

На правах рукописи

Бахарева Юлия Олеговна

**ВОЗРАСТНЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПЕРВИЧНОЙ ЗРИТЕЛЬНОЙ ОБЛАСТИ КОРЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ЯРКОГО СВЕТА, ИХ КОРРЕКЦИЯ**

(экспериментальное исследование)

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Варакута Елена Юрьевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Акулинин
Виктор Александрович**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Медведева
Надежда Николаевна**

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107) и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Зрение, наиболее доминирующее из наших чувств, играет решающую роль в каждой стадии нашей жизни. Согласно первому Всемирному докладу о проблемах зрения, опубликованному Всемирной организацией здравоохранения в 2019 году, более 1 миллиарда человек во всем мире живут с нарушениями зрения, что связано с увеличением продолжительности жизни и старением населения (World report on vision, 2019).

При заболеваниях, приводящих к нарушению зрения и слепоте, наряду с изменениями в периферическом отделе поражаются корковые центры зрительного анализатора (Ichhpujani P. et al., 2019; Mirzaei M. et al., 2017; Levkovitch-Verbin H. et al., 2015; Kasi A. et al., 2019). По современным данным гибель ганглионарных нейронов сетчатки, вне зависимости от причины, приводит к антероградной транссинаптической нейродегенерации подкорковых и корковых центров, что, возможно, является основным механизмом развития и прогрессирования заболеваний, приводящих к нарушению зрения и слепоте. Данный феномен обнаружен при глаукоме (Tribble J. et al., 2019; Wang Y. et al., 2019; Tribble J. et al., 2019; DeBuc D.C. et al., 2019), нейродегенеративных заболеваниях (Stam C.J. et al., 2014; Fornito A. et al., 2015), ишемических повреждениях головного мозга (Dang G. et al., 2016; Park K. et al., 2019), рассеянном склерозе (Gabilondo I. et al., 2014; Mancino R. et al., 2019). На сегодняшний день нет единого понимания патогенеза транснейрональной дегенерации, его возрастных особенностей и, соответственно, не разработаны эффективные методы коррекции и профилактики вторичного повреждения нервных структур. Антиоксиданты, зарекомендовавшие себя в качестве ретинопротекторов, эффективно предотвращали повреждения нейронов сетчатки при световом воздействии и могут оказаться полезными для коррекции повреждения подкорковых и корковых центров зрительного анализатора (Kumar G. S. et al., 2013; Wang Y. et al., 2015; Жданкина А.А. и др., 2009). С этой целью был выбран п-тирозол, обладающий антиоксидантными, гемореологическими, противовоспалительными эффектами, кардио- и нейропротективными

свойствами (Плотников М.Б. и др., 2018; Осипенко А.Н. и др., 2017; Боровская Т.Г. и др., 2014; Плотникова Т.М. и др., 2017; В.И.; Plotnikov M.B. et al., 2020).

В настоящем исследовании для изучения тканевых механизмов изменения клеточной популяции первичной зрительной коры использовалась модель фотоповреждения сетчатки. Предметом планируемого исследования был поиск новых научных знаний о тканевых механизмах деструкции и адаптации клеток первичной зрительной коры у крыс 3- и 18-месячного возраста в ответ на фотоповреждение сетчатки. Объектом исследования стали – нейроны, межнейрональные контакты, глиальные клетки и сосуды первичной зрительной коры.

Степень разработанности проблемы. Достаточно подробно изучены изменения сетчатки и зрительного нерва при световом воздействии (Vicente-Tejedor J. et al., 2018; Фахрутдинова А.Ф. и др., 2019; Аникина Е.Ю. и др., 2009; Варакута Е.Ю. и др., 2012; Потапов А.В. и др., 2006), исследованы изменения зрительной коры при воздействии микроволнового и ионизирующего излучения (Логвинов С.В. 1994, Логвинов С.В. 1998). В доступной литературе крайне мало данных о морфологических изменениях зрительной коры при фотоповреждении сетчатки, таким образом, степень разработанности темы – низкая.

Цель исследования. Изучить морфофункциональные изменения нейро-глио-сосудистого комплекса первичной зрительной коры при воздействии света высокой интенсивности и их коррекции п-тирозолом у 3- и 18-месячных крыс линии Вистар.

Задачи исследования:

1. Изучить возраст-зависимые изменения клеточных элементов первичной зрительной коры у 18-месячных крыс и в условиях коррекции п-тирозолом.
2. Оценить морфофункциональные изменения нейронов первичной зрительной коры у 3- и 18-месячных крыс при световом воздействии и в условиях коррекции п-тирозолом.

