Text] / T. Jiang, E. Cadenas // *Aging Cell.* – 2014. – Vol. 13. – P. 1059–1067.
147. Joshi, Y. B. Stress hormone leads to memory deficits and altered tau phosphorylation in a model of Alzheimer's disease [Text] / Y. B. Joshi, J. Chu, D. Pratico // *J. Alzheimers Dis.* – 2012. – Vol. 31. – P. 167–176.
148. Karst, H. Effect of chronic stress on synaptic currents in rat hippocampal dentate gyrus neurons [Text] / H. Karst, M. Joëls // *J. Neurophysiol.* – 2003. – Vol. 89. – P. 625–633.
149. Katusic, Z. S. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind [Text] / Z. S. Katusic, S. A. Austin // *Eur. Heart. J.* – 2014. – Vol. 35. – P. 888–894.

150. Keifer, J. AMPA receptor trafficking and learning [Text] / J. Keifer, Z. Zheng // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 32, № 2. – P. 269-77.
151. Kharazia, V. N. Tangential synaptic distribution of NMDA and AMPA receptors in rat neocortex [Text] / V. N. Kharazia, R. J. Weinberg // *Neurosci. Lett.* – 1997. – Vol. 238. – P. 41–44.
152. Kim, E. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review [Text] / E. J. Kim, B. Pellman, J. J. Kim // *Learn. Mem.* – 2015. – Vol. 22, № 9. – P. 411-416.
153. Knott, A. B. Nitric oxide in health and disease of the nervous system [Text] / A. B. Knott, E. Bossy-Wetzel // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 541–553.
154. Lee, J. M. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms [Text] / J. M. Lee, G. J. Zipfel, D. W. Choi // *Nature.* – 1999. – Vol. 399. – P. A7–14.
155. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat [Text] / D. C. Blanchard, N. S. Canteras, C. M. Markham, N. S. Pentkowski, R. J. Blanchard // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1243–1253.
156. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis [Text] / J. P. Herman, M. M. Ostrander, N. K. Mueller, H. Figueiredo // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1201–1213.
157. Liu, P. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging [Text] / P. Liu, P. F. Smith, C. L. Darlington // *Synapse.* – 2008. – Vol. 62. – P. 834–841.
158. Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine [Text] / M. T. Heneka, F. Nadrigny, T. Regen, A. Martinez-Hernandez, L. Dumitrescu-Ozimek, D. Terwel, D. Jardanhazi-Kurutz, J. Walter, F. Kirchhoff, U. K. Hanisch, M. P. Kummer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 6058–6063.

159. Lowy, M. T. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats [Text] / M. T. Lowy, L. Wittenberg, B. K. Yamamoto // *J Neurochem.* – 1995. – Vol. 65, № 1. – P. 268–274.
160. Lu, W. PICK1 interacts with ABP/GRIP to regulate AMPA receptor trafficking [Text] / W. Lu, E. B. Ziff // *Neuron.* – 2005. – Vol. 47. – P. 407–421.
161. Mabandla, M. V. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats [Text] / M. V. Mabandla, V. A. Russell // *Behav. Brain Res.* – 2010. – Vol. 211. – P. 16–22.
162. Macht, M. Stress affects hedonic responses but not reaching-grasping in Parkinson's disease [Text] / M. Macht, S. Brandstetter, H. Ellgring // *Behav. Brain Res.* – 2007. – Vol. 177. – P. 171–174.
163. Magnusson, K. R. Young Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor [Text] / K. R. Magnusson, S. E. Nelson, A. B. Young // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2002. – Vol. 99. – P. 40–45.
164. Martins, I. Hormesis, cell death and aging [Text] / I. Martins, L. Galluzzi, G. Kroemer // *Aging (Albany NY).* – 2011. – Vol. 3. – P. 821-828.
165. Maternal separation exaggerates the toxic effects of 6-hydroxydopamine in rats: implications for neurodegenerative disorders [Text] / I. S. Pienaar, L. A. Kellaway, V. A. Russell, A. D. Smith, D. J. Stein, M. J. Zigmond, W. M. Daniels // *Stress.* – 2008. – Vol. 11. – P. 448–456.
166. Matthews, K. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat [Text] / K. Matthews, T. W. Robbins // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2003. – Vol. 27. – P. 45–55.
167. Mattson, M. P. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin [Text] / M. P. Mattson, S. Maudsley, B. Martin // *Ageing Res. Rev.* – 2004. – Vol. 3. – P. 445–464.
168. Mattson, M. P. Ageing and neuronal vulnerability [Text] / M. P. Mattson, T. Magnus // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 7, № 4. – P. 278–294.

