

Посвящается Маргарите Геннадьевне Белеховой, замечательному человеку, исследователю и эволюционисту, по случаю 90-летия.

УДК 57.012.3, 57.032, 57.033

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОБЛАСТИ CA1 ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА У ВЗРОСЛЫХ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЮ

© 2024 г. Н. Л. Туманова¹, Д. С. Васильев^{1, *}, Н. М. Дубровская¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, 194223, Россия

* E-mail: dvasilyev@bk.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 31.07.2023 г.

Принята к публикации 11.08.2023 г.

Работа посвящена исследованию нейродегенеративных изменений в ультраструктурной организации CA1 гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (пГГЦ). Методом электронной микроскопии в нейронных сетях области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс с пГГЦ, в отличие от контрольных животных, обнаружены признаки патологических изменений: дегенерация пирамидных нейронов, разрушение миелиновой оболочки аксонов, а также деструкция осевых цилиндров базальных и апикальных дендритов, направленных от нейронов пирамидного слоя в сторону *tractus temporoammonic* или коллатералей Шаффера соответственно. У контрольных животных на дистальных ответвлениях дендритов в слоях *stratum oriens* и *stratum radiatum* с помощью метода Гольджи выявлена густая сеть варикозных дендритных расширений, обеспечивающих увеличение площади синаптических контактов. У крыс, перенесших пГГЦ, в этих дендритных варикозных расширениях обнаруживаются значительные деструктивные изменения: разрушение крист митохондрий и появление расширенных цистерн. У взрослых крыс с пГГЦ полностью нивелирует предпочтение запаха валерианы, являющегося в норме физиологически значимым стимулом, что свидетельствует о негативном влиянии пГГЦ на работу обонятельного анализатора, деятельность которого тесно связана с гиппокампом. Полученные факты свидетельствуют о пагубном действии гомоцистеина на структуру и межнейронные связи в нервной ткани области CA1 дорсального гиппокампа как морфологического субстрата для интеграции поступающих в него стимулов.

Ключевые слова: крыса, гиппокамп, онтогенез, гипергомоцистеинемия, ультраструктурная организация, варикозное расширение дендритов, нейродегенеративное изменение, обоняние

Принятые сокращения: ГГЦ — гипергомоцистеинемия; пГГЦ — пренатальная ГГЦ; ГО — гликопротеин олигодендроцитов; ANOVA — дисперсионный анализ.

DOI: 10.31857/S0041377124010083, **EDN:** HZKQJJ

Гипергомоцистеинемия — состояние организма при повышенном уровне содержания в тканях токсичной аминокислоты гомоцистеина, которая способна вызывать эксайтотоксическую гибель нейронов головного мозга и дисфункцию различных систем организма. В случае ГГЦ в организме матери отмечаются нарушение плацентарного кровотока и выработки ряда трофических факторов, что в свою очередь может привести к серьезным изменениям в процессе формирования мозга потомства в эмбриогенезе, а также его созревания и функционирования в раннем постнатальном онтогенезе (Vasilev et al., 2023).

В коре и гиппокампе мозга потомства крыс, подвергшихся действию экспериментально вы-

званной пренатальной ГГЦ (пГГЦ), в период с четвертых суток беременности до родоразрешения нами ранее были выявлены признаки отставания в развитии и нейродегенеративных изменений (Shcherbitskaia et al., 2021).

Среди наиболее характерных структурных изменений отмечали гибель проекционных пирамидных нейронов в новой коре и дорсальном гиппокампе на фоне развития нейровоспаления. Наибольшей выраженности нейровоспалительные процессы достигали в области CA1 дорсального гиппокампа, которая является важным интегративным центром, тесно связанным с неокортексом. Область CA1 играет важную роль в поведенческих ответах на внутреннюю и внешнюю

обонятельную, соматосенсорную, слуховую и зрительную информацию, а также принимает активное участие в организации сложных форм поведения крыс.

Развитие нейродегенеративного процесса, вызванного пГГЦ, сопровождалось нарушением функции синаптической передачи, что, в частности, выражалось в снижении долговременной потенциации и уменьшении пула лабильных грибовидных дендритных шипиков с шипиковым аппаратом, вовлеченных в ее обеспечение (Postnikova et al., 2022), что приводило к когнитивному дефициту.

