

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ ԱՆԱՀԻՏ ՎԱԶԳԵՆԻ

**ԱԼՑՀԱՅՄԵՐԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՄՈՂԵԼՈՒՄ ԳԱԼԱՐՄԻՆԻ ՊՐՈՏԵԿՑԻԱՅԻ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ՎԱՐՃԱՏԵՎ և ԵՐԿԱՐԱՏԵՎ ՀԻՇՈՂՈՒԹՅԱՆ ԿԱՌՈՒՅՑՆԵՐԻ
ՄՈՐՖՈ-ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ –2016

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. Л.А. ОРБЕЛИ

ВАРДАНЯН АНАИТ ВАЗГЕНОВНА

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУР КРАТКО- И
ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ МОЗГА НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА В
УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГАЛАРМИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09 - “Физиология человека и животных”

ЕРЕВАН 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվ. Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ջ.Ս. Սարգսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, Ռ.Շ. Սարգսյան
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ., Խ.Հ. Նահապետյան

Առաջատար կազմակերպություն Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016 թ. դեկտեմբերի 1-ին ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, Ֆիզիոլոգիայի 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, ք. Երևան, Օրբելի եղբ. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ ակադ. Լ. Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում գրադարանում և www.physiol.sci.am կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2016 թ հոկտեմբերի 31-ին

023 մասնագիտական խորհրդի

Գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.  Ն.Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена в Институте физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА

Научный руководитель: доктор биол. наук, проф. Дж.С. Саркисян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, Р.Ш. Саркисян
доктор биол. наук, проф. Х.О. Нагапетян

Ведущая организация: Национальный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 1 декабря 2016 г. в 14⁰⁰ ч. на заседании специализированного совета 023 по физиологии, в Институте физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА (0028, г. Ереван, ул. бр. Орбели 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА и на сайте www.physiol.sci.am

Автореферат разослан 31 октября 2016г.

Ученый секретарь специализированного совета 023, кандидат биол. наук

 Н.Э. Тадевосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Болезнь Альцгеймера (БА) - самая частая причина деменций у пожилых, поражающая более 26 миллионов человек в мире. Клиническая характеристика болезни – прогрессирующая потеря памяти и спад когнитивных возможностей. Пожилой возраст является главным фактором риска, что отражается в статистике: на каждые пять лет после 65-летнего возраста показатель риска увеличивается примерно вдвое, вырастая от 3 случаев в 65 лет до 69 случаев на тысячу человеко-лет к 95 годам [Bermejo-Pareja F. et al., 2008; Di Carlo A. et al., 2002]. Существуют и половые различия — женщины чаще заболевают болезнью Альцгеймера, в особенности после 85 лет [Di Carlo A. et al., 2002; Andersen K. et al., 1999]. По данным ВОЗ и ряда авторов, 0,556 % мирового населения может быть поражён болезнью к 2030 году [WHO, 2006; Ferri C. et al., 2005]. В 2006 году распространённость болезни в мире составляла 0,40 % (абсолютное количество — 26,6 млн человек), к 2050 году абсолютное количество больных увеличиться вчетверо [Brookmeyer R. et al., 2007]. К настоящему времени нет свидетельств превентивного действия ни одного из средств, которые могут замедлить или предотвратить наступление болезни [Kawas C., 2006; Luchsinger J., Mayeux R., 2004; Luchsinger J. et al., 2007]. Вместе с тем, эпидемиологические исследования говорят о том, что интеллектуальные занятия и регулярное общение способны замедлить наступление и развитие болезни [Verghese J., et al., 2003; Bennett D. et al., 2006]. Даже владение двумя языками ассоциируется с более поздним началом БА [Bialystok E. et al., 2007]. Наконец, иммунная система больного должна научиться распознавать и атаковать отложения амилоида, уменьшая их размеры и облегчая течение болезни [Hawkes C., McLaurin J., 2007; Solomon B., 2007; Woodhouse A. et al., 2007]. Представлены доказательства токсичности и разрушительного воздействия растворимых олигомеров амилоидного пептида (Аβ) на межклеточные нейротрансмиттерные сигналы, ведущие к редукции синаптической интеграции [Lacor P. et al., 2007]. Однако неизвестно отмеченные олигомеры Аβ инициируют ли механизмы торможения синаптической пластичности, потери синапсов и гибели нервных клеток при БА [Shankar G. et al., 2008]. Дискутируется физиологический антагонизм эффектов Аβ, с уделением внимания глутаматэргическим и холинэргическим механизмам генерирования и модулирования синаптической пластичности [Ondrejcek T. et al., 2010]. Нейрональные ацетилхолиновые рецепторы широко представлены в нейронах ядра Мейнерта (ЯМ), гиппокампа (Г) и играют важную роль в нейроглиальных взаимодействиях, будучи членами суперсемейства пентамерных лигандуправляемых ионных каналов, включающих ГАМК рецепторы. В механизмах межклеточных нейротрансмиттерных сигналов уязвимым звеном выступает энторинальная кора (ЭК) – Г, в основном образуемая глутаматэргическими нейронами и синапсами с непосредственным контролем ГАМКергических интернейронов и внешними входами, включающими холинэргические нейроны [Small D., 2008]. Основным нейропатологическим признаком БА является потеря холинэргических нейронов в базальных ганглиях [Schliebs R., Arendt T., 2006]. Интенсивно исследуется также роль Аβ-индуцированной дисрегуляции функций никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, лежащая в основе синаптической недостаточности при БА. Согласно гипотезе «амилоидного каскада» в головном мозге (в особенности в Г и коре мозга), ассоциированное со старением неравномерное распределение продуцирования и/или очистки Аβ приводит к постепенной ее аккумуляции и агрегации, инициирующего нейродегенеративный каскад, который включает отложение амилоида, воспаление, ОС, повреждение и гибель нейронов [Hardy J., Selkoe D., 2002]. В поддержку гипотезы на животных моделях показано, что олигомерные и фибриллярные формы Аβ вызывают нарушение длительной потенциации, синаптическую дисфункцию и ускоряют формирование нейро-фибрилярных нитей, что в конечном счете вызывает синаптическую недостаточность и нейрональную гибель [Shankar G. et al., 2008].

Цель и задачи исследования: Целью исследования явилось микроэлектрофизиологическое

выявление нарушения соотношения постстимульных возбуждательных и депрессорных проявлений синаптической активности в нейронах Г, амигдалы – rostral amygdalopiriform area (Ам) и базального ядра Мейнерта (БЯМ), т.е. отделах мозга, ведающих кратковременной (первичной) и долговременной (вторичной, третичной) памятью, соответственно, при ВЧС ЭК и Г, на амилоидной модели БА, индуцированной интрацеребровентральным введением (ИЦВ) токсического олигомера Аβ 25-35), в условиях воздействия Галармина, с оценкой протекторной действенности указанного сочетания в отношении функциональной пластичности, с последующим морфо-гистохимическим подтверждением полученных результатов в отдельных сериях исследований.

В соответствии с поставленной целью накачалось решение следующих задач:

1. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности в нейронах Г в условиях стимуляции ЭК на модели БА 12 нед срока, в сравнении с нормой;
2. То же (пункт 1) в нейронах Ам;
3. То же (пункт 1) в нейронах БЯМ;
4. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности в нейронах Ам в условиях стимуляции Г на модели БА 12 нед срока, в сравнении с нормой;
5. То же в (пункт 4) в нейронах БЯМ;
6. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности в нейронах Г в условиях стимуляции ЭК, Ам и БЯМ при стимуляции Г на модели БА 13-28 нед, в сравнении с нормой и 12 нед сроком выживания животного;
7. Электрофизиологическое исследование потока импульсной активности в нейронах гиппокампа в условиях стимуляции ЭК на модели БА, с протекцией Галармином;
8. То же (пункт 6) в нейронах Ам;
9. То же (пункт 6) в нейронах БЯМ;
10. Морфо-гистохимическое изучение (пункты 4-8) методом выявления активности кислой фосфатазы с целью определения патологических сдвигов и эффекта протекции в отдельных вышеотмеченных экспериментах.

Научная новизна. Анализ степени частотной выраженности депрессорных и возбуждательных одно- и разнонаправленных постстимульных проявлений активности структур кратко- (Г) и долговременной (Ам и БЯМ) памяти, активированных ЭК и Г, к 12 нед выживания, позволил заключить. На модели БА (контроль) в условиях протекции Галармином превышение нормы и контроля имело место в нейронах Г при ВЧС ЭК лишь в возбуждательной последовательности. На модели БА в нейронах Ам при ВЧС ЭК выявлено мощное превалирование всех видов активности, что указывает на компенсаторные возможности, замедляющие ухудшение долговременной памяти. Применение Галармина выявило превалирование возбуждательных эффектов над депрессорными (из-за эксайтотоксичности) в ЭК—Ам проекции, в то время как в Г – более выраженной оказалась депрессорная активность с более высоким уровнем восстановления возбуждательной активности. В условиях протекции в нейронах БЯМ на ВЧС ЭК также обнаружено улучшение в депрессорной активности, а возбуждательная - удерживалась лишь на контрольном уровне, и в обоих случаях не было достижения нормы. Однако, в нейронах БЯМ при ВЧС Г на леченных животных все виды активности демонстрировали уровень выше нормы. С удлинением сроков выдерживания животных на модели БА с 15 до 28 нед в нейронах Г при ВЧС ЭК тетаническая депрессия оказалась выраженной лишь в сочетании с возбуждением, не достигая нормы, но превышая 12 нед уровень. В нейронах Ам при ВЧС Г постстимульная депрессия держалась до 18 нед. В нейронах БЯМ при ВЧС Г тетаническая депрессия в обоих последовательностях к 28 нед превысила показатели 12 нед срока, но не нормы. Возбуждательные постстимульные реакции к концу испытаний фактически полностью и значительно спадали ниже и нормы и 12 нед срока, а в случае БЯМ - уже с 13 нед.

Морфологические исследования, в целом, подтвердили данные электрофизиологических.