169. McAllister, A. K. Neurotrophins and synaptic plasticity [Text] / A. K. McAllister, L. C. Katz, D. C. Lo // *Annu Rev. Neurosci.* – 1999. – Vol. 22. – P. 295–318.
170. McEwen, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators [Text] / B. S. McEwen // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 338. – P. 171–179.
171. McEwen, B. S. Stress and hippocampal plasticity [Text] / B. S. McEwen // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1999. – Vol. 22. – P.105–122.
172. McEwen, B. S. Stress and hippocampal plasticity: Implications for the pathophysiology of affective disorders [Text] / B. S. McEwen, A. M. Magarinos // *Hum. Psychopharmacol.* – 2001. – Vol. 16. – P. S7–S19.
173. McEwen, B. S. Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex [Text] / B. S. McEwen, C. Nasca, J. D. Gray // *Neuropsychopharmacology.* –2016. – Vol. 41, № 1. – P. 3-23.
174. Metz, G. A. Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior [Text] / G. A. Metz, N. M. Jadavji, L. K. Smith // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 22. – P. 1190–1200.
175. Metz, G. A. Stress as a modulator of motor system function and pathology [Text] / G. A. Metz // *Rev. Neurosci.* – 2007. – Vol. 18. – P. 209–222.
176. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism [Text] / F. Ros-Bernal, S. Hunot, M. T. Herrero, S. Parnadeau, J. C. Corvol, L. Lu, D. Alvarez-Fischer, M. A. Carrillo-de Sauvage, F. Saurini, C. Coussieu, K. Kinugawa, A. Prigent, G. Höglinger, M. Hamon, F. Tronche, E. C. Hirsch, S. Vyas // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 6632–6637.
177. Miller D. B. Aging, stress and the hippocampus [Text] / D. B. Miller, J. P. O’Callaghan // *Ageing Research Reviews.* – 2005. – Vol. 4, № 2. – P. 123–140.
178. Modification of hippocampal markers of synaptic plasticity by memantine in animal models of acute and repeated restraint stress: implications for memory and behavior [Text] / S. N. Amin, A. A. El-Aidi, M. M. Ali., Y. M. Attia, L. A. Rashed // *Neuromol. Med.* – 2015. – Vol. 17, № 2. – P.121 – 136.

179. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection [Text] / D. A. Turner, E. H. Buhl, N. P. Hailer, R. Nitsch // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – Vol. 55, № 6. – P. 537–562.
180. Mravec, B. Brain under stress and Alzheimer's Disease [Electronic resource] / B. Mravec, L. Horvathova, A. Padova // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2017. – Режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10571-017-0521-1>.
181. Muller, U. C. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family [Text] / U. C. Muller, T. Deller, M. Korte // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 281–298.
182. Mutagenesis reveals a role for ABP/GRIP binding to GluR2 in synaptic surface accumulation of the AMPA receptor [Text] / P. Osten, L. Khatri, J. L. Perez, G. Kohr, G. Giese, C. Daly, T. W. Schulz, A. Wensky, L. M. Lee, E. B. Ziff // *Neuron.* – 2000. – Vol. 27. – P. 313–325.
183. Nagatsu, T. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines [Text] / T. Nagatsu, M. Sawada // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11. – P. 999–1016.
184. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression [Text] / M. N. Hill, K. G. Hellemans, P. Verma, B. B. Gorzalka, J. Weinberg // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2012. – Vol. 36. – P. 2085–2117.
185. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease [Text] / M. T. Heneka, M. K. O'Banion, D. Terwel, M. P. Kummer // *Journal of neural transmission.* – 2010. – Vol. 117. – P. 919–947.
186. Neurons from senescence accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol [Text] / R. Cristofol, D. Porquet, R. Corpas, A. Coto-Montes, J. Serret, A. Camins, M. Pallas, C. Sanfeliu // *J. Pineal. Res.* – 2012. – Vol. 52, № 3. – P. 271–281.
187. Neuropathology of stress [Text] / P. J. Lucassen, J. Pruessner, N. Sousa, F. X. Osborne, O. F. X. Almeida, A. M. Van Dam, G. Rajkowska, D. F. Swaab, B.