Обонятельная система у животных имеет решающее значение для выживания во время решения таких задач, как выбор пищи и идентификация запаха хищника. Она также оказывает значительное влияние на социальные взаимодействия, репродуктивную функцию и многие другие формы поведения. Обоняние является уникальным среди сенсорных систем по своей относительной структурной консервативности на протяжении всей эволюции млекопитающих.

Было показано, что по сравнению с другими сенсорными системами, первичная обонятельная кора, включая переднее обонятельное ядро, обонятельный бугорок и пириформную кору, имеет функциональную связь с нейронными сетями гиппокампа (Zhou et al., 2021). Считается, что в отличие от других сенсорных систем связь гиппокампа с обонятельным анализатором достаточно тесна, что можно проследить в ходе эволюции млекопитающих (Allen, Fortin, 2013; Schwarz et al., 2013; Gass et al., 2014; Mechling et al., 2014; Liska et al., 2015; Lu et al., 2019). Между тем в ходе эволюции плацентарных млекопитающих неокортекс расширился, сместив функциональные сети гиппокампа от первичной сенсорной коры к ассоциативной коре (Buckner, Krienen, 2013). Так, функциональные сети гиппокампа человека преимущественно включают высшие ассоциативные области коры, в то время как у грызунов сохраняются связи с первичной сенсорной корой (Bergmann et al., 2016).

На модели пГГЦ обонятельную функцию ранее не рассматривали. Интеграция между различными отделами головного мозга особенно важна в пределах сенсорных анализаторов (в частности, обонятельного) и при организации двигательной активности животных.

Большинство структурных нарушений на модели пГГЦ было нами исследовано в первый месяц

постнатального онтогенеза, когда происходит нормализация уровня гомоцистеина и отмечаются нейровоспалительные процессы, тогда как информация об изменениях на взрослой стадии обрывочна, что определяет актуальность микроскопического и ультраструктурного изучения ткани гиппокампа взрослых пГГЦ животных.

Исходя из изложенного, цель настоящей работы заключалась в исследовании нейродегенеративных изменений ультраструктурной организации области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пГГЦ, а также нарушения поведения животных, связанного с обонятельной функцией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проведена на крысах линии Wistar из питомника Рапполово (Санкт-Петербург, Россия). При проведении работ использовали разработанный ранее метод моделирования гипергомоцистеинемии (ГГЦ), основанный на дозированной метиониновой нагрузке, создаваемой путем принудительного перорального введения экспериментальным животным 0.15%-го водного раствора L-метионина (0.10–0.15 г в расчете на животное ежедневно), начиная с четвертых суток после оплодотворения и до родоразрешения (Арутюнян и др., 2012).

Самкам крыс контрольной группы в эти же сроки дополнительно перорально вводили воду. Морфологическое и поведенческое исследования проводили на самцах из потомства этих самок. С использованием световой и электронно-микроскопической техники проведено морфофункциональное исследование структурной организации области CA1 дорсального гиппокампа контрольных крыс и деструктивных изменений в ней у крыс, перенесших пГГЦ, через три месяца (стадия P90) после рождения.

Световая микроскопия. Метод Ниссля. Морфологический анализ состояния нервных клеток мозга проводили на других выборках животных: у контрольных и экспериментальных крыс на взрослой стадии развития, по девять животных в каждой группе. После транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере мозг резали на криостате Leica SM15105 (Leica, Германия), а полученные срезы дорсального гиппокампа толщиной 20 мкм окрашивали кризилвиолетом по методу Ниссля.

Метод Гольджи. Исследование особенностей направления и характера ветвления дендритных

отростков, расположение шипиков и варикозных расширений дендритов проводили хромосеребряным методом Гольджи. Взрослых контрольных крыс ($n=10$) наркотизировали Золетилом (30 мг на 1 кг веса), декапитировали, извлекали мозг и фиксировали блок с тканью конечного мозга, содержащий гиппокамп. Использовали классический метод с двухнедельным осмириванием и серебрением, сроком до одной недели. Процедуру подготовки материала проводили по протоколу, подробно описанному нами ранее (Белехова, Туманова, 1988). Мозг заливали в целлоидин и готовили серии фронтальных срезов толщиной 75–100 мкм.