Научно-практическое значение. БА - серьезное «заболевание 21 века [Washington, DC: Alzheimer's association; 2012], является большой общественной проблемой здоровья, с существенным экономическим и социальным воздействием во всем мире. Старение мозга большой фактор риска для НБ, неизбежно завершаемых когнитивным спадом и сенильной деменцией. Деменция - развивающийся глобальный общественный вызов здоровью: свыше 35 миллионов людей поражены ею во всем мире и всемирно установленная финансовая стоимость деменции уже в 2010 году была свыше US\$600 миллиардов [Wimo A., Prince M., 2010]. Наиболее распространенная причина деменции - БА, которая является фатальной НБ, характеризуемой прогрессивным когнитивным и функциональным ухудшением и потерей памяти. Распространенность болезни повышается с средней продолжительностью жизни, и поражает более чем одну-треть людей свыше 90 лет [Querfurth H., LaFerla F., 2010]. Нет средств для лечения или остановки прогрессии БА. Утвержденная фармакотерапия предоставляет лишь скромное преходящее симптоматическое облегчение. Утвержденных биомаркеров для раннего диагноза болезни также не существует. Иными словами, при интенсивных исследованиях в данной области, существенных результатов по окончательному разрешению этиопатогенеза и разработке успешной терапевтической стратегии нет. В настоящей работе, наряду с детальным исследованием синаптических процессов, лежащих в основе БА, в отличие от общепринятого экспериментального и тематического подхода, связанного лишь с Г, в качестве структуры кратковременной памяти, предлагается изучение таковых долговременной памяти (Ам и БЯМ), с вовлечением которых завершается развитие нейродегенеративных проявлений БА. К тому же, предлагается использование Галармина, зарекомендовавшего себя в качестве нейромодулятора-нейрогормона с широким спектром изученного воздействия, в частности, в отношении других нейродегенеративных болезней (НБ), в том числе неспецифического происхождения.

Апробация. Материалы и основные положения диссертационной работы представлены: на II Межд. научн. конф. «Наука и Медицина», г. Алматы, Республика Казахстан, 2015; Всеросс. научн. конф. «Актуальные вопросы современной медицины», г. Рязань, 2015; III Межд. научн. конф. «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», г. Шымкент, Республика Казахстан, 2015; XVII-ой Всеросс. научн. конф. «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» с межд. участием, Минздрава России, г. Киров, 2016; 58-ой межд. научн. конф. Госуд. мед. унив., г. Семей, 2016; «Научно-практической конф. молодых ученых и студентов», Астана, Республика Казахстан, 2016; III межд. научно-практич. конф. «Наука и медицина», г. Алматы, Республика Казахстан, 2016; «LVI научной конференции студентов и молодых учёных», с межд. участием, г. Актюбе, Республика Казахстан, 2016.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 5 работ.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, посвященного современным достижениям в области этиопатологии и терапевтической стратегии болезни Альцгеймера, материала и методов исследований, 4-х глав результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 192 источника. Иллюстрирована 33 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведены исследования на 33 половозрелых крысах-самцах Альбино, массой 200–250 гр., в 3 сериях экспериментов: 1. на интактных; 2. на амилоидной модели БА, индуцированной билатеральным ИЦВ Аβ 25–35; 3. и с протекцией Галармином (обогащенного пролином пептида – PRP-1, из расчета 10γ/100 г (со следующего дня 7 инъекций через день). При проведении экспериментов строго следовали «правилам ухода за лабораторными животными» (публикации НИИ № 85-23, 1985 год). ИЦВ введение

токсического олигомера Аβ 25-35 осуществляли в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) по координатам стереотаксического атласа (AP-1, L±1.5, DV+3.5 мм) [Paxinos, Watson, 2005]. Вводили по 3 мкл 10^{-9} М фрагменты Аβ 25-35 (1 мг/мл при 37°C, агрегированного в течение 4 дней) [Maurice, 1998]. До острого эксперимента крысы выдерживались 12 нед. В ряде случаев (на модели БА без протекции, с отведением нейронов Г на ВЧС ЭК, Ам и БЯМ при ВЧС Г), животные выдерживались более длительные сроки 13-28 нед. После истечения указанных сроков у животных с БА производили экстраклеточную регистрацию фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов Г, Ам и БЯМ при ВЧС ЭК и СА1 Г, соответственно. Операции осуществляли на наркотизированных животных (пентобарбитал натрия 40 мг/кгб в/б) в следующей очередной последовательности: фиксация черепа в стереотаксическом аппарате, краниотомия с удалением костей от брегмы до лямбды и отсепаровкой твердой мозговой оболочки. Предварительно животные обездвигивались 1% дитилином (25 мг/кг в/б) и переводились на искусственное дыхание. После краниотомии, стереотаксические ориентированные раздражающие электроды вводили в ипсилатеральную ЭК по координатам того же атласа (AP-11, L±3.5, DV+4.0 мм) и в Г (AP-3.5, L±2.0, DV+4.0 мм), а стеклянный отводящий микроэлектрод с диаметром кончика 1 мкм, заполненный 2М раствором NaCl - погружали в Г (AP-3.5, L±2.0, D+4.0 мм), Ам (AP-3.24, L±5.4-5.8, DV+9.5-10.2 мм) и БЯМ (AP-1.8, L ± 3.0, DV+7.4 мм). ВЧС (100 Гц в течение 1 сек) ЭК и СА1 Г производили посредством прямоугольных толчков тока длительностью 0,05 мс и силой 0,10–0,16 и 0,16–0,18 мА, соответственно.

Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД) с посттетанической потенциацией (ПТП) и депрессией (ПТД). Проводили программный математический анализ одиночной спайковой активности 1584 нейронов: Г (n=366), Ам (n=568) и БЯМ (n=650). Постстимульные проявления активности оценивали on-line регистрацией и программным математическим анализом, позволяющим селекцию спайков амплитудной дискриминацией с выводом «растеров» перистимульного спайкинга нейронов, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков (разработчик В.С. Каменецкий). Для избираемых сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности, а также произвольно избранных испытаний в отдельном нейроне, строили суммированные и усредненные перистимульные (PETN Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) с вычислением средней частоты спайков. Анализ полученных данных производили по специально разработанному алгоритму, обеспечивающему достоверность перистимульных изменений межспайковых интервалов. Однородность двух независимых выборок контролировалась t-критерием Стьюдента. С целью повышения статистической достоверности перистимульных изменений межспайковых интервалов использовали также двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon-Mann-Whitney test) [Орлов А., 2004], в качестве непараметрического, оценивающего однородность независимых двух выборок. Так как число регистрируемых спайков было достаточно велико, использовалась разновидность указанного теста – z-тест, определяющий его асимптотическую нормальность. Учет критических значений в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях 0.05, 0.01 и 0.001, показывает, что в большинстве случаев спайкинга нейрональной активности статистически значимое изменение достигало как минимум уровня 0.05.

Морфогистохимические исследования проводили методом выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (КФ) [Меликсетян И., 2007] на основе метода Гамори. Данный методический подход основан на выявлении внутриклеточных фосфорсодержащих соединений, занимающих ключевые позиции в обменных энергетических процессах, направленных на сохранение и самовоспроизведение витальных систем. Полученная картина позволяет судить об определенных звеньях метаболизма исследуемых структур и о морфогистохимических изменениях в мозгу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СООТНОШЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЬНЫХ И ДЕПРЕССОРНЫХ ПОСТСТИМУЛЬНЫХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА ПРИ АКТИВАЦИИ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ НА МОДЕЛИ БА И В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГАЛАРМИНОМ, В СРАВНЕНИИ С НОРМОЙ.

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов Г на ВЧС ЭК (697 нейронов, n=9): в норме (88 клеток, n=1), на модели БА (205 клеток, n=2) и с протекцией Галармином (73 клетки, n=2) на 12 нед выдерживания животных. Дополнительно проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов Г на ВЧС ЭК в более длительные сроки 15-16 и 28 нед.

По сравнению с престоимым уровнем в норме и на модели БА (в контроле без протекции), были обнаружены следующие изменения в депрессорных тетанических реакциях. Посредством анализа последних на основе усредненного количества спайков (PETH), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average) в нейронах Г на ВЧС ЭК в депрессорной последовательности после 12 нед, по сравнению с престоимым уровнем, выявлена 3.0-кратная тетаническая депрессия, в то время как в норме она достигала 7-кратного; в депрессорно-возбудительной последовательности имело место 7.0-кратное снижение престоимой активности, а в норме – 6.0-кратное. В нейронах Г на ВЧС ЭК на модели БА в условиях протекции Галармином ТД в ТД ПТД исчислялась в пределах 2.35-кратного занижения, ниже нормы (7-кратного), а ТД в ТД ПТП – 2-кратного, также ниже нормы (6-кратного). Постстимульные возбудительные эффекты изменялись в следующих пределах: на модели БА ТП в ТП ПТП достигала порядка 8.5-кратного завышения, намного выше нормы (4.5-кратного), а ТП в комбинации с ПТД – 3.0-кратного, также намного, но ниже нормы (10-кратного). В нейронах Г при ВЧС ЭК на модели БА, в условиях протекции Галармином, ТП в ТП ПТП исчислялась в пределах лишь 1.5-кратного завышения, также ниже нормы (4.5-кратного), а ТП в ТП ПТД – 2.0-кратного, значительно ниже нормы (10-кратного). Иными словами, на модели БА без протекции, лишь значения ТД в сочетании с ПТП и ТП в ТП ПТП превысили норму, в остальном не достигли ее. В условиях же протекции во всех случаях значения не достигали нормы, а ТП в ТП ПТД – даже пятикратно. При сравнении модели без протекции и леченной – в условиях протекции не имело места превалирования значений, в особенности, в отношении ТД ПТП и ТП ПТП (где разница достигала 4-кратного и 5.66-кратного, соответственно).