- Boldizsár Czéh // *Neuropathology of stress*. // *Acta Neuropathol.* – 2014. – Vol. 127. – P. 109–135.
188. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function [Text] / M. E. Greenberg, B. Xu, B. Lu, B. L. Hempstead // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29. P. 12764–12767.
189. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease [Text] / L. Tapia-Arancibia, E. Aliaga, M. Silhol, S. Arancibia // *Brain Res. Rev.* – 2008. – Vol. 59. – P. 201–220.
190. Niccoli, T. Ageing as a risk factor for disease [Text] / T. Niccoli, L. Partridge // *Current Biology.* – 2012. – Vol. 22. – P. R741-R752.
191. Nichols, N. R. Do glucocorticoids contribute to brain aging? [Text] / N. R. Nichols, M. Zieba, N. Bye // *Brain Res. Rev.* – 2001. – Vol. 37. – P. 273–286.
192. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes [Text] / V. Calabrese, D. Boyd-Kimball, G. Scapagnini G., D. A. Butterfield // *in vivo.* – 2004. Vol. 18. – P. 245–268.
193. Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease [Text] / G. Aliev, H. H. Palacios, A.E. Lipsitt, K. Fischbach, B. T. Lamb, M. E. Obrenovich, L. Morales, E. Gasimov, V. Bragin // *Neurotox. Res.* – 2009. – Vol. 16, № 3. – P. 293–305.
194. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity [Text] / V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, A. M. G. Stella // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – Vol. 8, № 10. – P. 766–775.
195. Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation [Text] / A. K. Mustafa, M. Kumar, B. Selvakumar, G. P. H. Ho, J. T. Ehmsen, R. K. Barrow, L. M. Amzel, S. H. Snyder // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, № 8. – P. 2950–2955.
196. Overexpressing the glucocorticoid receptor in forebrain causes an aging-like neuroendocrine phenotype and mild cognitive dysfunction [Text] / Q. Wei,

- E. K. Hebda-Bauer, A. Pletsch, J. Luo, M. T. Hoversten, A. J. Osetek, S. J. Evans, S. J. Watson, A. F. Seasholtz, H. Akil // *The Journal of Neuroscience*. – 2007. – Vol. 33, № 27. – P. 8836–8844.
197. Pathological changes in hippocampal neuronal circuits underlie age-associated neurodegeneration and memory loss: positive clue toward SAD [Text] / P. Moorthi, P. Premkumar, R. Priyanka, K. S. Jayachandran, M. Anusuyadevi // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 301. – P. 90–105.
198. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates [Text] / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – New York (NY): Elsevier Academic Press., 2007.
199. Pekny, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis [Text] / M. Pekny, U. Wilhelmsson, M. Pekna // *Neurosci. Lett.* – 2014. – Vol. 565. – P. 30–38.
200. Peric, A. Early etiology of Alzheimer’s disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? [Text] / A. Peric, W. Annaert // *Acta Neuropathol.* – 2015. – Vol. 129. – P. 363–381.
201. Perry, V. H. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration [Text] / V. H. Perry, C. Cunningham, C. Holmes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7, № 2. – P. 161–167.
202. PICK1 binds to calcineurin B and modulates the NFAT activity in PC12 cells [Text] / T. Iida, H. Egusa, M. Saeki, H. Yatani, Y. Kamisaki // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 375. – P. 655–659.
203. PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast twohybrid system [Text] / J. Staudinger, J. Zhou, R. Burgess, S. J. Elledge, E. N. Olson // *J. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 128. – P. 263–271.
204. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions [Text] / R. G. Morris, P. Garrud, J. N. Rawlins, J. O’Keefe // *Nature*. – 1982. – Vol. 297. – P. 681–683.
205. Poo, M. Neurotrophins as synaptic modulators [Text] / M. Poo // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – Vol. 2. – P. 24–32.