Морфометрический анализ применяли для подсчета варикозных расширений и дендритных шипиков в зонах базальных и апикальных дендритов области CA1 дорсального гиппокампа. Число животных в выборке контрольной группы составляло 10.

Для анализа отбирали участки ткани *stratum oriens* ($n=7$) и *stratum radiatum* ($n=9$), на которых были одиночные дендритные отростки нейронов, характеризующиеся равномерной импрегнацией серебром. Подсчеты среднего количества дендритных шипиков и варикозных расширений осуществляли на ровных, прямых участках дендритов из слоев *stratum oriens* и *stratum radiatum*. Для каждой области интереса гиппокампа животного анализировали по восемь таких участков дендритов.

Ультроструктурный анализ нервной ткани мозга проводили у контрольных и крыс с пГГЦ на взрослой стадии развития, по два животных в каждой группе. Особи наркотизировали, как было описано ранее. Для изучения межклеточных взаимоотношений, структуры нейропилия и особенностей синаптических контактов в области CA1 дорсального гиппокампа крыс проводили фиксацию ткани для электронно-микроскопического исследования методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного глутарового альдегида и 1%-ного формальдегида на 0.1M PBS pH 7.4.

Далее область мозга с гиппокампом дофиксировали 1%-ным раствором OsO_4 , контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в эпон по стандартному протоколу (Shcherbitskaia et al., 2021). На ультратоме LKB-III (LKB, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 50 нм, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit (FEI, США).

Иммунофлуоресценция. С целью сравнительной оценки миелинизации на сроках P20 и P90 у крыс в норме ($n=9$) и при пГГЦ ($n=9$) изучали распре-

деление маркерного белка миелиновых волокон — гликопротеина олигодендроцитов (ГО) методом иммунофлуоресцентного анализа. Использовали первичные антитела ab24022 в разведении 1:1000) и FITC-конъюгированные вторичные антитела ab6785 в разведении 1:200 (Abcam, США).

Исследовали участок области CA1 дорсального гиппокампа (4.5 мм от Bregma по атласу: Paxinos, Watson, 2007), вычисляя среднюю яркость свечения на участке шириной 500 мкм, охватывающем все слои *cornu ammoni* от *stratum oriens* до *stratum radiatum*. При этом отбирали для анализа участки слоев *stratum oriens* и *stratum radiatum* для количественного анализа.

Первый срез последовательности имел случайное расположение в пределах области интереса, дистанция между последующими была 40 мкм. В работе использовали двойную систему негативного контроля. Негативный контроль “ГО⁺-печень” представлял собой ткань печени крысы контрольной группы. На срезах проводили полную процедуру иммунохимического окрашивания ГО как первичными, так и вторичными антителами. Помимо этого, для каждого животного подбирали негативный контроль ГО[−] — соседние срезы гиппокампа, иммунохимическую реакцию в которых проводили только вторичными антителами в отсутствие первичных антител.

С помощью программы VideoTest Master Morphology (VideoTest, Санкт-Петербург, Россия) на каждом анализируемом участке гиппокампа (по семь участков от каждого животного) измеряли среднюю яркость иммунофлуоресцентного свечения визуализированного гликопротеина. Затем для каждого исследуемого участка вычисляли разность между измеренной средней яркостью свечения на участке и яркостью аналогичного поля, соответствующего негативного контроля, используя ее в дальнейшей статистической обработке в качестве индекса миелинизации.

Животных контрольной группы и с пГГЦ сравнивали по значению полученного индекса миелинизации при помощи непараметрического критерия Манна—Уитни.

Тест на предпочтение запахов. Взрослым (P90) животным из контрольной и с пГГЦ групп ($n=15$ в группе) в течение 8 суток ежедневно предъявляли образцы запахов. Крысу сажали в центр камеры (1000×1000×400 мм) и в течение 15 мин регистрировали количество подходов к каждой открытой стеклянной емкости (диаметром и высотой по 30 мм) с каплей, объемом 0.1 мл одного из шести

эфирных масел на дне. Емкости с одорантами располагали по кругу на одинаковом расстоянии друг от друга и от стенок камеры, в которой проводили тестирование; их положение меняли при каждом новом предъявлении.

После каждого животного поверхности камеры протирали 50%-ным раствором этилового спирта. Для каждой крысы вычисляли усредненный по всем дням тестирования индекс предпочтения каждого запаха, который представлял число подходов к емкости конкретного одоранта в процентах от общего числа подходов ко всем емкостям с одорантами.