3. Провести ультраструктурный морфометрический анализ межнейрональных синапсов первичной зрительной коры у 3- и 18-месячных крыс при световом воздействии и в условиях коррекции п-тирозолом.
4. Исследовать морфофункциональные изменения глиальных клеток первичной зрительной коры у 3- и 18-месячных крыс, при световом воздействии и в условиях коррекции п-тирозолом.
5. Провести анализ морфофункциональных изменений сосудов и элементов гематоэнцефалического барьера первичной зрительной коры у 3 и 18-месячных крыс при световом воздействии и в условиях коррекции п-тирозолом.

Научная новизна. Для достижения поставленных задач было проведено комплексное гистологическое, электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование первичной зрительной коры 3- и 18-месячных крыс линии Вистар. Впервые, в сравнительном аспекте, изучены морфологические изменения клеточных элементов первичной зрительной коры после 7 суток высокоинтенсивного светового воздействия и при коррекции п-тирозолом у 3- и 18-месячных крыс линии Вистар. Получены новые данные о реактивной, компенсаторной и репаративной реорганизации нейронов, межнейрональных синапсов, глиоцитов и клеточных элементов гематоэнцефалического барьера первичной зрительной коры головного мозга крыс при световом воздействии и в условиях коррекции п-тирозолом. Выявлено, что световое воздействие усугубляет имеющиеся возрастные изменения нейронов и приводит к деструкции синаптических контактов первичной зрительной коры. Это сопровождается изменениями в глиальной популяции и компонентах гематоэнцефалического барьера. В настоящем исследовании впервые разработана и апробирована экспериментальная модель светового повреждения сетчатки для изучения тканевых механизмов транснейрональной дегенерации первичной зрительной коры у крыс разного возраста, показана возможность их коррекции п-тирозолом.

Теоретическая и практическая значимость. Анализ и обобщение результатов исследования морфологических изменений в первичной зрительной коре при повреждении сетчатки и на фоне коррекции п-тирозолом расширяют фундаментальные знания об адаптивных, деструктивных, компенсаторно-приспособительных процессах в клеточной популяции первичной зрительной коры у крыс разных возрастных групп. Проведенные количественные измерения позволили оценить особенности структурно-функциональных изменений нейронов первичной зрительной коры головного мозга при фотоповреждении сетчатки. Полученные данные могут стать основой для разработки патогенетических подходов воздействия на механизмы развития повреждения центрального отдела зрительного анализатора при заболеваниях, приводящих к гибели ганглионарных нейронов сетчатки и демиелинизации зрительных нервов (глаукома, рассеянный склероз). Полученные результаты о защитном эффекте п-тирозола на первичную зрительную кору при воздействии света могут быть использованы для разработки новых подходов профилактики и патогенетического лечения заболеваний, приводящих к слепоте. Полученные данные будут полезны специалистам в области гистологии, фармакологии, офтальмологии, нейробиологии и неврологии, а значит, могут быть использованы в учебном процессе на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии при изучении разделов «Нервная система» и «Нервная ткань».

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования является сравнительное изучение структурно-функциональной организации первичной зрительной коры крыс 3- и 18-месячного возраста на модели светового повреждения сетчатки и в условиях коррекции п-тирозолом. В работе использован комплекс гистологических, электронно-микроскопических и морфометрических методов исследования головного мозга экспериментальных животных. Это позволило охарактеризовать тканевые механизмы компенсаторно-восстановительной реорганизации клеток первичной зрительной коры у крыс разного возраста на модели светового повреждения сетчатки. Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с директивой

Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей». Распределение объектов и групп исследования в соответствии с использованной методологией представлено в таблице.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Возрастные изменения первичной зрительной коры характеризуются деструкцией части нейронов, что сопровождается глиальной реакцией в виде пролиферации и/или миграции глиоцитов. п-Тирозол снижает процентное содержание деструктивных форм клеток и улучшает морфофункциональное состояние части нейронов.

2. После 7 суток светового воздействия часть нейронов подвергалась необратимым изменениям, более выраженным в IV слое первичной зрительной коры 18-месячных крыс, другая часть – компенсаторной реорганизации, сопровождающейся появлением новых синапсов. Использование п-тирозола снижает деструкцию нервных клеток и улучшает межнейрональную коммуникацию.

3. После светового воздействия наблюдаются реактивные и деструктивные изменения глиоцитов. В отростках астроглии, окружающих капилляры, появляются слоистые мембранные структуры, а в эндотелии – множественные пиноцитозные пузырьки, что отражает дисфункцию гематоэнцефалического барьера, более выраженную у 18-месячных крыс. Введение п-тирозола снижает процентное содержание измененных глиоцитов и улучшает микроваскуляризацию.