206. Postnatal stress induced by injection with valproate leads to developing emotional disorders along with molecular and cellular changes in the hippocampus and amygdala [Text] / C. Y. Wang, C. W. Cheng, W. H. Wang, P. S. Chen, S. F. Tzeng // *Mol. Neurobiol.* – 2016. – Vol. 53, № 10. – P. 6774-6785.
207. Posttraumatic stress disorder-like induction elevates beta-amyloid levels, which directly activates corticotropin-releasing factor neurons to exacerbate stress responses [Text] / N. J. Justice, L. Huang, J. B. Tian, A. Cole, M. Pruski, Jr. A. J. Hunt, R. Flores, M. X. Zhu, B. R. Arenkiel, H. Zheng // *J. Neurosci.* – 2015. – Vol. 35. – P. 2612–2623.
208. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data [Text] / S. Norton, F. E. Matthews, D. E. Barnes, K. Yaffe, C. Brayne // *Lancet Neurol.* – 2014. – Vol. 13. – P. 788–794.
209. Preferential loss of dorsal-hippocampus synapses underlies memory impairments provoked by short, multimodal stress [Text] / P. M. Maras, J. Molet, Y. Chen, C. Rice, S. G. Ji, A. Solodkin, T. Z. Baram // *Mol. Psychiatry.* – 2014. – Vol. 19. – P. 811-822.
210. Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring [Text] / R. I. Martínez-Tellez, E. Hernández-Torres, C. Gamboa, G. Flores // *Synapse.* – 2009. – Vol. 63, № 9. – P. 794–804.
211. Prenatal stress and neonatal handling induce sex-specific changes in dendritic complexity and dendritic spine density in hippocampal subregions of prepubertal rats [Text] / J. Bock, M. S. Murmu, Y. Biala, M. Weinstock, K. Braun // *Neuroscience.* – 2011. – Vol. 193. – P. 34–43.
212. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus [Text] / N. A. Datson, J. M. E. van den Oever, O. B. Korobko, A. M. Magarinos, E. R. de Kloet, B. S. McEwen // *Endocrinol.* – 2013. – Vol. 154. – P. 3261–3272.
213. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: Involvement in depression [Text] / Z. You, C.

- Luo, W. Zhang, Y. Chen, J. He, Q. Zhao, R. Zuo, Y. Wu // *Behav. Brain Res.* – 2011. – Vol. 225. – P. 135–141.
214. Psychosocial stress on neuroinflammation and cognitive dysfunctions in Alzheimer's disease: the emerging role for microglia? [Text] / S. Piirainen, A. Youssef, C. Song, A. V. Kalueff, G. E. Landreth, T. Malm, L. Tian // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2017. – Vol. 77. – P. 148-164.
215. Qian, L. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy [Text] / L. Qian, P. M. Flood, J. S. Hong // *J. Neural Transm.* – 2010. – Vol. 117. – P. 971–979.
216. Rajkowska, G. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue [Text] / G. Rajkowska, C. A. Stockmeier // *Curr. Drug. Targets.* – 2013. – Vol. 14. – P. 1225–1236.
217. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses [Text] / L. J. Launer, K. Andersen, M. E. Dewey, L. Letenneur, A. Ott, L. A. Amaducci, C. Brayne, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, A. Lobo, J. M. Martinez-Lage, T. Stijnen, A. Hofman // *Eur. Stud. Dement. Neurol.* – 1999. – Vol. 52. – P. 78–84.
218. Reduced interneuronal dendritic arborization in CA1 but not in CA3 region of mice subjected to chronic mild stress [Electronic resource] / J. Gilabert-Juan, C. Bueno-Fernandez, E. Castillo-Gomez, J. Nacher // *Brain and Behavior.* – 2017 – Vol. 7, № 2. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1002/brb3.534>.
219. Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor [Text] / F. Calabrese, G. Guidotti, G. Racagni, M. A. Riva // *Neurobiol. Aging.* – 2013. – Vol. 34, № 12. P. 2768–2776.
220. Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function [Text] / F. R. Turpin, B. Potier, J. R. Dulong, P. M. Sinet, J. Alliot, S. H. Olier, P. Dutar, J. Epelbaum, J. P. Mothet, J. M. Billard // *Neurobiology of Aging.* – 2011. – Vol. 32. – P. 1495–1504.
221. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the subregions of the hippocampus [Text] / P. Liu, P. F. Smith, I.