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбудительных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растров пре – и постстимульных депрессорных, возбудительных и разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов Г при ВЧС ЭК на модели БА после 12 нед выдерживания животных, в условиях протекции Галармином и в норме, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены значения, представленные в виде дисковых диаграмм для более наглядного представления степени выраженности в частотном отображении (в %) экспериментальных данных. Иными словами, по степени частотной выраженности сравнение депрессорных и возбудительных тетанических эффектов в одно- и разнонаправленных постстимульных проявлениях активности привело к следующему заключению. Норма превалировала, за исключением возбудительной последовательности. В патологии тетаническая депрессия и потенциация во всех случаях превышали таковые с протекцией, а тетаническая потенциация в возбудительной последовательности намного превысила даже норму, по-видимому из-за эксайтотоксичности.

Исследование относительной степени выраженности постстимульных проявлений

активности нейронов Г при ВЧС ЭК на модели БА, в условиях более длительных сроков (15-16 и 28 нед) выдерживания животных, выведенных на основе растров пре – и постстимульных депрессорных, возбуждательных и разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов Г при ВЧС ЭК на модели БА, а также представленных в виде дисковых диаграмм (степени выраженности в частотном отображении), в сравнении с таковыми 12 нед. срока и с нормой, привел к следующему заключению. С удлинением сроков исследования на модели БА до 15- 28 нед в нейронах Г при ВЧС резко падает тетаническая потенция (в обеих последовательностях), в сравнении с нормой и еще больше - с 12 нед сроком (4.63 раза), начиная уже с 15-16 нед. Однако, тетаническая депрессия в депрессорной последовательности прогрессивно нарастает, превышая параметры 12 нед срока уже с 15-16 нед, к 28 нед и норму; в депрессорно-возбуждательной последовательности, наоборот, сначала на 15-16 нед она падает, по сравнению с 12 нед, а к 28 нед превышает уровень 12 нед, но достаточно не достигает нормы (1.74 раза). Иными словами, в целом, тетаническая депрессия, в качестве протекторных компенсаторных возможностей мозга, срабатывает лишь в одной постстимульной депрессорной последовательности, а в депрессорно- возбуждательной, не достигая уровня нормы, превышает таковой на 12 нед исследования. Что же касается возбуждательных постстимульных реакций, они фактически полностью и значительно спадают.

СООТНОШЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЬНЫХ И ДЕПРЕССОРНЫХ ПОСТСТИМУЛЬНЫХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕЙРОНАХ АМИГДАЛЫ ПРИ АКТИВАЦИИ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА НА МОДЕЛИ БА И В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГАЛАРМИНОМ, В СРАВНЕНИИ С НОРМОЙ.

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов Ам на ВЧС ЭК и Г (237+331 нейронов, n=5+6): в норме (35+54 нейронов, n=1+2), на модели БА (103+127 нейронов, n= 2+2) и с протекцией (99+150 нейронов, n=2+2).

По сравнению с престимульным уровнем в норме и на модели БА (в контроле без протекции), были обнаружены следующие изменения в депрессорных тетанических реакциях. Посредством анализа последних на основе усредненного количества спайков (РЕТН), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average) в нейронах Ам на ВЧС ЭК в депрессорной последовательности после 12 нед, по сравнению с престимульным уровнем, выявлена 23.0-кратная тетаническая депрессия, в то время как в норме она достигала лишь 4.25-кратного; в депрессорно-возбуждательной последовательности имело место 22.0-кратное снижение престимульной активности, а в норме – также намного меньше (4.66-кратное). В условиях протекции Галармином ТД в ТД ПТД считалась в пределах 2-кратного снижения, меньше нормы (4.25-кратного), а ТД в ТД ПТП – лишь порядка 1-кратного снижения, опять меньше нормы (4.66-кратного). Возбуждательные постстимульные реакции изменялись в следующих пределах. На модели БА без протекции в нейронах Ам на ВЧС ЭК ТП в ТП ПТП достигала 10.25-кратного превышения престимульной активности, больше нормы (7.83-кратного), ТП в ТП ПТД – 14-кратного превышения, намного больше нормы (2.14-кратного). В условиях протекции Галармином ТП в ТП ПТП исчислялась порядка 1.66-кратного, значительно меньше нормы (7.83-кратного), а ТП в ТП ПТД уже достигала превышения в пределах 2.5-кратного, даже больше нормы (2.14-кратного). Таким образом, на модели БА без протекции во всех случаях испытаний, т.е. как в депрессорной, так и возбуждательной постстимульной последовательностях, в сравнении с нормой, имели место высокие значения занижения и завышения престимульного уровня активности, особенно выраженные в депрессорных проявлениях (порядка 5.41- и 4.7-кратного, соответственно) и в пределах 1.3- и 6.5-кратного – в возбуждательных, что свидетельствует о успешной

мобилизации компенсаторных возможностей мозга. В условиях же протекции Галармином лишь в случае возбuditельно-депрессорной последовательности выявлялось некоторое превышение нормы, в остальных случаях показатели оказались ниже нормы, особенно в возбuditельной последовательности, что можно констатировать как успешное противостояние эксайтотоксичности.

На модели БА без протекции в нейронах Ам при ВЧС Г были выявлены следующие изменения в постстимульных депрессорных проявлениях активности. ТД в ТД ПТД в депрессорной последовательности достигала 3.5-кратного снижения престимульной активности, выше нормы (2-кратного), а в ТД ПТП – порядка 5-кратного, еще выше нормы (2 кратного). В условиях протекции Галармином в нейронах Ам ТД в ТД ПТД исчислялась в пределах 2.75-кратного снижения престимульной активности, выше нормы (2-кратного), а ТД в ТД ПТП достигала 5.16-кратного, более чем двухкратного снижения престимульной активности, в сравнении с нормой (2-кратного). Иными словами, на модели БА без- и в условиях протекции углубление тетанической депрессии в гипоталамо-амигдаллярной проекции выше нормы, полагаемой в качестве протекторной, в особенности в депрессорно-возбuditельной последовательности, следует считать успешным в аспекте противостояния нейродегенерации, в том числе эксайтотоксичности. Что же касается возбuditельных постстимульных проявлений активности нейронов Ам на модели БА при ВЧС Г без протекции получены следующие значения постстимульных сдвигов активности. ТП а ТП ПТП выявлялась в пределах 1.43-кратного завышения активности, ниже нормы (2.66-кратного), а ТП в ТП ПТД – 1.21-кратного завышения, несколько ниже нормы (3-кратного). В условиях протекции Галармином в нейронах Ам на ВЧС Г ТП в ТП ПТП достигала 1.55-кратного завышения, ниже нормы (2.66-кратного), а ТП в ТП ПТД – 1.65-кратного, также ниже нормы (3-кратного). Указанные изменения в возбuditельных постстимульных проявлениях активности по-видимому можно отнести к нейтрализации эксайтотоксичности благодаря как компенсаторным возможностям мозга, так и эффективности поддерживавшей их терапии.

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных депрессорных возбuditельных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растров пре – и постстимульных депрессорных, возбuditельных и разнонаправленных проявлений спайковой активности Ам на ВЧС ЭК и Г, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены значения, представленные в виде дисковых диаграмм для более наглядного представления степени выраженности в частотном отображении (в %) экспериментальных данных на модели БА, в сравнении с нормой (Рис. 2, 3). Как видно из диаграмм, при сравнении депрессорных и возбuditельных одно- и разнонаправленных постстимульных реакций, на модели БА в нейронах Ам при ВЧС ЭК выявлено следующее. Мощное превалирование всех видов нейрональной активности при интоксикации указывает на поразительные компенсаторные возможности организма, в частности нейронов амигдаллярной структуры. Данный факт может объяснить позднее поражение долговременной памяти при БА. При этом, превалирование возбuditельных эффектов над депрессорными при применении Галармина говорит о наличии высокой степени эксайтотоксичности в данной структуре. В то же время, гиппокампальные проекции Ам демонстрируют более выраженную депрессорную активность при лечении. Также выявлен высокий уровень восстановления возбuditельной активности по сравнению с энторинальными проекциями. Исследование относительной степени выраженности постстимульных проявлений активности нейронов Ам при ВЧС Г на модели БА, в условиях более длительных сроков (13-18 нед) выдерживания животных, выведенных на основе растров пре – и постстимульных депрессорных, возбuditельных и разнонаправленных проявлений спайковой активности, а

также представленных в виде дисковых диаграмм (степени выраженности в частотном отображении), в сравнении с таковыми 12 нед. срока и с нормой, привел к следующему заключению. В нейронах Ам на ВЧС Г постстимульная возбудительная активность с удлинением сроков выживания на модели БА, как и в случае нейронов Г на ВЧС ЭК, значительно падает к 18 нед, по сравнению с нормой и 12 нед сроком в возбудительной последовательности (почти в три раза), а в возбудительно-депрессорной, с небольшими скачками, до 16 нед – ниже нормы и еще ниже 12 нед срока. Однако, здесь также, как и в нейронах Г, в обеих последовательностях начиная с 13 нед идет спад ниже нормы и 12 нед срока, затем к 18 нед – подъем выше 12 нед срока в депрессорной последовательности, но ниже нормы, а в депрессорно- возбудительной – даже выше нормы и намного выше 12 нед срока. Таким образом, сравнительно небольшое удлинение сроков выживания на модели БА без фармакологической протекции, до 18 нед испытаний компенсаторные возможности организма, в виде постстимульной депрессии, продолжают проявлять себя, но возбудительные исчерпаны, начиная с 13 нед.

СООТНОШЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЬНЫХ И ДЕПРЕССОРНЫХ ПОСТСТИМУЛЬНЫХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕЙРОНАХ БАЗАЛЬНОГО ЯДРА МЕЙНЕРТА ПРИ АКТИВАЦИИ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА НА МОДЕЛИ БА И В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГАЛАРМИНОМ, В СРАВНЕНИИ С НОРМОЙ.

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов БЯМ на ВЧС ЭК и Г (309+341нейронов, n=6+7): в норме (55+90 нейронов, n=1+4), на модели БА (149+110 нейронов, n= 2+1) и с протекцией (105+141нейронов, n=3+2).

