
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 611.811.018:599.323.4

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ДОРСАЛЬНОГО ОТДЕЛА ГИППОКАМПА КРЫС НА ЭТАПАХ СТАРЕНИЯ С УЧЕТОМ ЭКСПРЕССИИ СЕРИНОВОЙ РАЦЕМАЗЫ

**А. В. Смирнов^{1, 2}, Н. В. Григорьева¹, М. Р. Экова¹, М. В. Шмидт^{1, 2}, Д. С. Медников¹,
И. Н. Тюренков¹, Д. В. Куркин¹, Е. В. Волотова¹**

¹Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии и биофармации ФУВ,
²Волгоградский медицинский научный центр

Исследование заключалось в изучении структурных изменений в дорсальном отделе гиппокампа и особенностей экспрессии сериновой рацемазы у 12- и 24-месячных крыс. У 24-месячных старых животных обнаружены наиболее выраженные изменения в нейронах пирамидного слоя СА3 дорсального отдела гиппокампа, сочетающиеся со снижением уровня экспрессии сериновой рацемазы в дендритах *st. radialis* CA1 и CA3.

Ключевые слова: гиппокамп, старение, крыса, сериновая рацемаза.

CHARACTERISTICS OF THE STRUCTURAL CHANGES OF DORSAL HIPPOCAMPUS CONSIDERING SERINE RACEMASE EXPRESSION IN AGING RATS

**A. V. Smirnov^{1, 2}, N. V. Grigorieva¹, M. R. Ekova¹, M. V. Schmidt^{1, 2}, D. S. Mednikov¹,
I. N. Tyurenkov¹, D. V. Kurkin¹, E. V. Volotova¹**

¹Volgograd State Medical University,
Department of Pathological Anatomy, Department of Pharmacology and Biopharmaceutics HFC,
²VolgogradMedical Research Center

The study set out to examine the structural changes in the dorsal hippocampus and features of serine racemase expression in 12- and 24-month-old rats. In 24-month-old rats pronounced changes in pyramidal neurons of CA3 in the dorsal hippocampus were revealed. They were associated with reduced serine racemase expression in dendrites of *st. radialis* CA1 and CA3.

Key words: hippocampus, aging, rat, serine racemase.

Современное общество характеризуется постоянным увеличением продолжительности жизни, которая достигается за счет прогресса в медицинской сфере, гигиене и питании. Это приводит к сопутствующему увеличению связанных с возрастом когнитивных нарушений, которые, в настоящее время, представляют одну из главных социальных, экономических и медицинских проблем [11]. Обширные исследования когнитивных функций стареющего организма, выполненные на животных моделях, свидетельствуют о том, что ухудшение памяти связано с нарушением способности головного мозга, а в частности гиппокампа, управлять Ca^{2+} -зависимой пластичностью, что приводит к разрыву синаптических связей между нейронами. Эта пластичность является основным свойством нейронных се-

тей, лежащих в основе формирования памяти [6]. Возрастазависимый дефицит синаптической пластичности, вероятно, отражает сдвиг в работе глутаматных N-метил-D-аспартат рецепторов (NMDA-R) [7]. Тем не менее, важность уменьшения плотности рецепторов, как это было предложено ранее [4], оспорена в исследовании линии крыс Lou/C/Jall, представляющих модель здорового старения [3]. У этих животных не наблюдалось очевидных возрастных нарушений памяти, несмотря на значительное снижение NMDA-R [8]. Интересно отметить, что нарушение активности NMDA-R и синаптической пластичности, которые отмечаются у старых крыс других штаммов [4], снижаются за счет насыщающей дозы D-серина. D-серин представляет собой эндогенный лиганд стрихнин-нечувствительного глицин-связывающего

сайт NMDA-R [9] и синтезируется из L-изомера в ходе прямой реакции рацемизации, катализируемой сериновой рацемазой (CP), ферментом, локализованным не только в астроцитах, но и в нейронах [12]. Так как инактивация CP влияет не только на синтез D-серина, но и на индукцию NMDAR-зависимой синаптической пластичности, а максимальная концентрация NMDA-R у крыс представлена в CA1 зоне гиппокампа, то особенности экспрессии сериновой рацемазы в гиппокампе играют важную роль в процессе старения.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение структурных изменений в CA1 и CA3 дорсального отдела гиппокампа у 12- и 24-месячных крыс с учетом экспрессии CP.