- Appleton, C. L. Darlington, D. K. Bilkey // *Neuroscience*. – 2003. – Vol. 119. – P. 679–687.
222. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes [Text] / S. Pattingre, L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, P. Codogno // *Biochimie*. – 2008. – Vol. 90. – P. 313-323.
223. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by disrupted-in-schizophrenia-1 [Text] / J. Wei, N. M. Graziane, H. Wang, P. Zhong, Q. Wang, W. Liu, A. Hayashi-Takagi, C. Korth, A. Sawa, N. J. Brandon, Z. Yan // *Biol. Psychiatry*. – 2014. – Vol. 75. – P. 414–424.
224. Richter-Levin G. The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory [Text] / G. Richter-Levin // *Neuroscientist*. – 2004. – Vol. 10. – P. 31–39.
225. Risold, P. Y. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus [Text] / P. Y. Risold, L. W. Swanson // *Science*. – 1996. – Vol. 272. – P. 1484-1486.
226. Rose, C. F. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease [Text] / C. F. Rose, A. Verkhratsky, V. Parpura // *Biochem. Soc. Trans.* – 2013. – Vol. 41. – P. 1518–1524.
227. Rothman, S. M. Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease / S. M. Rothman, M. P. Mattson // *Neuromolecular. Med.* – 2010. – Vol. 12. – P. 56–70.
228. Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway [Text] / S. Y. Wu, T. F. Wang, L. Yu, C. J. Jen, J. I. Chuang, F. S. Wu, C. W. Wu, Y. M. Kuo // *Brain Behav. Immun.* – 2011. – Vol. 25. – P. 135–146.
229. Russo-Neustadt, A. Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders [Text] / A. Russo-Neustadt // *Semin. Clin. Neuropsychiatry*. – 2003. – Vol. 8. – P. 109–118.

230. Sapolsky, R. M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders [Text] / R. M. Sapolsky // Arch. Gen. Psychiatry. – 2000. – Vol. 57. – P. 925–935.
231. Sapolsky, R. M. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging [Text] / R. M. Sapolsky, L. C. Krey, B. S. McEwen // J. Neurosci. – 1985. – Vol. 5. – P. 1222–1227.
232. Schimanski, L. A. Neural protein synthesis during aging: effects on plasticity and memory [Electronic resource] / L. A. Schimanski, C. A. Barnes // Front Aging Neurosci. 2010. – Vol. 2. – Режим доступа: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00026>.
233. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4 [Text] / A. Sekar, A. R. Bialas, H. de Rivera, A. Davis, T. R. Hammond, N. Kamitaki, K. Tooley, J. Presumey, M. Baum, V. Van Doren, G. Genovese, S. A. Rose, R. E. Handsaker, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, M. J. Daly, M. C. Carroll, B. Stevens, S. A. McCarroll // Nature. – 2016. – Vol. 530. – P. 177–183.
234. Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress [Text] / A. Bartolomucci, G. De Biurrun, B. Czéh, M. Van Kampen, E. Fuchs // Eur. J. Neurosci. – 2002. – Vol. 15, № 11. – P. 1863–1866.
235. Selective sparing of brain tissue in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy [Text] / K. I. Erickson, S. J. Colcombe, N. Raz, D. L. Korol, P. Scalf, A. Webb, N. J. Cohen, E. McAuley, A. F. Kramer, // Neurobiol. Aging. – 2005. – Vol. 6, № 8. P. 1205-1213.
236. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [Text] / D. J. Selkoe // Physiol. Rev. – 2001. – Vol. 81. – P. 741–766.
237. Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity [Text] / A. K. Mustafa, A. S. Ahmad, E. Zeynalov, S. Gazi, G. Sikka, J. T. Ehmsen, R. K. Barrow, J. T. Coyle, S. H. Snyder, S. Doré // J. Neurosci. – 2010. – Vol. 30, № 4. – P. 1413–1416.