По сравнению с престоимпульным уровнем в норме и на модели БА (в контроле без протекции) в нейронах БЯМ при ВЧС ЭК были обнаружены следующие изменения в депрессорных тетанических реакциях. Посредством анализа последних на основе усредненного количества спаиков (РЕТН), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average) ТД в депрессорной последовательности после 12 нед, по сравнению с престоимпульным уровнем, достигла 2.4-кратного занижения престоимпульной активности, намного ниже нормы (15-кратного), а ТД в ТД ПТП – 2.66-кратного, в тех же значительных пределах ниже нормы (15-кратного). ТП в ТП ПТП исчислялась в пределах 1.3-кратного превышения престоимпульной активности, меньше нормы (2.4-кратного), а ТП в ТП ПТД – 1.27-кратного, намного ниже нормы (13-кратного). В условиях протекции Галармином в нейронах БЯМ при ВЧС ЭК ТД в ТД ПТД достигала уже 8-кратного снижения престоимпульной активности, но опять ниже нормы (15-кратного), а ТД в ТД ПТП – 4.55-кратного занижения, ниже нормы (15-кратного). В указанных условиях ТП в ТП ПТП исчислялась порядка 1.5-кратного превышения, ниже нормы (2.4-кратного), а ТП в ТП ПТД – 1.26-кратного, намного ниже нормы (13-кратного).

В нейронах БЯМ на модели БА без- и с протекцией при ВЧС Г имели место следующие изменения постстимульной депрессорной и возбудительной активности. На модели БА ТД в ТД ПТД достигала 2.5-кратного занижения, ниже нормы (4-кратного), а ТД в ТД ПТП – 2.5-кратного, выше нормы (2-кратного). На модели БА ТП в ТП ПТП исчислялась в пределах 1.5-кратного превышения, ниже нормы (2-кратного), а ТП в ТП ПТД – 1.12-кратного, ниже нормы (1.5-кратного). В условиях протекции Галармином ТД в ТД ПТД нейронов БЯМ на ВЧС Г достигала 3-кратного занижения, ниже нормы (4-кратного), а ТД в ТД ПТП – 5-кратного, уже выше нормы (2-кратного). В указанных условиях протекции ТП в ТП ПТП исчислялась порядка 1.6-кратного превышения, ниже нормы (2.0-кратного) а ТП в ТП ПТД – 1.87-кратного, выше нормы (1.5-кратного). Таким образом, как депрессорные, так и возбудительные

постстимульные проявления активности нейронов БЯМ при ВЧС ЭК на модели БА без протекции оказались ниже нормы, фактически во всех последовательностях, за исключением чисто возбуждательной, достигая значительной разницы (порядка 6.25-, 5.64- и 10.2-кратного соответственно). В условиях протекции Галармином также во всех случаях норма значительно превалировала, в особенности в возбуждительно-депрессорной последовательности (10.3-кратно). В нейронах БЯМ на модели БА при ВЧС Г, хотя также значения постстимульных проявлений не достигали нормы, за исключением депрессорно-возбуждательной последовательности, разница была невысокой (1.6-, 1.33- и 1.34-кратно, соответственно). Наконец, в условиях протекции в однонаправленных последовательностях значения эффектов не достигали нормы (1.33- и 1.25-кратно), но превалировали – в разнонаправленных (2.5- и 1.24-кратно), т.е. незначительно.

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбуждательных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растров пре – и постстимульных депрессорных, возбуждательных и разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов БЯМ на ВЧС ЭК под протекцией Галармином, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены значения, представленные в виде дисковых диаграмм для более наглядного представления степени выраженности в частотном выражении, в сравнении с контролем и нормой (Рис. 4 и 5). В депрессорной активности БЯМ на ВЧС ЭК выявлено улучшение после применения Галармина. При возбуждательной активности использование Галармина после введения Аβ 25-35 лишь поддерживало функциональное состояние на уровне патологии. Однако в обоих случаях протекции функциональная активность не достигала уровня нормы. При стимуляции Г на леченных животных все виды активности демонстрировали уровень выше нормы.

Исследование относительной степени выраженности постстимульных проявлений активности нейронов БЯМ при ВЧС Г на модели БА, в условиях более длительных сроков (22-28 нед) выдерживания животных, выведенных на основе растров пре – и постстимульных депрессорных, возбуждательных и разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов Ам при ВЧС Г, а также представленных в виде дисковых диаграмм (степени выраженности в частотном отображении), в сравнении с таковыми 12 нед. срока и с нормой, привел к следующему заключению. В нейронах БЯМ на модели БА без протекции опять, как и в нейронах Г и Ам, с удлинением сроков постстимульные возбуждательные проявления, хотя и скачкообразно, спадают к 28 нед ниже и нормы и 12 нед срока. Постстимульная тетаническая депрессия в депрессорной последовательности сначала спадает на 22 нед, затем несколько превышает показатель 12 нед срока, но не нормы, а в депрессорно-возбуждательной последовательности, тетаническая депрессия постепенно нарастая превышает значения 12 нед срока, но не нормы.

МОРФО-ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА, АМИГДАЛЫ И БАЗАЛЬНОГО ЯДРА МЕЙНЕРТА НА МОДЕЛИ БА, В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГАЛАРМИНОМ, В СРАВНЕНИИ С НОРМОЙ.

Проведено сравнительное изучение морфофункционального состояния клеточных структур Г и Ам в норме, при ИЦВ введении Аβ 25-35 без- и в сочетании с системным введением Галармина.

У интактных крыс на фронтальных срезах Г заметен слоистый рисунок, чередование белого и серого вещества. Пирамидные клетки Г различаются размерами, формой, характером ветвления отростков. Наиболее крупные нейроны выделяются в зубчатой извилине, расположены они в разброс и характеризуются высокой активностью КФ. Нейроны

полей CA1 и CA3 расположены в ряды и очень сжаты, выделяются интенсивностью окрашивания и очень густым расположением нейронов. По форме они полигональные, треугольные, овальные, у них четко выделяются базальные дендриты. Их апикальные дендриты утолщены и прослеживаются без разветвлений на некотором расстоянии от тела.

Результаты морфогистохимического исследования мозга после введения A β 25–35 выявили морфологическую картину распространенности процесса нейродегенеративных изменений в Г, которая характеризуется отсутствием непрерывности ареалов, то есть некоторые области Г поражаются более интенсивно, а некоторые - остаются интактными. В начальной стадии клеточных поражений в цитоплазме наблюдается постепенное исчезновение осадка фосфата свинца. Отмечается нарушение структурности нейронов, полное отсутствие реакции нейрофибрилл в пирамидных клетках Г. Нейроны теряют свою характерную форму и округляются, вздуваются, у большинства из них перестают реагировать отростки, хотя у некоторых крупных пирамидных клеток видны еще сохранившиеся утолщенные верхушечные дендриты.

В цитоплазме набухших нейронов, лишенных отростков, происходит постепенное исчезновение гранулярного осадка. Данный процесс начинается с центральной части клеточного тела и напоминает картину центрального хроматолиза, наблюдаемую при методе Ниссля. У некоторых нейронов он обнаруживается в виде “розетки”, создавая картину расщепленного нейрона. В конечном итоге она дает картину клеточной тени или полного исчезновения. Процесс напоминает “исчезновение клеток”, описанное Нисселем “Zellschwund”, и поэтому Фюнфельд дал ему название “заболевание клеток в форме их исчезновения” [Никулеску И., 1963].

Морфологическая картина характеризуется неодинаковой зернистостью в цитоплазме клеток, падением фосфатазной активности в полях CA1, CA3 Г. Выраженные дегенеративные изменения отмечаются в поле CA1. Наблюдается полное отсутствие реакции отростков, нарушение формы и размеров нейронов, весьма характерным являются кругообразные «опустошенные» от нейронов участки. В межклеточном пространстве зубчатой извилины и в полях CA3 и CA1 обнаруживаются ядра глиальных клеток. В поле CA3 происходит округление и вздутие тел нейронов, большинство которых подвергнуты хроматолизу, хотя справедливо отметить, что ядра нейронов занимают центральное расположение. Крупные пирамидные клетки зубчатой извилины более устойчивы к амилоиду, однако у них также наблюдается тенденция к просветлению цитоплазмы. В таких набухших пирамидных клетках обнаруживается эктопированное, непропорционально большое вздутое ядро, окруженное в виде ободка темным слоем осадка (Гамори-позитивная грануляция). Создается впечатление, что ядро ищет оптимальные условия для выживания и часто оно так сильно вдавливается под клеточную оболочку, что клетка напоминает перстень. В таких случаях ядерная оболочка исчезает. Необходимо отметить еще одну форму поражения, морфологически похожую на старческую бляшку. Это довольно крупные круглые образования, внутри которых видны бесструктурные глыбки, окруженные светлой стекловидной массой, которая, в свою очередь, наподобие венца окружена утолщенными волокнами и ядрами нейроглии. Такие единичные образования встречались в зубчатой извилине Г.

У крыс, получивших Галармин в течение 14 дней после введения A β 25-35, отмечается увеличение плотности расположения клеток во всех полях Г, “пробелов” в клеточной реакции не наблюдается. На срезах Г в поле CA1 происходит заполнение опустошенных участков нервными клетками со слабой ферментной активностью. Во всех полях восстанавливаются размеры и форма клеток, у которых реагируют отростки, ядро переходит в центр клетки и цитоплазма заполняется зернами осадка, вокруг перикарионов и отростков появляются различной формы зернышкообразные грануляции, что характерно для первично раздраженных нейронов, находящихся на пути к восстановлению [Быков В. и соавт., 2006]. Возможно, их

присутствие можно рассматривать как адаптивный ответ, задерживающий более прогрессирующую нейрофибрилярную путаницу [Tolnay M., Clavaguera F., 2004].