Степень достоверности и апробация работы

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном материале (60 экспериментальных животных) с использованием адекватных гистологических

методов исследования. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины. Основные научные данные, теоретические положения, разработанные на их основе, практические рекомендации настоящего исследования внедрены в процесс преподавания на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, при изучении разделов «Нервная система» и «Нервная ткань».

Результаты проведенного исследования докладывались и обсуждались на XIII Конгрессе Международной Ассоциации Морфологов 24-27 мая 2016 г. на базе Медицинского института Петрозаводского государственного университета, на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 120-летней годовщине со дня рождения профессора Б.М. Соколова, проходившей 3-4 июня 2016 г. на базе Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, на XIV Конгрессе Международной Ассоциации морфологов 19-22 сентября 2018 года на базе Астраханского государственного медицинского университета, на VIII Съезде Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов России 23–26 мая 2019 года на базе Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко, на Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 105-летию со дня рождения чл.-кор. АМН СССР, профессора Алексея Георгиевича Кнорре 19 декабря 2019 на базе Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 9 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 – Scopus.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 61 рисунок и 17 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и

методов исследования, главы результатов исследований, обсуждения, выводов, списка условных сокращений и библиографического списка, включающего 205 литературных источников, из которых 35 на русском и 170 на иностранном языках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 60 крысах самцах линии Вистар, двух возрастных групп– 3 (n=30) и 18 (n=30) месяцев (таблица 1). Объектом исследования являлась первичная зрительная кора головного мозга крыс. Животных разделили на 2 группы и содержали на стандартном пищевом рационе с неограниченным доступом к воде.

Таблица 1. Распределение животных по экспериментальным группам

Группы животных	Контрольная группа (n=30)						Экспериментальная группа (n=30) (световое воздействие)						ИТОГО
	3 месяца			18 месяцев			3 месяца			18 месяцев			
	Интактные	п-тирозол	Вода	Интактные	п-тирозол	Вода	Опыт	п-тирозол	Вода	Опыт	п-тирозол	Вода	
Количество животных	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	60

Крыс контрольной группы (n=30) содержали в стандартных условиях вивария. По пять крыс каждого возраста контрольной группы получали внутривенно п-тирозол в дозе 50 мг/кг массы в течение 7 суток, разведенный в дистиллированной воде. По пять животных 3- и 18-месячного возраста получали эквивалентное количество дистиллированной воды в те же сроки. Крыс экспериментальной группы (n=30) помещали в установку из пяти прямоугольных рефлекторов с вмонтированными в них люминесцентными лампами, освещающими клетку со всех сторон, на 7 суток. Уровень освещенности составил 3500 лк круглосуточно. По пять крыс 3- и 18-месячного

возраста экспериментальной группы получали внутривенно п-тирозол в дозе 50 мг/кг массы в течение светового воздействия (7 суток). Пяти крысам обеих возрастных групп вводили эквивалентное количество дистиллированной воды. На 8 сутки под легким эфирным наркозом животных выводили из эксперимента путем декапитации, извлекали головной мозг и выделили затылочную долю в правом и левом полушарии.

Методы исследования

Первичную зрительную кору фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином и крезил фиолетовым по Нисслю, просматривали на световом микроскопе МИКМЕД-5 ЛОМО.

Электронная микроскопия

Полученный материал фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,2 М каодилатном буфере (рН 7,4). Материал постфиксировали в 2% растворе четырехокси осмия в холодильнике, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в эпон. Для количественного исследования синапсов на этапе дегидратации, без предварительного осмирования, препараты контрастировали в 5% растворе фосфорновольфрамной кислоты на абсолютном спирте.

Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-4 (Швеция). Полутонкие окрашивали Азуром II и просматривали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы помещали на медные сетки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEN-100 CX (Япония).

Морфометрические методы исследования

На срезах, окрашенных крезил фиолетовым подсчитывали процентное содержание нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом, а также гиперхромных нейронов со сморщиванием и без во II, IV и V слоях первичной

зрительной коры (расчеты производили на 200 клеток). Также во II, IV и V слоях изучали процентное содержание гиперхромной глии со сморщиванием и без, глиоцитов измененных по светлomu типу (расчеты производили на 200 клеток). Рассчитывали глионейрональный индекс. Изучали численную плотность нейронов и глиоцитов. На срезах окрашенных гематоксилином эозином подсчитывали удельную площадь измененных и неизмененных сосудов, удельную площадь и численную плотность капилляров на $0,06 \text{ мм}^2$, используя программу обработки графических изображений (Axio Vision фирмы CarlZeiss, ImageJ).