238. Serine racemase expression and D-serine content are developmentally regulated in neuronal ganglion cells of the retina [Text] / Y. Dun, J. Duplantier, P. Roon, P. M. Martin, V. Ganapathy, S. B. Smith // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 104. – P. 970–978.
239. Serine racemase: a key player in neuron activity and in neuropathologies [Text] / B. Campanini, F. Spyrakis, A. Peracchi, A. Mozzarelli // *Frontiers in bioscience.* – 2013. – Vol. 18. – P. 1112–1128.
240. Serrano, F. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus [Text] / F. Serrano, E. Klann // *Ageing Research Reviews.* – 2004. – Vol. 3. – P. 431–443.
241. Smith, M. A. Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factors [Text] / M. A. Smith // *Behav. Brain Res.* – 1996. – Vol. – 78. – P. 25–36.
242. Smith, M. A. Stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression are attenuated in aged Fischer 344/N rats [Text] / M. A. Smith, G. Cizza // *Neurobiol. Aging.* – 1996. – Vol. 17. – P. 859–864.
243. Social instability stress in adolescent male rats alters hippocampal neurogenesis and produces deficits in spatial location memory in adulthood [Text] / C. M. McCormick, C. M. Thomas, C. S. Sheridan, F. Nixon, J. A. Flynn, I. Z. Mathews // *Hippocampus.* – 2012. – Vol. 22. – P. 1300–1312.
244. Sofroniew, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation [Text] / M. V. Sofroniew // *Trends. Neurosci.* – 2009. – Vol. 32. P. 638–647.
245. Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease [Text] / L. K. Smith, N. M. Jadavji, K. L. Colwell, S. Katrina Perhudoff, G. A. Metz // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – Vol. – 27. – P. 2133–2146.
246. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus [Text] / M.

- A. Smith, S. Makino, R. Kvetnansky, R. M. Post // *J. Neurosci.* – 1995. – Vol. 15. – P. 1768–1777.
247. Stress and loss of adult neurogenesis differentially reduce hippocampal volume [Electronic resource] / T. J. Schoenfeld, H. C. McCausland, H. D. Morris, V. Padmanaban, H. A. Cameron // *Biol. Psychiatry.* – 2017. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.013>.
248. Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus [Text] / J. Thome, B. Pesold, M. Baader, M. Hu, J. C. Gewirtz, R. S. Duman, F. A. Henn // *Biol. Psychiatry.* – 2001. – Vol. 50. – P. 809–812.
249. Stress during pregnancy alters dendritic spine density and gene expression in the brain of new-born lambs [Text] / B. Petit, A. Boissy, A. Zanella, E. Chaillou, S. Andanson, S. Bes, F. Lévy, M. Coulon // *Behavioural. Brain. Research.* – 2015. – Vol. 291. – P. 155–163.
250. Stress impairs synaptic plasticity in triple-transgenic Alzheimer's disease mice: rescue by ryanodine [Text] / G. Grigoryan, G. Biella, D. Albani, G. Forloni, M. Segal // *Neurodegener. Dis.* – 2014. – Vol. 13. – P. 135–138.
251. Stress injuries and autophagy in mouse hippocampus after chronic cold exposure [Text] / T. T. Qu, J. X. Deng, R. L. Li, Z. J. Cui, X. Q. Wang, L. Wang, J. B. Deng // *Neural. Regen. Res.* – 2017. – Vol. 12, № 3. – P. 440-446.
252. Stress modulation of hippocampal activity--spotlight on the dentate gyrus [Text] / M. Fa, L. Xia, R. Anunu, O. Kehat, M. Kriebel, H. Volkmer, G. Richter-Levin // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2014. – Vol. 112. – P. 53–60.
253. Stress-resistant mice overexpressing glucocorticoid receptors display enhanced BDNF in the amygdala and hippocampus with unchanged NGF and serotonergic function [Text] / O. Schulte-Herbruggen, S. Chourbaji, S. Ridder, C. Brandwein, P. Gass, H. Hörtnagl, R. Hellweg // *Psychoneuroendocrinology.* – 2006. – Vol. 31. – P. 1266–1277.
254. Sullivan, E. V. Preservation of hippocampal volume throughout adulthood in healthy men and women [Text] / E. V. Sullivan, L. Marsh, A. Pfefferbaum // *Neurobiol. Aging.* – 2004. – Vol. 26. – P. 1093–1098.