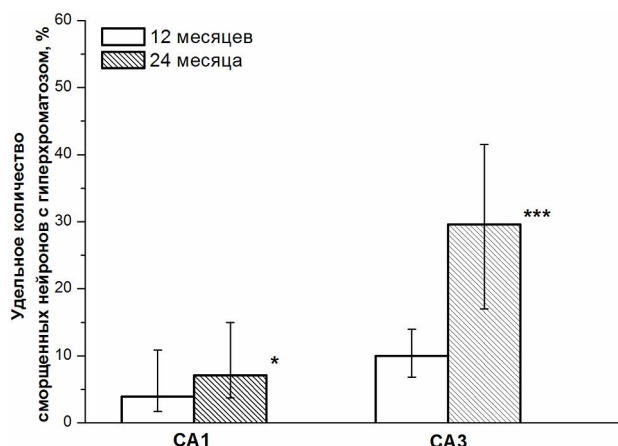
МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 20 нелинейных белых крысах-самцах в возрасте 12 и 24 месяцев (ФГПУ Питомник лабораторных животных «Рапполово») с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Были сформированы две группы по 10 животных в каждой. 1-я группа — крысы в возрасте 12 месяцев, 2-я группа — крысы в возрасте 24 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым свето-темновым циклом (ГОСТ Р 50258-92). Эвтаназию проводили с помощью гильотинного метода с использованием «Гильотины для крыс» (AE0702, производитель «Open Science»). Головной мозг фиксировали в нейтральном забуференном 10%-м формалине. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля. Определяли степень повреждения нейронов методом подсчета удельного количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы. Экспрессию CP определяли иммуногистохимическим методом с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, CA). В качестве первичных антител использовали моноклональные мышиные антитела к CP (Santa Cruz, Biotechnology, Inc. 1:50). Оценку изменений уровня экспрессии CP определяли путем подсчета удельного количества иммунопозитивных нейронов, определения относительной площади иммунопозитивного материала в CA1 и CA3 с использованием программы «Видеотест-Морфо-4» (Россия), а также интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 — иммунонегативная реакция; 1 — слабо выраженное окрашивание; 2 — умеренно выраженное окрашивание; 3 — максимально выраженное окрашивание). Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Micros» (Austria), фотодокументирование осуществляли камерой «Olympus» (Japan). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала [Q1; Q3], где Q1 — 25 перцентиль, Q3 — 75 перцентиль.

Различия между группами оценивали по критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test) и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При микроскопическом исследовании CA1 дорсального отдела гиппокампа у 12-месячных крыс нейроны пирамидного слоя характеризовались округлой формой перикариона с центрально расположенным ядром, как правило, с хорошо выраженным ядрышком. В цитоплазме отмечалось равномерное распределение пылевидной и мелкоглобулярной субстанции Ниссля. Большая часть нейронов характеризовалась нормохромной цитоплазмой перикариона. Признаки гиперхроматоза обнаруживались в небольшом количестве нейронов. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы у 12-месячных животных составило 3,9 [1,7; 10,9] %. У 24-месячных крыс, по сравнению с 12-месячными животными отмечалось увеличение количества сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы до 7,1 [3,7; 15,0] % ($p < 0,05$) (рис. 1).



* $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$ — различия между группами статистически значимы (критерий Манна-Уитни).

Рис. 1. Динамика изменения удельного количества сморщенных нейронов пирамидного слоя с гиперхроматозом цитоплазмы в CA1 и CA3 дорсального гиппокампа 12- и 24-месячных крыс

В CA3 нейроны пирамидного слоя располагались более рыхло, имели полигональную форму с четко визуализируемым везикулярным ядром и одним ядрышком. При этом у старых (24-месячных) крыс многие нейроны характеризовались уменьшением размеров и извитой формой перикарионов, с выраженной базофилией цитоплазмы. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 10,0 [6,8; 14,0] % у 12-месячных крыс и 29,6 [17,0; 41,5] % — у 24-месячных животных ($p < 0,001$) (рис. 1). В пирамидном слое наблюдался перичеселлюлярный отек, в отдельных нейронах — явления вакуолизации цитоплазмы перикариона. Отмечалось уменьшение относительной

плотности нейронов, что свидетельствует об убыли нейронов пирамидного слоя [1].