На полутонких срезах окрашенных Азуром II рассчитывали среднее количество перинейрональной глии на 100 нейронов в IV слое первичной зрительной коры, соотношение нейрон: капилляр: глиоцит, используя программу обработки графических изображений (Axio Vision фирмы CarlZeiss, ImageJ).

На ультратонких срезах, контрастированных уранил ацетатом и цитратом свинца изучали удельную площадь органелл в нейронах (митохондрий, гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, лизосом). На срезах контрастированных фосфорновольфрамовой кислотой исследовали численную плотность симметричных, ассиметричных (положительно искривленных, отрицательно искривленных и плоских) синапсов. Анализировали активную зону контракта и длину синапсов всех типов с помощью программы обработки графических изображений (Axio Vision фирмы CarlZeiss, ImageJ). Подразделяли синапсы по протяженности активной зоны контакта (АЗК) на мелкие (100-200 нм), малые (200-300 нм), средние (300-500 нм), крупные (500-700 нм) и очень крупные ($> 700 \text{ нм}$).

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили в программе SPSS Statistics (IBM). Проверку статистических гипотез на характер распределения признака

проводили при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. При обработке полученных результатов использовали методы описательной и непараметрической статистики. Исследуемые параметры описывали как медиану, и квартили, $M (Q_1; Q_3)$. Для множественных сравнений использовали критерий Краскала-Уоллиса, для парного – Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастные морфофункциональные изменения первичной зрительной коры при световом воздействии и их коррекции п-тирозолом

Нейроны и межнейрональные контакты

У крыс 18-месячного возраста во II, IV и V слоях первичной зрительной коры возрастные изменения нейронов характеризовались появлением обратимо и необратимо измененных форм клеток. К обратимым изменениям относили гиперхромиию без сморщивания клеток и очаговый хроматолиз, к необратимым – гиперхромные нейроны со сморщиванием и тотальный хроматолиз. Процентное содержание гиперхромных сморщенных нейронов увеличивалось до 3,5% (2,5;4) в IV, до 2,5% (2;3,5) – в V слое у интактных 18-месячных крыс по сравнению с показателями интактных 3-месячных животных 1% (0,5;1,5); 0,5% (0;1,5) соответственно ($p \leq 0,05$ по критерию Манна-Уитни). При коррекции п-тирозолом у 18-месячных крыс выявлено достоверное снижение процентного содержания гиперхромных сморщенных нейронов в IV слое первичной зрительной коры до 0,5% (0;0,5), что в 7 раз меньше по сравнению с показателями интактных 18-месячных крыс и, вероятно, связано с защитным эффектом п-тирозола ($p=0,00$ по критерию Краскала-Уоллиса). Также при коррекции обнаружено увеличение процентного содержания нейронов с очаговым хроматозом до 6,5% (4,5;8) по сравнению с показателями интактных 18-месячных крыс 1,5% (1;2,5), ($p=0,00$ по критерию Краскала-Уоллиса). В ядрах таких нейронов преобладал эухроматин, кариолемма образовывала

инвагинации, в центре или на периферии ядра обнаруживали крупное ядрышко, что свидетельствовало, вероятно, об их активном функциональном состоянии (Коломеец Н.С. и др., 1990).

При световом воздействии деструктивные изменения нейронов оказались более выраженными у 18-месячных крыс в IV слое по сравнению с показателями 3-месячных животных при световом воздействии. Процентное содержание гиперхромных сморщенных нейронов в IV слое первичной зрительной коры у 18-месячных крыс при световом воздействии составило 6% (5;6,5), у 3-месячных крыс – 1% (0,5;2), ($p=0,00$ по критерию Манна-Уитни). При световом воздействии у 3- и 18-месячных крыс встречались нейроны с диффузным растворением глыбок хроматофильной субстанции. Процентное содержание нейронов с тотальным хроматолизом у 3-месячных крыс составило 7,5% (6;9,5), у 18-месячных – 6,5% (5,5;8,2) по сравнению с соответствующими показателями интактных 3- и 18-месячных крыс 0,5% (0;1,5); 0,5% (0,5;1), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса). Ультраструктурный анализ показал снижение удельной площади митохондрий до 7% (5;9) у 18-месячных крыс при световом воздействии по сравнению с показателями интактных 18-месячных крыс 13 (11;15,5), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса), тогда как в группе 3-месячных крыс со световым воздействием удельная площадь митохондрий оставалась на уровне интактных животных, что, возможно, связано с исходной митохондриальной дисфункцией при старении (Greco M. et al., 2003; Lopez-Otin C. et al., 2013).