У всех пирамидных нейронов Г выявляются не только апикальные дендриты, но и боковые ветвления. На срезах наблюдается разница в интенсивности окрашивания клеток, а именно, встречаются как темноокрашенные клетки, так и нейроны, в цитоплазме которых на светлом фоне выделяются Гамори - позитивные гранулы различного размера, постепенно заполняющие клеточное тело, но в отростках могут давать пылевидную картину. На срезах реагируют ядра сателлитной глии и кровеносные сосуды микроциркуляторного русла мозга, у которых на наружной стенке обнаруживаются темно окрашенные перicyты с отростками.

Анализ морфогистохимических данных показал, что нейроны Ам интактных крыс разнообразны по форме. Форма клеток круглая, овальная, полигональная, хорошо прослеживается ход отростков, видны маленькие ядра, в основном с одним ядрышком. Часть цитоплазмы заполнена гранулами осадка, другая часть окрашена гомогенно и выглядит светлее. Клеточная мембрана богато усеяна гранулами, а в отростках они расположены в один ряд. Встречаются нейроны с низкой активностью КФ. В целом, в Ам не наблюдается однотипного окрашивания нейронов. Темные и светлые клетки, по мнению большинства исследователей, являются различными функциональными состояниями одной и той же клетки. По своей структурной организации они имеют черты, сходные с нейросекреторными клетками Г [Минибаева З. И соавт. 2006].

Результаты морфогистохимического исследования Ам крыс показали, что при и.д.в. введении амилоидного пептида А β 25-35 нейроны теряют свою характерную форму и округляются, вздуваются, гипертрофируются, у большинства из них перестают реагировать отростки. Ядра клеток, находящихся в стадии набухания, также оказываются вздутыми и занимают эксцентричное положение. У таких нейронов четко выступает увеличенное темноокрашенное ядрышко. Характерным является неравномерное распределение осадка КФ. В цитоплазме набухших нейронов, лишённых отростков, происходит постепенное исчезновение гранулярного осадка, который начинается с центральной части клеточного тела. Обнаруживаются клетки с центрально расположенными набухшими светлыми ядрами и кольцевидным подмембранным расположением КФ, клеточная оболочка таких нейронов чётко выражена, за счет окаймления гранулами осадка. Местами наблюдается картина клеточной тени или полного исчезновения. Среди клеток, подвергнутых хроматолизу, изредка встречаются также нейроны с активацией КФ в цитоплазме и ядре, с сохранившимся апикальным дендритом.

У крыс, получивших Галармин после введения А β 25-35, на срезах Ам отмечается увеличение плотности расположения клеток, пролиферация обеспечивает заполнение «опустошенных» территорий нейронами. В большинстве участков Ам обнаруживаются округлой формы нейроны, в цитоплазме которых появляются зернышки осадка фосфата свинца, отростки нейронов не реагируют, четко выступают ядрышки внутри набухшего светлого ядра. Особенно резко усилена активность КФ в сгруппировавшихся клетках вокруг кровеносного сосуда. В некоторых участках Ам встречаются нейроны, у которых отмечается постепенное восстановление размера и формы, у них начинают реагировать отростки, ядро переходит в центр клетки и цитоплазма заполняется мелкими зернами осадка. Повсюду выявляются кровеносные сосуды, на наружной стенке которых видны темно окрашенные перicyты с отростками (ангиогенез). Как известно, рост сосудов определяет интенсивность пролиферации, дифференцировки [Banin V., 2002], а перicyты считаются происходящими из крови стромальными клетками [Bianco P. et al., 2001].

На фронтальных срезах БЯМ интактных крыс выявляются весьма интенсивно окрашенные мелкие нервные клетки треугольной и полигональной формы с выходящими из острых углов отростками с разветвлениями, которые прослеживаются на довольно длинном

от тела расстояния. У интактных крыс во всех нейронах мозга ядра занимают центральное расположение и характерным является наличие реактивных явлений со стороны глиальных элементов. Аналогичная морфологическая картина наблюдается в нейронах БЯМ.

Результаты морфо-гистохимического исследования БЯМ крыс при ИЦВ введении Аβ 25–35 выявили поражения нервной ткани, затрагивающие, прежде всего, сом и отростки нервных клеток. Отмечается разрежение в плотности расположения нервных клеток, форма нейронов нарушается, они сморщиваются, отростки не выявляются. Процесс поражения начинается с того, что клетка с самого начала уменьшается в размере, боковые и базальная ее поверхности несколько западают. Нервные клетки имеют вид черных, угловатых или палочковидных образований. Отростки истончаются, укорачиваются. Верхушечные и боковые дендриты извиваются или исчезают. Глыбки тигроида сближаются, сливаются в компактную, темно окрашенную массу, ядро вытягивается. Однако среди таких пораженных клеток в значительном количестве обнаруживаются деформированные нейроны со светлым эктопированным ядром, в котором четко выступает увеличенное темное ядрышко.

У крыс, получавших Галармин в течение 14 дней после введения Аβ 25-35, наблюдается восстановление формы, размеров клеток, у которых реагируют отростки. У всех нейронов БЯМ выявляются не только апикальные дендриты, но и боковые ветвления. В цитоплазме нейронов появляются зернышки осадка фосфата свинца, однако эти зерна длиннее и тоньше. Внутри цитоплазмы они образуют спиралевидные или глыбчатые образования, что характерно для первично раздраженных нейронов, находящихся на пути к восстановлению. Вокруг перикарионов и отростков появляются овальные, веретенообразные зернышковы грануляции. Нейроны БЯМ выглядят несколько затемненными, в сравнении с таковыми интактных крыс. Ядра занимают центральное положение как и у интактных крыс. Однако, в отличие от интактных животных, под воздействием Галармина ядра нейронов БЯМ увеличиваются в размере и интенсивно окрашиваются. Ядерная локализация КФ дает основание предположить, что ядро подвергается динамической реорганизации. Более того, межнейронный контакт настолько выражен, что создается впечатление слившихся клеток. При введении Галармина на всех срезах БЯМ реагируют ядра сателлитной глии и кровенаполненные сосуды, на наружной стенке которых видны темные перичиты с отростками. Таким образом выявлена реакция кровеносных сосудов (ангиогенез).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку БА возникает задолго до клинической манифестации, полагают, что за сдерживание БА ответственны такие компенсаторные механизмы, как повышение активности и гиперперфузия пораженных структур мозга, образование аутоантител к β-амилоиду, усиление синтеза белков с нейропротекторным действием, активация систем антиоксидантной защиты и проонкогенов, тормозящих нейрональный апоптоз, индукция нейрогенеза, спраутирование терминалей нейронов, увеличение «плотности» рецепторов к нейромедиаторам. Даже процесс образования бляшек может носить компенсаторную функцию, поскольку снижает уровень наиболее токсичных протофибрилл Аβ. Однако к моменту появления клинических признаков заболевания компенсаторные механизмы, как правило, истощены. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация компенсаторных механизмов не только способна сдерживать развитие патологического процесса, но может быть использована для профилактики и лечения БА [Shankar G. et al., 2008].

В основе такой пластичности, ключевой в нейрональной адаптации, лежит отсутствие статичности, формируемых ими цепей, а подверженность локальных протеинов альтерациям в выраженности генов, кодирующих протеины, способна воздействовать на цитоскелетную

архитектуру [Schenk G., 2011] и нейротрансмиссию [Pedotti P. et al., 2008]. В этом контексте, как глутаматэргическая и ГАМКэргическая [Pedotti P. et al., 2008] нейрональная трансмиссия в гиппокампальных CA1/CA3 цепях, так и регулирование цитоскелетной структуры и микротубулярного транспорта [Schenk G., 2011] подвержены воздействию DCLK (doublecortin-like kinase) – гена, связанного с пластичностью синапсов, кодирующего протенин с сходными доменами и свойствами стабилизации микротрубочек. При этом поразительно, что у δ CDCLK-short трансгенных мышей субединица $\alpha 2$ GABA_A рецепторов подвержена высокой степени даун-регуляции [Pedotti P. et al., 2008]. С другой стороны, как апоптотическая гибель в CA3, так и нейрогенез в дентатной извилине модулируются глутаматэргической нейротрансмиссией, являющейся результатом активации NMDA рецепторов, и флуктуациями уровней Ca^{2+} во взаимодействии с кортикостероидными гормонами [Karst H., Joëls M., 2001]. Более того, новые нейроны градуально развивают свойства функциональных нейронов, включая аксоны/дендриты, способность запускать потенциаль действия и обретать синаптические входы с последующим вовлечением в существующие нейрональные сети [Galvan V., Bredesen D., 2007]. В заключение, согласно модели функциональной роли зрелого нейрогенеза в процессе запоминания: 1) новые нейроны могут разорвать существующую нейрональную сеть для формирования новых синаптических кругов, с потерей предшествующей памяти; 2) содействовать интеграции новых нейронов в существующую нейрональную сеть, для замещения погибших нейронов, что может обеспечить механизм консолидации памяти; и 3) новые нейроны могут усиливать длительную потенцию либо повышением числа синапсов, либо подавлением ГАМКэргических входов в перфорантном пути [Lu B., Chang J., 2005].

В настоящих экспериментах на интактных, в полухронических – на модели БА (контроль) и в сочетании с протекцией Галармином спустя 12 нед отведение активности одиночных нейронов Г при ВЧС ЭК, нейронов Ам и БЯМ на ВЧС ЭК и Г *on-line* селекцией и программным математическим анализом выявила формирование возбудительных и депрессорных ответов в виде ТД и ТП, комбинируемых в одно - (ТД ПТД, ТП ПТП) и разнонаправленные (ТД ПТП, ТП ПТД) посттетанические последовательности. В ряде случаев животные выдерживались на модели БА без протекции с 13 до 28 нед, с целью выявления предела компенсаторных возможностей мозга в условиях нейродегенерации.

Посредством анализа пре- и постстимульных изменений активности нейронов структур кратко- и долговременной памяти, к 12 нед сроку выживания, на основе усредненного количества спайков (РЕТН), с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты в Гц (Frequency Average) на модели БА с протекцией Галармином, в сравнении с таковыми в контроле и с нормой, выявлено следующее.