255. Surface expression and metabolic half-life of AMPA receptors in cultured rat cerebellar granule cells [Text] / K. Archibald, M. J. Perry, E. Molnar, J. M. Henley // *Neuropharmacology*. – 1998. – Vol. 37. – P. 1345–1353.
256. Surface expression of the AMPA receptor subunits GluR1, GluR2, and GluR4 in stably transfected baby hamster kidney cells [Text] / R. A. Hall, A. Hansen, P. H. Andersen, T. R. Soderling // *J. Neurochem.* – 1997. – Vol. 68. – P. 625–630.
257. Swaab, D. F. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration [Text] / D. F. Swaab, A. M. Bao, P. J. Lucassen // *Ageing Res. Rev.* – 2005. – Vol. 4. – P. 141–194.
258. Swanson, L. W. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat [Text] / L. W. Swanson, W. M. Cowan // *J. Comp. Neurol.* – 1977. – Vol. 172. – P. 49-84.
259. Synaptophysin protein and mRNA expression in the human hippocampal formation from birth to old age [Text] / S. L. Eastwood, C. S. Weickert, M. J. Webster, M. M. Herman, J. E. Kleinman, P. J. Harrison // *Hippocampus*. – 2006. – Vol. 16. – P. 645–654.
260. Tanti, A. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? [Text] / A. Tanti, C. Belzung // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. 252. – P. 234–252.
261. Terry, R. D. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease [Text] / R. D. Terry // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2000. – Vol. 59. – P. 1118–1119.
262. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat [Text] / I. Driscoll, S. R. Howard, J. C. Stone, M. H. Monfils, B. Tomanek, W. M. Brooks, R. J. Sutherland // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 139. – P. 1173–1185.
263. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings [Text] / I. Driscoll, D. A. Hamilton, H. Petropoulos, R. A. Yeo, W. M. Brooks, R. N. Baumgartner, R. J. Sutherland // *Cerebral Cortex*. – 2003. – Vol. 13. – P. 1344–1351.

264. The amyloidogenic potential and behavioral correlates of stress [Text] / C. Catania, I. Sotiropoulos, R. Silva, C. Onofri, K. C. Breen, N. Sousa, O. F. Almeida // *Mol. Psychiatry*. – 2009. – Vol. 14. – P. 95–105.
265. The glutamate receptor ion channels [Text] / R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, S. F. Traynelis // *Pharmacol. Rev.* – 1999. – Vol. 51. – P. 7–61.
266. The hippocampus book [Text] / P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, J. O’Keefe. – Oxford University Press, 2007. – 832 p.
267. The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? [Text] / J. Alliot, S. Boghossian, D. Jourdan, C. Veyrat-Durebex, G. Pickering, D. Meynial-Denis, N. Gaumet // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2002. – Vol. 57. – P. B312–320.
268. The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis [Text] / C. F. Valori, L. Brambilla, F. Martorana, D. Rossi // *Cell Mol. Life. Sci.* – 2014. – Vol. 71. – P. 287–297.
269. The NMDA receptor co-agonists, D-serine and glycine, regulate neuronal dendritic architecture in the somatosensory cortex [Text] / D. T. Balu, A. C. Basu, J. P. Corradi, A. M. Cacace, J. T. Coyle // *Neurobiol. disease*. – 2012. – Vol. 45, № 2. – P. 671–682.
270. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain [Text] / E. X. Guix, I. Uribersalgo, M. Coma, F. J. Munoz // *Progress in Neurobiology*. – 2015. – Vol. 76. – P. 126–152.
271. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside [Text] / P. S. Garry, M. Esra, M. S. Rowland, J. Westbrook, K. T. Pattinson // *Exp. Neurol.* – 2015. – Vol. 263. – P. 235–243.
272. The ups and downs of the posteromedial cortex: age- and amyloid-related functional alterations of the encoding/retrieval flipin cognitively normal older adults [Text] / P. Vannini, T. Hedden, W. Huijbers, A. Ward, K. A. Johnson, R. A. Sperling // *Cereb. Corte.* – 2013. – Vol. 23, № 6. – P. 1317–1328.