При коррекции регистрировалось снижение процентного содержания нейронов с тотальным хроматолизом в IV слое первичной зрительной коры до 5% (4,5;6) у 3-месячных, до 4% (3;4,5) – у 18-месячных крыс при световом воздействии, что в 1,5 и 1,6 раза ниже показателей крыс соответствующего возраста без коррекции и связано, вероятно, с протективным эффектом п-тирозола ($p\leq 0,05$). Нейропротективный эффект п-тирозола ранее подтвержден на модели ишемии-реперфузии головного мозга у крыс (Bu Y. et al., 2007; De La

Cruz J.P. et al., 2015; Осипенко А.Н. и др., 2017; Atochin D.N. et al., 2016). Коррекция п-тирозолом в условиях высокоинтенсивного светового воздействия способствовала увеличению удельной площади митохондрий у 3-месячных крыс до 16% (13;17), у 18-месячных крыс – до 10% (8,2;11), что в 2 и 1,4 раза больше такового у крыс без коррекции ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса). Также наблюдалось увеличение удельной площади гранулярной эндоплазматической сети до 15,7% (13;18) у 3-месячных крыс и до 12% (10,2;14) – у 18-месячных по сравнению с соответствующими показателями 3- и 18-месячных животных при световом воздействии без коррекции 2,5% (2;4); 8% (6,5;9), что подтверждало защитный эффект п-тирозола ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса).

При изучении межнейрональных контактов в IV слое первичной зрительной коры у 3- и 18-месячных крыс при световом воздействии выявлено набухание отростков, отек митохондрий и изменение контактов по светлому типу деструкции. Такая реакция неспецифична, и выявляется при различных экстремальных воздействиях (Пашенко П.С. и др., 2015; Логвинов С.В. и др., 2008; Semchenko V.V. et al., 2006). У 18-месячных крыс при световом воздействии степень дегенеративных изменений синапсов более выражена, чаще встречались контакты, измененные по темному типу, что, вероятно, связано с деафферентацией (Семченко В.В. и др., 2014). При световом воздействии общая численная плотность синапсов в группе 18-месячных крыс снижалась до 12 (11;14) по сравнению с соответствующими показателями интактных 18-месячных крыс 17 (15;17,5), ($p=0,01$ по критерию Краскела-Уоллиса).

Количественное исследование синапсов показало достоверное снижение численной плотности зрелых, ассиметричных, положительно искривленных контактов у 3-месячных животных до 10 (10;15), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса), у 18-месячных – до 9 (7,5;10), ($p=0,02$ по критерию Краскела-Уоллиса) по сравнению с показателями интактных 3- и 18-месячных крыс 16 (12,5;18); 13 (12;14) соответственно. Ассиметричные синапсы представляли активные, аксо-дендритические контакты, в их числе и наиболее пластичные аксо-шипииковые синапсы (Holtmaat A. et al., 2006; Raven F. et al., 2018). Известно, что разрушение

синапсов является мощным стимулом для образования новых связей (Sailor K.A. et al., 2017). Так в группе 3-месячных крыс со световым воздействием обнаружено значимое повышение численной плотности симметричных (незрелых) контактов, а также очень мелких синапсов с длиной активной зоны контакта 100-200 нм до 6 (4;6) по сравнению с аналогичными показателями интактной группы 2 (1;3), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса).

При коррекции в группе 3-месячных крыс со световым воздействием наблюдалось достоверное увеличение численной плотности симметричных (незрелых) синапсов до 9 (9;10), ($p=0,02$ по критерию Краскела-Уоллиса) и синапсов с короткой длиной АЗК 200-300 нм – до 8 (7;8), ($p=0,01$) по сравнению с соответствующими показателями крыс при световом воздействии без коррекции 7 (4;8); 4 (3;5). Также, увеличивалась численная плотность гипертрофированных синапсов с длиной АЗК более 700 нм до 5 (4;5) по сравнению с аналогичными показателями 3-месячных крыс при световом воздействии без коррекции 2 (1;3), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса), что свидетельствовало о реорганизации межнейрональных связей (Семченко В.В. и др., 2014). У 18-месячных крыс при световом воздействии и коррекции выявлено увеличение численной плотности синапсов с короткой длиной АЗК 100-200 нм до 3 (2,25;4) и 200-300 нм – до 4 (4;5) по сравнению с показателями 18-месячных крыс со световым воздействием без коррекции 1 (0;1); 2 (1,5;2) соответственно, что, вероятно, свидетельствовало об активации неосинаптогенеза ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса).