В нейронах Г при ВЧС ЭК на модели БА в контроле, значения ТД и ТП превышали норму лишь в сочетании с ПТП. С использованием протекции их значения не достигали нормы во всех постстимульных последовательностях, а ТП в ТП ПТД – даже пятикратно. В сравнении с контролем также в условиях протекции не имело места превалирования значений (в особенности, в отношении ТД ПТП и ТП ПТП. В нейронах Ам на ВЧС ЭК на модели БА во всех случаях испытаний, в сравнении с нормой, имели место высокие значения занижения и завышения претстимульного уровня активности, особенно выраженные в депрессорных и – в возбудительных проявлениях, что свидетельствует о успешной мобилизации компенсаторных возможностей мозга. В условиях же протекции Галармином лишь в случае возбудительно-депрессорной последовательности выявлялось некоторое превышение нормы, в остальных – показатели оказались ниже нормы, особенно в возбудительной последовательности, что можно констатировать как успешное противостояние эксайтотоксичности. На модели БА без- и в условиях протекции углубление тетанической депрессии в гипоталамо-амигдаллярной проекции выше нормы, полагаемой в качестве протекторной (в особенности в депрессорно-

возбудительной последовательности), следует считать успешным в аспекте противостояния нейродегенерации, в том числе эксайтотоксичности. В нейронах БЯМ при ВЧС ЭК на модели БА как депрессорные, так и возбудительные постстимульные проявления активности нейронов без протекции оказались ниже нормы, фактически во всех последовательностях, за исключением чисто возбудительной, достигая значительной разницы. В условиях протекции Галармином также во всех случаях норма значительно превалировала, в особенности в возбудительно-депрессорной последовательности. В нейронах БЯМ на модели БА при ВЧС Г, хотя значения постстимульных проявлений также не достигали нормы, за исключением депрессорно-возбудительной последовательности, но разница была невысокой. Наконец, в условиях протекции в однонаправленных последовательностях значения эффектов не достигали нормы, но превалировали – в разнонаправленных, хотя незначительно.

По степени частотной выраженности сравнение депрессорных и возбудительных тетанических эффектов в одно- и разнонаправленных постстимульных проявлениях активности изученных структур в указанных проекциях на примере диаграмм усредненной частоты спайков (и их процентного соотношения), выведенных на основе растеров, привело к следующему заключению. В нейронах Г при ВЧС ЭК норма превалировала, за исключением возбудительной последовательности. На модели БА ТД и ТП во всех случаях превышали таковые с протекцией, а ТП в возбудительной последовательности намного превысила даже норму, по-видимому из-за эксайтотоксичности. На модели БА в нейронах Ам при ВЧС ЭК выявлено мощное превалирование всех видов нейрональной активности, что указывает на поразительные компенсаторные возможности организма. Данный факт может объяснить позднее поражение долговременной памяти при БА. При этом, превалирование возбудительных эффектов над депрессорными при применении Галармина говорит о наличии высокой степени эксайтотоксичности в данной структуре. В то же время, Г проекции Ам демонстрируют более выраженную депрессорную активность при лечении. Также выявлен высокий уровень восстановления возбудительной активности по сравнению с ЭК проекциями. В депрессорной активности БЯМ на ВЧС ЭК выявлено улучшение после применения Галармина. В возбудительной активности лечение препаратом лишь поддерживало функциональное состояние на уровне патологии. Однако в обоих случаях лечения функциональная активность не достигала нормы. При стимуляции Г на леченных животных все виды активности демонстрировали уровень выше нормы.

Исследование в более длительные сроки (выше 12 нед) относительной степени выраженности постстимульных проявлений в частотном отображении, выведенных на основе растеров пре – и постстимульных проявлений спайковой активности ряда структур, в сравнении с таковыми 12 нед. срока и с нормой, привел к следующему заключению. На модели БА с 15 до 28 нед в нейронах Г при ВЧС ЭК ТД оказалась выраженной лишь в сочетании с возбуждением, не достигая нормы, но превышая 12 нед уровень. В нейронах Ам при ВЧС Г ТД держалась до 18 нед. В нейронах БЯМ при ВЧС Г тетаническая депрессия в обоих последовательностях к 28 нед превысила показатели 12 нед срока, но не нормы. Возбудительные постстимульные реакции к концу испытаний фактически полностью и значительно спадали ниже и нормы и 12 нед срока, а в случае БЯМ - уже с 13 нед.

В настоящих морфо-гистохимических исследованиях при А β -индуцированной нейродегенерации, проведенных методом выявления активности кислой фосфатазы, характерным морфологическим признаком явились “пробелы”, характеризующиеся исчезновением реакции нейронов в Г, Ам и БЯМ, что являлось морфологическим доказательством расстройств их метаболизма. Морфологическая картина в Г и Ам, напоминала острое набухание нервных клеток, относимое к распространенному виду клеточной патологии. Причиной этого процесса могут быть различные патологические воздействия экзо- и эндогенного происхождения. Вероятно, в результате развертывания

обменных явлений перикариона нарушается процесс дыхания клеток, происходит снижение активности ряда ферментов. В БЯМ показано сморщивание нервных клеток, относимое к одному из видов клеточной патологии, наблюдаемой при разнообразных, особенно хронических заболеваниях. Однако, важным критерием оценки степени поражения клетки является степень поражения ядра. Настоящие данные указывают, что в основном ядро нейронов стремилось сохранить жизнедеятельность, путем перемещения к периферии клетки, где по-видимому отмечаются более благоприятные условия. Результаты настоящих исследований по систематическому применению Галармина на модели БА позволяют предположить, что при этом наблюдаются положительные изменения нейронов изученных областей мозга, тенденция к нормализации их структуры, увеличение плотности расположения нейронов в изученных полях, повышение метаболизма, усиление Ca^{2+} -зависимых процессов фосфорилирования, в сравнении с повреждением, что определяет клеточное выживание. В БЯМ выявлен также феномен тесного межнейронного контакта, по-видимому, в качестве выражения компенсаторно-адаптивных свойств нейрона. .

Следует полагать углубление ТД протекторного назначения, выдвигаемой в начальной стадии восстановления и содействующей в дальнейшем восстановлению исходного соотношения возбудительных и депрессорных процессов. Согласно предварительным исследованиям, депрессорные реакции активируются в различных отделах мозга как при неспецифической (периферической, центральной) так и специфической нейродегенерации [Galoyan A. et al., 2008; 2010; Sarkissian J. et al., 2007 и др.]. В основе депрессорных проявлений активности лежит торможение, опосредуемое тормозными моноаминами ГАМК или Глицином. Протекторное назначение ГАМК показано в исследованиях по неспецифической нейродегенерации: в условиях односторонней лабиринтэктомии в ядре Дейтерса [Galoyan A. et al., 2010; Khalaji N. et al., 2013], в СМ при латеральной гемисекции [Саркисян Дж. и соавт. 2004; Galoyan A. et al., 2005; Галоян и соавт. 2007; Galoyan et al., 2007], на поврежденном периферическом нерве [Galoyan A. et al., 2001; Саркисян и соавт. 2003; 2005; Galoyan et al., 2005; Meliksetyan I. et al., 2011; Minasyan A. et al., 2011; Минасян и соавт., 2012], а также при специфической нейродегенерации в гиппокампе (на амилоидной модели БА) [Галоян А. и соавт. 2004; Galoyan A. et al., 2008; Yenkyoan K. et al., 2011]. Представляет интерес, что последнее показано преимущественно в нейронах ГАМК-ергической природы. В них рано вовлекаемые депрессорные реакции сопровождают процесс восстановления до его завершения. В свою очередь, литературные данные подтверждают положение о универсальном протекторном назначении ГАМК-ергического торможения. В частности, в некоторых системах в течение развития нервной системы ГАМК действует в качестве фактора, влияющего на пролиферацию, миграцию, дифференциацию и созревание синапса, клеточную гибель и экспрессию рецептора ГАМК_A [Owens D., Kriegstein A., 2002]. Более того, доказано, что ГАМК и глицин играют важную роль в развивающейся и зрелой центральной вестибулярной системе [Tighilet V., Lacour M., 2001]. Далее, при восстановлении функции после односторонней лабиринтэктомии, известном в качестве вестибулярной компенсации, установлена решающая роль ГАМК рецептором опосредованных событий в нейронах вестибулярных ядер [Tighilet V., Lacour M., 2001; Giardino L. et al., 2002; Johnston A. et al., 2001; Yamanaka T. et al., 2000]. И что особенно важно, устойчивое углубление депрессии в вышеотмеченных работах являлось следствием привлечения Галармина в качестве протектора. В настоящей работе, где также не исключено вовлечение истинного ГАМК-ергического торможения в течение ТД и ПТД, с целью углубления депрессии в изученных структурах естественно возникла необходимость терапевтического воздействия Галармина. В заключение, недавние изучения на клеточном и сетевом уровнях позволили утверждать, что синаптическое торможение нельзя оценивать лишь как противостоящее синаптическому возбуждению,

поскольку оно обеспечивает высоко специфические функции в нервной системе млекопитающих [Birke G., Draguhn A., 2010].