273. Thrane, A. S. Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema [Text] / A. S. Thrane, V. R. Thrane, M. Nedergaard // *Trends Neurosci.* – 2014. – Vol. 37. – P. 620–628.
274. Ulrich-Lai, Y. M. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses [Text] / Y. M. Ulrich-Lai, J. P. Herman // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 10. – P. 397–409.
275. Verkhratsky, A. Glial physiology and pathophysiology [Text] / A. Verkhratsky, A. M. Butt. – Chichester: Wiley-Blackwell., 2013. – 560 p.
276. Versatile and simple approach to determine astrocyte territories in mouse neocortex and hippocampus [Electronic resource] / A. Grosche, J. Grosche, M. Tackenberg, D. Scheller, G. Gerstner, A. Gumprecht, T. Pannicke, P. G. Hirrlinger, U. Wilhelmsson, K. Huttman, W. Hartig, C. Steinhauser, M. Pekny, A. Reichenbach // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069143>.
277. Wang, Y. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death apoptosis [Text] / Y. Wang, Z-H. Qin // *Apoptosis.* – 2010. – Vol. 15. – P. 1382–1402.
278. West, A. E. Biological functions of activity-dependent transcription revealed [Text] / A. E. West // *Neuron.* – 2008. – Vol. 60. – P. 523–525.
279. What counts in brain aging? Design-based stereological analysis of cell number [Text] / J. M. Long, P. R. Mouton, M. Jucker, D. K. Ingram // *J. Gerontol.* – 1999. – Vol. 54A. – P. B407–B417.
280. Wiedenmann, B. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles [Text] / B. Wiedenmann, W. W. Franke // *Cell.* – 1985. – Vol. 41, № 3. – P. 1017–1028.
281. Wingenfeld, K. Stress, memory, and the hippocampus [Text] / K. Wingenfeld, O. T. Wolf // *Front. Neurol. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34. – P. 109–120.

282. Wistar rats subjected to chronic restraint stress display increased hippocampal spine density paralleled by increased expression levels of synaptic scaffolding proteins [Text] / D. Orłowski, B. Elfving, H. K. Müller, G. Wegener, C. R. Bjarkam // *Stress*. – 2012. – Vol. 15, № 5. – P. 514-523.
283. Wolosker, H. Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes [Text] / H. Wolosker // *Biochimica et biophysica acta-proteins and proteomics*. – 2011. – Vol. 1814. – P. 1558–1566.
284. Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature [Electronic resource] / T. Wyss-Coray, J. Rogers // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – Vol. 2. – Режим доступа: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/1/a006346>.
285. Yeh, C.-M. Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF [Text] / C.-M. Yeh, C.-C. Huang, K.-S. Hsu // *The Journal of Physiology*. – 2012. – Vol. 590. – P. 991–1010.
286. Zhao, Y. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS [Text] / Y. Zhao, P. M. Vanhoutte, S. W. S. Leung // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2015. – Vol. 129, № 2. – P. 83–94.
287. Zlatković, J. Protective effect of Hsp70i against chronic social isolation stress in the rat hippocampus [Text] / J. Zlatković, R. E. Bernardi, D. Filipović // *J. Neural. Transm.* – 2014. – Vol. 121, № 1. – P. 3–14.
288. Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders [Text] / B. V. Zlokovic // *Neuron*. – 2008. – Vol. 57. – P. 178–201.