Глиальные реакции

Важную роль в сохранении нейронального и синаптического пула играют глиоциты, дисфункция которых может способствовать повреждению нейронов и разрушению синаптических связей между ними (Balez R. et al., 2016). Морфологические изменения глиоцитов у интактных 18-месячных крыс были более выражены в IV и V слоях и носили как регрессивный, так и

пролиферативный характер. Регрессивный выражался в увеличении деструктивных форм глиии – гиперхромных глиоцитов со сморщиванием. Пролиферативные изменения – в увеличении численной плотности глиии во всех исследованных слоях и глионейронального индекса в IV ($p \leq 0,05$). Возрастное изменение числа глиоцитов могло отражаться на тонких процессах метаболического обеспечения нейронов и пластичности нервной системы в целом (Fields R.D. et al., 2015). п-Тирозол снижал процентное содержание гиперхромных глиоцитов со сморщиванием в IV слое до 2% (1;2) по сравнению с показателями 18-месячных крыс без коррекции 5 (5;6,5), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса).

При световом воздействии все глиоциты по тинкториальным свойствам были разделены на 2 группы: светлые и темные. Светлые глиоциты характеризовались более светлым окрашиванием цитоплазмы и ядра, темные подразделяли на сморщенные и гиперхромные глиоциты без сморщивания. В группе 18-месячных крыс при световом воздействии вокруг поврежденных нейронов наблюдалась глиальная реакция в виде нейронофагии, а также внедрения глиоцитов в цитоплазму нейронов, что, возможно, являлось проявлением внутриклеточной регенерации (Кубатиев А.А. и др., 2012; Пальцын А.А. и др., 2008).

Светлые глиоциты, вероятно, относились к набухшей астроглии, встречающейся в ряде физиологических (Kofuji P. et al., 2004; Bellot-Saez A. et al., 2017) и патологических состояний (Sobaniec-Lotowska M.E. et al., 2003; Mongin A.A. et al., 2016). У 18-месячных животных при световом воздействии процентное содержание светлых глиоцитов увеличивалось до 20% (17;21) в IV слое первичной зрительной коры по сравнению с аналогичными показателями 3-месячных крыс при световом воздействии 10% (9;11), ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса). В группах 3- и 18-месячных крыс при световом воздействии процентное содержание гиперхромных, сморщенных глиоцитов в IV слое увеличивалось до 3% (3;5) и 8% (7;9,5) по сравнению с показателями интактных крыс 1,5% (1;2,5) и 5% (5;6,5), ($p=0,02$; $p=0,01$ по критерию Манна-Уитни).

При коррекции п-тирозолом наблюдалось достоверное снижение процентного содержания светлых, отечных глиоцитов в группе 3-месячных крыс при световом воздействии до 5% (3;6,5) в IV слое первичной зрительной коры, что в 2 раза меньше по сравнению с показателями 3-месячных крыс при световом воздействии без коррекции ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса). У 18-месячных крыс при световом воздействии на фоне коррекции достоверно снижалось процентное содержание светлых глиоцитов до 12% (11;14) в IV слое, что в 1,6 раза ниже такового без коррекции ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса). На фоне коррекции п-тирозолом у 3-месячных крыс при световом воздействии также наблюдалось увеличение значений глионейронального индекса до 1,4 (1,2;1,9), ($p=0,02$ по критерию Краскела-Уоллиса) и количества перинейрональной глии на 100 нейронов— до 16 (15;20) по сравнению с аналогичными показателями 3-месячных животных при световом воздействии без коррекции 0,8 (0,65;1,2), ($p=0,03$ по критерию Краскела-Уоллиса) и 12 (11;15), ($p=0,04$ по критерию Краскела-Уоллиса), что свидетельствовало о защитных эффектах препарата.

Сосуды и гематоэнцефалический барьер

Морфологические изменения микроциркуляторного русла в группе 18-месячных крыс были более выраженными по сравнению с показателями 3-месячных животных. Стенки артериол нередко утолщены и извиты, вокруг венул часто наблюдался отек. На ультраструктурном уровне обнаруживались деструктивные изменения органелл в виде многослойных пластин и мультивезикулярных телец в отростках астроцитов, окружающих капилляры, очаговое расслоение базальной мембраны эндотелиоцитов.

При световом воздействии в просвете капилляров первичной зрительной коры 3-месячных крыс встречались явления сладжа и стаза эритроцитов. Люминарная поверхность эндотелия некоторых капилляров образовывала микроворсинки, в цитоплазме обнаруживались скопления пиноцитозных пузырьков, набухание митохондрий с деструкцией крист. В отростках астроглии,

окружающих капилляры встречались мультивезикулярные и слоистые тельца. Похожие изменения наблюдали при воздействии микроволнового излучения (Логвинов С.В, 1994), ишемии головного мозга (Haley M.J. et al., 2017).