ВЫВОДЫ

1. На модели БА в нейронах Г при ВЧС ЭК норма превалировала, за исключением возбудительной последовательности. ТД и ТП превышали таковые с протекцией Галармином, а в возбудительной последовательности ТП намного превысила и норму.
2. На модели БА в нейронах Ам при ВЧС ЭК выявлено мощное превалирование всех видов активности, что указывает на компенсаторные возможности организма, обеспечивающие позднее поражение долговременной памяти.
3. Г проекции Ам, в противоположность ЭК демонстрируют выраженную депрессорную активность при протекции и высокий уровень восстановления возбудительной активности.
4. В БЯМ на ВЧС ЭК выявлено улучшение депрессорной активности после применения Галармина, в то время как возбудительная активность поддерживалась лишь на уровне патологии, но в обоих случаях активность не достигала нормы, а при стимуляции Г все виды активности демонстрировали уровень выше нормы.
5. На модели БА в нейронах Г при ВЧС ЭК до 15-16 и 28 нед ТД срабатывала лишь в постстимульной депрессорной последовательности, не достигая уровня нормы - в депрессорно-возбудительной, и превышая таковой на 12 нед. Возбудительные же реакции полностью и значительно спадали.
6. В нейронах Ам при ВЧС Г на модели БА, в условиях 13-18 нед испытания, к 18 нед компенсаторные возможности организма, в качестве постстимульной депрессии, продолжали проявлять себя, но возбудительные были исчерпаны с 13 нед.
7. В нейронах БЯМ, Г и Ам при ВЧС Г, на модели БА в условиях 22 и 28 нед, возбудительные проявления скачкообразно спадали к 28 нед ниже и нормы и 12 нед срока, а ТД в обоих последовательностях сначала спадала, затем нарастая, к 22 нед превысила показатели 12 нед срока, не достигая нормы.
8. Морфо-гистохимические изменения нейронов Г, Ам и БЯМ на модели БА характеризуются общей тенденцией структурно-метаболической дисфункции, с нарушением формы, центральным хроматолизом, наличием светлого эктопированного ядра с увеличенным ядрышком, изменением реакции нейрофибрилл, отсутствием реакции отростков, накоплением гиперфосфорилированных образований, наличием пространств с отсутствием клеточной реакции и нарушением Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования.
9. В условиях протекции Галармином на модели БА, в подтверждение данным электрофизиологии, получены положительные изменения с повышением метаболизма, характеризующим клеточное выживание, с нормализацией структуры, усилением Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования, феноменом межнейронного сближения, повышением метаболизма и предотвращением нейродегенерации, приводящей к гибели нейронов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Варданян А.В. Соотношение возбудительных и тормозных синаптических процессов в нейронах гиппокампа, амигдалы и ядра мейнерта в динамике развития болезни Альцгеймера на модели, индуцированной Аβ 25-35. *Мед. наука Армении*. 2015, Т. LV, № 3, С. 22-31.
2. Погосян М.В., Варданян А.В., Мкртчян О.А., Араджян Г.М., Аветисян З.А., Мадоян Г.К., Степанян А.Ю., Саркисян Дж.С. «Возбуждающие и депрессорные синаптические процессы в гиппокампе, амигдале и базальном ядре Мейнерта на модели болезни

Альцгеймера, индуцированной Аβ 25-35». *Вопросы теоретической и клинической медицины. Научно-практический журнал.* 2015, Том 18, № 4, (100), С. 7-16.

3. Даниелян М.Г., Погосян М.В., Минасян А.Л., Степанян А.Ю., Варданян А.В., Саркисян Дж.С. «Морфогистохимическое изучение клеточных структур мозга крыс на модели болезни Альцгеймера в условиях воздействия гипоталамического нейропептида (PRP)». *БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ ЕВРОПЫ* 2016. VOL. 2, No. 1 (1). P. 75-81. *Morphohistochemical study of cellular structures of rat's brain on the model of Alzheimer's disease in conditions of hypothalamic neuropeptide (PRP) action. BIOLOGICAL SCIENCES OF EUROPE (Praha, Czech Republic).*
4. Варданян А.В., Саркисян Дж.С. «Исследование нейронов гиппокампа, амигдалы и ядра Мейнерта на модели болезни Альцгеймера, индуцированной Аβ 25-35». *В сб.: Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения. Материалы I Международной (71 Всероссийской) научно-практической конференции молодых учёных и студентов, г. Екатеринбург, 13-15.04. 2016. Т. 1, С. 964-969.*
5. Даниелян М.А., Саркисян Дж.С., Варданян А.В., Погосян М.В., Аветисян З.А., Гевондян Т.А., Алиева М.Б., Назарян О.А., Карапетян К.В. Воздействие гипоталамического нейропептида на клеточные структуры ядра Мейнерта крыс на модели болезни Альцгеймера. *Вопросы теоретической и клинической медицины. Научно-практический журнал.* 2016, Т. 19 № 5 (108), С. 36-39.

ՎԱՐՂԱՆՅԱՆ ԱՆԱՀԻՑ ՎԱԶԳԵՆԻ

ԱԼՅՉՅՍՏԵՐԻ ՀԻՎԱՆՂՈՒԹՅԱՆ ՄՈՂԵԼՈՒՄ ԳԱԼԱՐՄԻՆԻ ՊՐՈՏԵԿՏԻՍՅԵ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ՎԱՐՃ- և ԵՐՎԱՐԱՏԵՎ ՀԻՇՈՂՈՒԹՅԱՆ ԿԱՌՈՒՅՑՆԵՐԻ ՄՈՂՖՈՋՈՒԿՑԻՈՆԱԼ ՈՒՄՈՒՄՆԱՄԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Ալբինոս ցեղատեսակի հասուն 33 ինտակտ արու առնետների վրա (200-250 գր.) կատարվել են 3 սերիա կիսախրոնիկ փորձեր՝ ստերեոտաքսիկ կորդինատներով տոքսիկ օլիգոմերի Аβ 25/35 (3 10⁹ М) ներարկումով, պրոլինով հարուստ PRP-1 պեպտիդի համակարգային ներարկումով (սկսած հաջորդ օրվանից 7 ներարկում օր ու մեջ) և մինչև սուր փորձը պահված 12 շաբաթ: Կատարվել է հիպոկամպի (Հ) նեյրոնների ակտիվության գրանցում ԷԿ-ի ԲՀԳ 1վրկ, Ամ-ի նեյրոնների ակտիվության ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ, ինչպես նաև ՄՀԿ-ի նեյրոնների ակտիվության գրանցում ԷԿ-ի և Հ-ի ԲՀԳ ժամանակ սպայկային ակտիվության on-line ընտրությամբ, մաթեմատիկական ծրագրային վերլուծությամբ հայտնաբերվել է դրող-արգելակող պատասխանի ձևավորում՝ տետանիկ դեպրեսիայի (ՏԴ) և պոտենցիացիայի (ՏՊ) տեսքով, և հետտետանիկ միակողմանի (ՏԴ ՊՏԴ, ՏՊ ՊՏՊ) և տարբեր ուղղվածության հաջորդականությամբ (ՏԴ ՊՏՊ, ՏՊ ՊՏԴ) ռեակցիաների տեսքով 1584 նեյրոններից՝ Հ (n=366), Ամ (n=568) և ՄՀԿ (n=650): Ուղեղի կոմպենսատոր հնարավորությունների սահմանը որոշելու նպատակով մի շարք դեպքերում ԱՀ մոդելում կենդանիները պահվել են 13-28 շաբաթ: Միջինացված քանակի սպայկերի հիման վրա (PETH) միջմպուլսային ինտերվալների և Հգ-ով հաճախականության (Freg Average) վերահաշվարկով ԱՀ մոդելում գալարմինային պրոտեկցիայով համեմատած առանց պրոտեկցիայի այդպիսիների հետ հայտնաբերվել է հետևյալը՝ Հ-ի նեյրոններում ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ ԱՀ մոդելում ՏԴ-ի և ՏՊ արժեքները գերազանցում են նորմային միայն ՊՏՊ զուգակցման դեպքում: Պրոտեկցիայի կիրառմամբ նրանց մեծությունը չի հասնում նորմայի բոլոր

հետխթանային հաջորդականություններում, իսկ ՏՊ-ն՝ ՏՊ ՊՏԴ-ում նույնիսկ 5 անգամ: Կոնտրոլի հետ համեմատած՝ պրոտեկցիայի պայմաններում նույնպես տեղի չի ունենում մեծությունների գերազանցում հատկապես (ՏԴ ՊՏՊ և ՏՊ ՊՏՊ-ում): Աչ մոդելում նորմայի հետ համեմատած՝ Ամ-ի նեյրոններում ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ փորձարկումների բոլոր դեպքերում դիտվում է մեծությունների նվազում և ակտիվության հետխթանային մեծությունների մակարդակի բարձրացում, հատկապես արտահայտված դեպրեսիայում, ինչը վկայում է ուղեղի կոմպենսատոր հնարավորությունների հաջող մոբիլիզացիայի մասին: Պրոտեկցիայի պայմաններում միայն դրդող-արգելակող հաջորդականություններում դրսևորվում է որոշ գերազանցում նորմայից, իսկ մյուս բոլոր ցուցանիշները նորմայից ցածր են՝ հատկապես դրդող հաջորդականությունում, ինչը հետևանք է գերգրգռման: Աչ մոդելում առանց- և պրոտեկցիայով ՏԴ-ի խորացումը հիպոկամպ- ամիգդալային պրոտեկցիայում նորմայից բարձր է, ենթադրաբար որպես պրոտեկցիա (հատկապես դրդող-արգելակող հաջորդականությունում), ինչը նեյրոդեգեներացիայի հակադեցուցյալ տեսանկյունից, այդ թվում գերգրգռումը կարելի է համարել բարեհաջող: Աչ մոդելում ՄՀԿ-ում ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ պրոտեկցիայի նեյրոնների հետխթանային ակտիվության ինչպես արգելակող, այնպես էլ դրդող դրսևորումները բոլոր հաջորդականություններում նորմայից ցածր են, բացառությամբ դրդողների՝ հասնելով նշանակալի տարբերության: Պրոտեկցիայի պայմաններում նույնպես բոլոր դեպքերում նորման նշանակալի գերազանցում է, հատկապես դրդող-արգելակող հաջորդականությունում: Աչ մոդելում ՄՀԿ-ում նույնպես Հ-ի ԲՀԳ ժամանակ հետխթանային դրսևորումները չեն հասնում նորմայի բացառությամբ դրդող-արգելակող հաջորդականությունում, բայց տարբերությունը այնքան էլ մեծ չէ: Վերջապես պրոտեկցիայի պայմաններում նույն ուղղվածության հաջորդականությունում արդյունքների մեծությունը նորմայի չի հասնում և գերազանցում է տարբեր ուղղվածության հաջորդականություններում, բայց աննշան: Ըստ նշված պրոտեկցիայի, հետազոտվող կառույցներում ակտիվության նույն և տարբեր ուղղվածության տեսանիկ դրդող-արգելակող դրսևորումների համեմատությունը սպայկերի հաճախականության միջինացված դիագրամների օրինակով, բերում է հետևյալ եզրակացության՝ Հ-ի նեյրոններում ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ նորման գերազանցում է բացառությամբ դրդող հաջորդականությունում: Աչ մոդելում ՏԴ և ՏՊ բոլոր դեպքերում գերազանցում են պրոտեկցիայով այդպիսիներին, իսկ ՏՊ-ն՝ դրդող հաջորդականությունում բավականին բարձր է նույնիսկ նորմայից՝ գերգրգռման հետևանք: Աչ մոդելում Ամ-ի նեյրոններում ԷԿ-Ի ԲՀԳ հայտնաբերվում է բոլոր տիպի նեյրոնային ակտիվության խիստ գերազանցում, ինչը վկայում է օրգանիզմի կոմպենսատոր հնարավորությունների մասին: Տվյալ փաստը կարելի է բացատրել Աչ ժամանակ երկարատև հիշողության ուշ ախտահարումով: Այդ դեպքում գալարմինի կիրառման ժամանակ դրդող էֆեկտների գերազանցումը արգելակողների նկատմամբ խոսում է տվյալ կառույցում գերգրգռման բարձր աստիճանի առկայության մասին: Գալարմինի կիրառումը դրդող ակտիվությունում պահպանում է միայն ֆունկցիոնալ վիճակ ախտաբանական մակարդակում: Մինչդեռ 2 դեպքերում էլ ֆունկցիոնալ ակտիվությունը չի հասնում նորմայի մակարդակին: Բուժված կենդանիների մոտ Հ-ի խթանման ժամանակ բոլոր տեսակի ակտիվությունները ցուցաբերում են նորմայից բարձր մակարդակ: Ավելի երկարատև ժամկետներում հետազոտությունները բերում են