В СА3 нейроны пирамидного слоя располагались более рыхло, имели полигональную форму с четко визуализируемым везикулярным ядром и одним ядрышком. При этом у старых (24-месячных) крыс многие нейроны характеризовались уменьшением размеров и извитой формой перикарионов, с выраженной базофилией цитоплазмы. Удельное количество сморщенных нейронов с гиперхроматозом цитоплазмы составило 10,0 [6,8; 14,0] % у 12-месячных крыс и 29,6 [17,0; 41,5] % — у 24-месячных животных ($p < 0,001$) (рис. 1). В пирамидном слое наблюдались перичеселлюлярный отек, в отдельных нейронах — явления вакуолизации цитоплазмы перикариона. Отмечалось уменьшение относительной плотности нейронов, что свидетельствует об убыли нейронов пирамидного слоя [1].

При иммуногистохимическом исследовании дорсального отдела гиппокампа 12-месячных крыс с использованием антител против СР в СА1 отмечается умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия иммунопозитивного материала (ИПМ) (2 балла) в нейронах пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя. У старых животных (24 месяца) наблюдалась слабо выраженная экспрессия ИПМ (1 балл) лишь в единичных дендритах радиального слоя при сохранении умеренно выраженной цитоплазматической экспрессии ИПМ (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя (рис. 2).

Статистически значимых изменений удельного количества иммунопозитивных нейронов пирамидного слоя СА1 у 12- и 24-месячных крыс не обнаружено ($p > 0,05$). Отмечается изменение преимущественной локализации ИПМ в СА1 при старении: снижение уровня экспрессии ИПМ у 24-месячных крыс в дендритах радиального слоя и увеличение — в перикарионах нейронов пирамидного слоя. При этом суммарно в дендритах и перикарионах нейронов при компьютерном морфометрическом анализе наблюдается лишь тенденция к снижению относительной площади ИПМ ($p > 0,05$).

При оценке результатов иммуногистохимического исследования у 12-месячных крыс в СА3 дорсального отдела гиппокампа отмечается умеренно выраженная цитоплазматическая экспрессия ИПМ (2 балла) в перикарионах нейронов пирамидного слоя и в дендритах радиального слоя, окружающий нейропил, характеризуется слабо выраженным окрашиванием (1 балл). При этом у 24-месячных крыс ИПМ 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 ИПМ в радиальном слое СА3 носила умеренно выраженный характер (2 балла) в дендритах и слабо выраженный характер (1 балл) в окружающем нейропиле радиального слоя (рис. 3). Статистически значимых различий исследуемых параметров обнаружено не было.

Обнаруженные нами признаки структурных повреждений в нейронах пирамидного слоя СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа у 24-месячных крыс могут быть связаны как с эксайтотоксическим действием высокой концентрации глутамата с вовлечением эксцитосинаптических NMDA-рецепторов GluN2B и активацией сигнальных нейрональных комплексов смерти (NDC) [10], так и с нарушениями кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла гиппокампа [2], что рассматривается нами как результат ишемии, снижения нейротрофных и нейропротекторных факторов эндотелия сосудов.

Полученные нами данные свидетельствуют о возрастзависимом снижении уровня экспрессии сериновой рацемазы в дендритах радиального слоя СА1 и СА3 дорсального отдела гиппокампа, что может быть связано с увеличением содержания NO в гиппокампе при старении [2], поскольку D-серин, выделяемый астроцитами, индуцирует быстрое увеличение содержания NO в постсинаптических нейронах, а NO угнетает активность сериновой рацемазы [5].

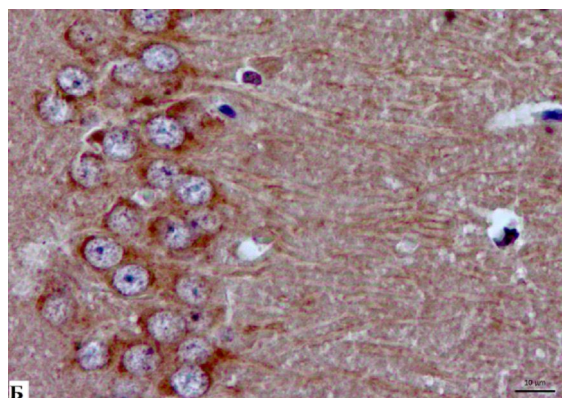
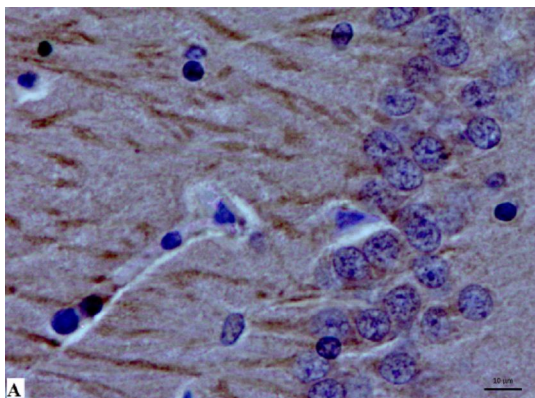