У 3-месячных крыс со световым воздействием выявлено увеличение численной плотности капилляров до 33 (29;35) по сравнению с показателями интактных крыс 29 (27;31), что, вероятно, связано с их открытием ($p=0,04$ по критерию Краскела-Уоллиса). Световое воздействие приводило к значимому снижению удельной площади до 0,6% (0,5;0,7) и численной плотности капилляров до – 23 (20;26) у 18-месячных крыс по сравнению с показателями интактных 18-месячных крыс 0,9% (0,8;1,2); 30 (28;32), что могло быть связано с перикапиллярным отеком отростков астроцитов и механической компрессией сосудов извне, а также со спазмом капилляров ($p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса).

При коррекции п-тирозолом у крыс 3-месячного возраста со световым воздействием обнаружено достоверное увеличение численной плотности капилляров до 40 (38;43), и удельной площади капиллярного русла до–4,8% (3,6;4) по сравнению с показателями 3-месячных крыс со световым воздействием без коррекции 33 (29;35); 0,9% (0,75;0,9), что, вероятно, отражало улучшение микроциркуляции в связи с повышением метаболического запроса нервных клеток ($p=0,04$; $p=0,00$ по критерию Краскела-Уоллиса). При коррекции у 18-месячных крыс со световым воздействием выявлено увеличение численной плотности капилляров до 27 (26;29), удельной площади до–0,8% (0,4;1), что в 1,2 и 1,3 раза выше таковых у животных при световом воздействии без коррекции и, вероятно, отражало улучшение микроциркуляции ($p=0,02$ по критерию Краскела-Уоллиса). Похожие результаты обнаружены в экспериментах на спонтанно гипертензивных крысах, где п-тирозол достоверно увеличивал численную плотность капилляров (Plotnikov M.B. et al., 2018).

Согласно литературным данным, световое воздействие вызывает тотальную гибель нейросенсорных клеток и очаговую – ганглионарных нейронов сетчатки (рисунок 1), (Варакута Е.Ю. и др., 2015; Жданкина А.А. и др.,

2010; Логвинов С.В. и др., 2006). Последнее событие вместе с демиелинизацией зрительного нерва прерывало поток афферентных импульсов в подкорковые и корковые зрительные центры, что запускало механизм транснейрональной дегенерации (You Y. et al., 2019). Вероятно, первые изменения возникали в межнейрональных контактах. После 7 суток светового воздействия наблюдались деструктивные изменения синапсов, что выражалось в снижении численной плотности активных ассиметричных контактов. На фоне деструкции мы наблюдали повышение численной плотности мелких симметричных синапсов, что свидетельствовало об активации неосинаптогенеза. Более выраженные изменения регистрировались в IV слое первичной зрительной коры 18-месячных крыс, что наводило на мысль о наличии общих патофизиологических механизмов возрастных изменений и транснейрональной дегенерации. Предположительно—это развитие окислительного стресса и увеличение уровня провоспалительных цитокинов, что, вероятно, усугубляло дисфункцию гематоэнцефалического барьера (Cenini G. et al., 2019; Norden D.M. et al., 2013). В данном исследовании показано, что в первичной зрительной коре при световом воздействии развивались процессы необратимого повреждения и компенсаторно-восстановительной реорганизации нейронов. Реактивные и деструктивные изменения глии, вероятно, происходили одновременно с изменением межнейрональных контактов, так как глия относится к высокомобильной клеточной популяции. п-Тирозол достоверно снижал деструкцию нейронов, положительно влияя на состояние микроциркуляции в первичной зрительной коре головного мозга 3- и 18-месячных крыс благодаря сочетанию антиоксидантных и гемореологических и противовоспалительных свойств.



Рисунок 1. Изменение первичной зрительной коры при фотоповреждении сетчатки.

ВЫВОДЫ:

1. Возрастные изменения клеточной популяции первичной зрительной коры характеризовались гиперхромией со сморщиванием части клеток, увеличением глионейронального индекса за счет пролиферации и/или миграции глиоцитов, ультраструктурными изменениями элементов гематоэнцефалического барьера. п-Тирозол снижал содержание деструктивных форм нейронов и глиоцитов.

2. При световом воздействии в первичной зрительной коре наблюдалось увеличение процентного содержания деструктивных форм нейронов, наиболее измененным оказался IV слой у 18-месячных крыс. п-Тирозол улучшал морфофункциональное состояние нейронов за счет увеличения удельной площади митохондрий и гранулярной эндоплазматической сети, что сопровождалось снижением деструкции нервных клеток.