հետևյալ եզրահանգման՝ ԱՀ մոդելում 15-28 շաբաթ անց Հ-ի նեյրոններում ԷԿ-ի ԲՀԳ ժամանակ ՏԴ արտահայտվում է միայն դրոդո գուգորդման ժամանակ՝ չհասնելով նորմայի, բայց գերազանցում է 12 շաբաթվա մակարդակին: Ամ-ի նեյրոններում Հ-ի ԲՀԳ ժամանակ ՏԴ –ն պահպանվում է մինչև 18-րդ շաբաթականը: ՄՀԿ նեյրոններում Հ-ի ԲՀԳ ժամանակ ՏԴ-ն 2 հաջորդականություններում մինչև 28 շաբաթը գերազանցում է 12-րդ շաբաթվա ժամկետին, բայց ոչ նորմային: Դրոդո հետխթանային ռեակցիաները փորձարկման վերջում լրիվ և նշանակալի նվազում են նորմայից ցած և 12-րդ շաբաթվա ժամկետից, իսկ ՄՀԿ դեպքում արդեն 13-րդ շաբաթվա ժամկետից: Հետազոտությունները անց են կացվել թթու ֆոսֆատազայի հայտնաբերման մեթոդով ԱՀ մոդելում Հ-ի, Ամ-ի և ՄՀԿ-ի նեյրոններում մորֆոհիստոքիմիական փոփոխությունները բնութագրվում են կառուցվածքա-նյութափոխանակային դիսֆունկցիայով՝ ձևի փոփոխում, կենտրոնական խրոմատոլիզ, լուսային կորիզի էկտոպիա՝ կորիզակի մեծացմամբ, նեյրոֆիբրիլյար ռեակցիայի փոփոխում, հիպերֆոսֆորիլիզացված գոյացությունների կուտակում, դասարկ տարածքների առկայություն՝ բջջային ռեակցիայի բացակայմամբ և Ca^{2+} կախյալ ֆոսֆորիլիզացման խանգարում: Գալարմինային պրոտեկցիայի պայմաններում էլեկտրոֆիզիոլոգիական տվյալների հաստատմամբ, ստացվել են դրական փոփոխություններ նյութափոխանակության բարձրացմամբ, որոնք բնութագրում են բջջային կառուցվածքը՝ կառուցվածքային փոփոխությունների նորմալացում, Ca^{2+} կախյալ ֆոսֆորիլիզացման ուժեղացում:

ANAHIT V. VARDANYAN

MORPHO-FUNCTIONAL STUDY OF STRUCTURES OF SHORT- AND LONG TIME MEMORY OF THE BRAIN ON THE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE IN CONDITION OF PROTECTION BY GALARMIN

SUMMARY

In three series of semichronic experiments on 33 adult Albino rats (200-250 g): intact, subjected bilateral intracerebro - ventricular injected by toxic oligomer A β 25-35 (3 μ l 10^{-9} M) on stereotaxical coordinate, with systemic administration Galarmine – proline rich peptide PRP-1, from calculation 10 γ /100 r (with the next day, seven injection every other day) and seasoned to acute experiments 12 weeks the recording of activity of hippocampus (H) to high frequency stimulation (HFS) (1s) of entorhinal cortex (EC), activity of rostral amygdalopiriform area (Am) to HFS of EC and H Am at HFS EC and H, as well as activity of Nucleus basalis of Meynert (NBM) neurons to HFS of EC and H by mean of on-line selection and software mathematical analysis of spike activity the formation of depressor and excitatory responses as tetanic depression and potentiation (TD, TP) and posttetanic uni- (TD PTD, TP PTP) and multidirectional (TD PTP, TP PTD) reactions was revealed in 1584 neurons: H (n=366), Am (n=568) and NBM (n=650). In some cases the animals with the models of AD without protection soaked from 13 to 28 weeks with a view to identifying the limit of compensatory capabilities of the brain in conditions of neurodegeneration. On the base of averaged quantity of spikes (PETH Average), with recalculation in interimpulse intervals and frequencies in Hz (Frequency Average) on the model of AD with the protection Galarmine, compared with those without protection (control) the following was revealed. In neurons of H at EC HFS on the model of AD the meaning of TD and TP exceed the norm in combined with PTP only. With use of protection their meanings not reached the norm in all poststimulus successions, and TP in TP PTD – even a quintuple. In comparison with the control also in condition of the protection there has been no predominance of the meanings (especially, in respect of TD PTP and TP PTP). In Am neurons at EC

HFS on the model of AD in all cases tests, in comparison with the norm, there have been high values of understatement and overstatement of the prestimulus level of activity, especially pronounced in the depressor, that attests to the successful mobilization of compensatory resources of the brain. In condition of the same protection only in case of excitatory-depressor succession some excess of the norm was revealed, in the remaining – the meanings were below normal, especially in excitatory succession, that it may be noted as the successful confrontation to excitotoxicity. On the model of AD without- and in condition of protection the deepening of TD in H-Am projection above normal, assumed as protective (especially in depressor-excitatory succession), should be considered successful in aspects of confrontation to neurodegeneration, including to excitotoxicity. In NBM at EC HFS of both depressor and excitatory poststimulus manifestations of neuronal activity without protection were below normal, in fact in all successions, with the exception of pure excitatory, achieving significant differences. In condition by protection also in all cases the norm substantially prevailed, especially in excitatory-depressor succession. In NBM neurons on the model of AD at HFS of H, the meanings of poststimulus manifestations also not reached the norm, with the exception of depressor-excitatory succession, but the difference was low. Finally, in condition of protection in unidirectional successions the meanings of the effects not reached the norm, and prevailed – in multidirectional, but insignificantly. On degree of intensity in frequency manifestation, the comparison of depressor and excitatory tetanic effects in uni- and multidirectional poststimulus manifestations of activity of studied structures in mentioned projections on the example of peristimulus histogram of sum spikes and diagrams of averaged frequency of spikes, produced on the base of rasters resulted in the following conclusion. In H neurons at EC HFS the norm prevailed, with the exception of excitatory succession. On the model of AD the TD and TP in all cases exceed such with protection, and TP in excitatory succession far exceeded even norm because of the excitotoxicity. On the model of AD in Am neurons at EC HFS the powerful dominance of all kinds neuronal activity has been revealed, that points to a startling compensatory possibilities of the organism. This fact can explain the later defeated of long-term memory under AD. When this, the the prevalence of excitatory effects over depressor under use of Galarmin said that there was a high degree of excitotoxicity in this structure. At the same time the H projection of Am show more depressor activity in condition of protection. Also the high level of restoration of excitatory activity compared with the EC projection was revealed. In depressor activity of NBM at EC HFS the improvement after use of Galarmin has been revealed. In respect of excitatory activity the use of Galarmin only supported the functional state on the level of pathology. However in both cases the functional activity did not reach the level of norm. At stimulation of H on treated animals the all kinds of activity demonstrated level above the norm. The investigation in prolonged term, resulted in the following conclusion. On the model of AD from 15 to 28 weeks in H neurons at EC HFS the TD turned out to be expressed only in conjunction with excitation, not reaching the norm, but exceed 12 weeks level. In neurons of Am at H HFS poststimulus depression kept up to 18 weeks. In NBM neurons at H HFS the TD in both successions to 28 weeks exceeded the indicators of 12 weeks date, but no norm. The excitatory poststimulus reactions by the end of the tests in fact fully and fell significantly below both the norm and 12 weeks term, and in case of NBM – already with 13 weeks. In investigations carried out by method of revealing activity of acidic phosphatase morpho-histochemical changes of H, Am and NBM neurons on the model of AD characterized by common tendency structural-metabolic dysfunction: violation of form, central chromatolisis, the presence of light ectopic nucleus with increased nucleolus, the change of neurofibrill's reaction, absence of reaction of processes, the accumulation of hyperphosphorylated formations, the presence of spaces with absence of cellular reaction, violation of Ca^{2+} -dependent phosphorylation. In condition of protection by Galarmin, in confirmation of the data of electrophysiology, the positive changes with increase of metabolism, characterizing the cellular survival has been received: the normalization of structure, strengthening of Ca^{2+} -dependent phosphorylation.