Рис. 2. Гистологическое строение СА1 вентрального отдела гиппокампа крысы в возрасте 12 месяцев (А) и крысы в возрасте 24 месяцев (Б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. $\times 400$

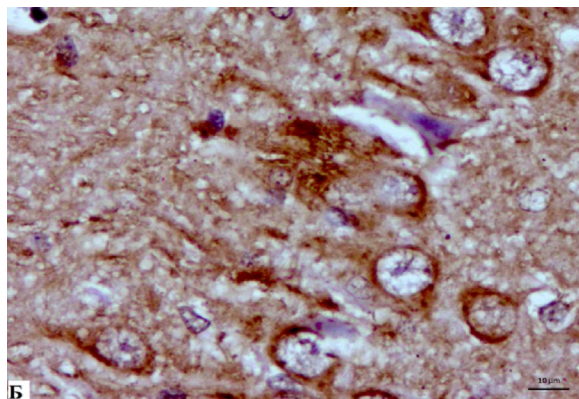
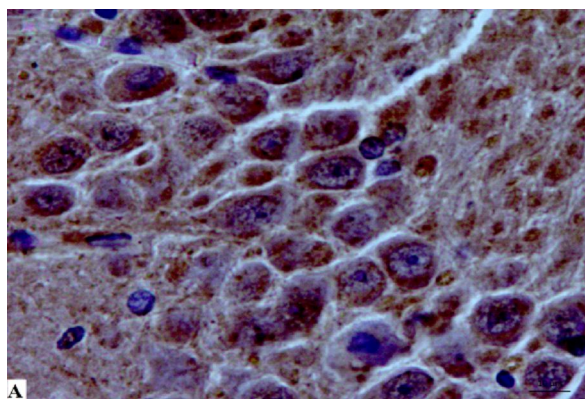


Рис. 3. Гистологическое строение СА3 дорсального отдела гиппокампа крыс в возрасте 12 месяцев (А) и крыс в возрасте 24 месяцев (Б). Иммуногистохимическое исследование, антитела против сериновой рацемазы, докраска гематоксилином. Ув. × 400

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в процессе старения у 24-месячных крыс по сравнению с 12-месячными животными, наряду с атрофическими изменениями, обнаруживается увеличение количества поврежденных нейронов, преимущественно, в пирамидном слое СА3 дорсального отдела гиппокампа, что сопровождается возраст-зависимым снижением уровня экспрессии сериновой рацемазы в дендритах *st. radialis* CA1 и СА3 и рассматривается как признак снижения NMDA-R зависимой синаптической пластичности в гиппокампе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов А. В., Тюренков И. Н., Шмидт М. В. и соавт. // Вестн. ВолгГМУ. — 2013. — Т. 46 (2). — С. 14—17.
2. Экова М. Р., Смирнов А. В., Шмидт М. В. и соавт. // Успехи геронтологии. — 2016. — Т. 29 (1) — С. 59—67.
3. Alliot J., Boghossian S., Jourdan D., et al. // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. — 2002. — Vol. 57. — P. 312—320.
4. Clayton D. A., Mesches M. H., Alvarez E., et al. // J. Neurosci. — 2002. — Vol. 22. — P. 3628—3637.
5. Darra E., Ebner F. H., Shoji K., et al. // Cent. Nerv. Syst. Agents. Med. Chem. — 2009. — Vol. 9 (4) — P. 289—294.

6. Dun Y., Duplantier J., Roon P., et al. // J. Neurochem. — 2008. — Vol. 104. — P. 970—978.
7. Foster T. C. // Aging Cell. — 2007. — Vol. 6. — P. 319—325.
8. Kollen M., Stephan A., Faivre-Bauman A., et al. // Neurobiol. Aging. — 2008. — doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.010.
9. Mothet J.-P., Rouaud E., Sinet P.-M., et al. // Aging Cell. — 2006. — Vol. 5. — P. 267—274.
10. Tu W. Xu X., Peng L., et al. // Cell. — 2010. — Vol. 140. — P. 222—234.
11. Turpin F. R., Potier B., Dulong J. R., et al. // Neurobiology of Aging. — 2011. — Vol. 32. — P. 1495—1504.
12. Wolosker H. // Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics. — 2011. — Vol. 1814. — P. 1558-1566.

Контактная информация

Экова Мария Рафаэлевна — аспирант кафедры патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: maria.ekova@mail.ru