3. Изменения синаптического пула при световом воздействии были более выражены у 18-месячных крыс и характеризовались снижением численной плотности функционально активных, асимметричных контактов. Деструкция синапсов сопровождалась активацией неосинаптогенеза у 3-месячных крыс и частично компенсировалась гипертрофией сохранившихся контактов у 18-месячных животных. п-Тирозол способствовал поддержанию синаптического пула, за счет активации неосинаптогенеза.

4. При световом воздействии изменения глиии носили как реактивный, так и деструктивный характер. Реактивный выражался в увеличении процентного содержания светлых форм глиии, деструктивный – гиперхромией и сморщиванием клеток. п-Тирозол стимулировал прогрессивно-пролиферативные изменения глиии за счет увеличения миграции и/или пролиферации у 3-месячных животных.

5. Изменения структурных элементов гематоэнцефалического барьера при световом воздействии характеризовались деструкцией органелл в отростках астроглии и цитоплазме перицитов, морфологическими признаками активации процессов транцитоза в эндотелии сосудов. п-Тирозол улучшал микроваскуляризацию первичной зрительной коры, что проявлялось увеличением численной плотности открытых, функционирующих капилляров.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Возрастные морфологические изменения глионейронального комплекса первичной зрительной области коры больших полушарий крыс, коррекция п-тирозолом / **Ю.О. Свердева**, Е.Ю. Варакута, С.В. Логвинов, А.А. Жданкина, А.В. Потапов, А.В. Герасимов, А.В. Солонский, Г.А. Суханова // **Сибирский вестник психиатрии и наркологии**. – 2016. – Т. 93, №4. – С. 5-8.

2. Возрастные структурные изменения нейронов затылочной доли коры больших полушарий головного мозга крыс, коррекция п-тирозолом / **Ю.О. Свердева**, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов // **Российский медико-**

биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2016. – Т. 24, №2. – С. 183-184.

3. Возрастные структурные изменений нейроглии первичной зрительной области коры мозга у крыс: влияние п-тирозола / **Ю.О. Свердева**, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов, Р.В. Данильчук, Ю.Ю. Мельник, Л.А. Григорьева // Морфология. – 2017. – Т. 151, №3. – С. 101-102.

4. Возрастные структурные изменения клеток первичной зрительной коры у крыс при высокоинтенсивном световом воздействии / **Ю.О. Свердева**, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов, С.В. Логвинов // **Успехи геронтологии.** – 2018. – Т. 31, №3. – С. 352-355.

5. Изменения нейронов первичной зрительной коры крыс на модели фотоповреждения сетчатки и коррекции паратирозолом / **Ю.О. Свердева**, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов, Р.В. Данильчук, Ю.Ю. Мельник, Л.А. Григорьева // Морфология. – 2018. – Т. 153, №3. – С. 247-247.

6. Влияние света высокой интенсивности на нейроны первичной зрительной коры крыс разного возраста / Н.Е. Портнягина, **Ю.О. Свердева**, О.А. Белоусова, Т.А. Чучунова // Морфология. – 2018. – Т. 153, №3. – С. 224-224а.

7. Морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла первичной зрительной коры крыс при фотоповреждении сетчатки, их коррекция / **Ю.О. Бахарева**, Е.Ю. Варакута, Л.В. Ходырева, А.В. Потапов, Р.В. Данильчук, Ю.Ю. Мельник, Л.А. Григорьева, Е.А. Мишина // Морфология. – 2019. – Т. 155, №2. – С. 34-35.

8. Синаптическая пластичность первичной зрительной коры на модели фотоповреждения сетчатки, коррекция п-тирозоном / **Ю.О. Бахарева**, Е.Ю. Варакута, С.В. Логвинов, А.В. Потапов, А.А. Жданкина, М.Б. Плотников, А.В. Солонский, А.В. Герасимов, М.А. Сагнаева // Морфология. – 2019. – Т. 156, №6. – С. 84-84.

9. Структурные изменения сосудов микроциркуляторного русла и их окружения в первичной зрительной коре 3- и 18-месячных крыс при фотоповреждении сетчатки, их коррекция / **Ю.О. Бахарева**, Е.Ю. Варакута, С.В. Логвинов, А.В. Потапов, А.А. Жданкина, М.Б. Плотников, А.В. Солонский, А.В. Герасимов, М.А. Сагнаева // **Ульяновский медико-биологический журнал.** – 2020. – №2. – С. 123-131.

Подписано в печать «16» октября 2020 г.

Усл. авт. листов 1. Печать на ризографе.

Отпечатано в издательстве СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Заказ №__ Тираж 100 экземпляров