Использовали натуральные эфирные масла (гвоздики, мяты, эвкалипта, полыни, лаванды и валерианы). Из всего набора запахов только валериана обладала функционально значимым феромональным эффектом, универсальным для разных видов млекопитающих (Müller-Schwarze et al., 1974; Matsumoto-Oda et al., 2003; Мельник и др., 2009).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторной ANOVA с последующим post hoc анализом Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нейродегенеративные изменения в области CA1 дорсального гиппокампа крыс (P90), перенесших пГГЦ. В пирамидном слое области CA1 дорсального гиппокампа взрослых крыс с пГГЦ, в отличие от контроля, обнаружены значительные изменения в строении нейронов, дегенерирующих по хроматолизному типу, с локальным исчезновением органоидов в цитоплазме. Хроматолиз наблюдался как на светооптическом уровне (рис. 1б в сравнении с рис. 1а) так и на электроннограммах (рис. 1г в сравнении с рис. 1е). Хроматолиз был нами отмечен и на ранних стадиях развития (Shcherbitskaia et al., 2021). Помимо него у взрослых животных обнаружен и нейрофиламентозный тип дегенерации, при которой происходит полное замещение цитоплазматических органоидов нейрофиламентами (рис. 1д в сравнении с рис. 1е). Часто наблюдали выход этих нейрофиламентов из клетки в отростки нейронов (рис. 1е). В цитоплазме погибающих нейронов встречаются лизосомы и аутофагосомы в разных количествах и с разными формами (рис. 1з), наблюдается активация астроцитарной глии (рис. 1ж).

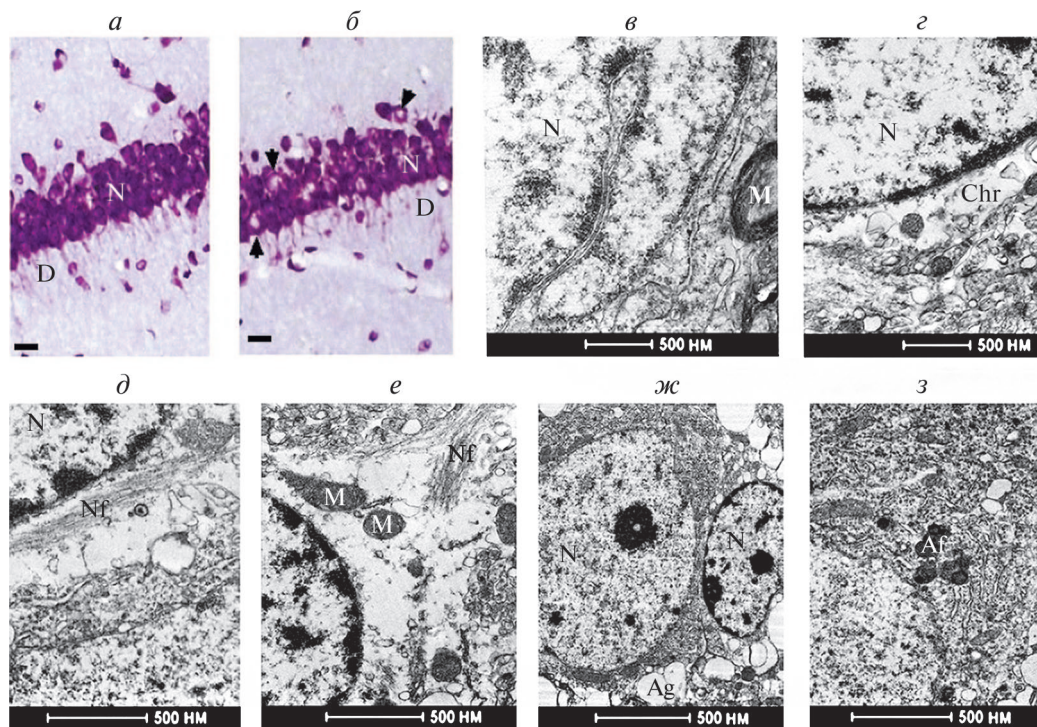


Рис. 1. Нейродегенеративные изменения клеток пирамидного слоя области CA1 дорсального гиппокампа у взрослых крыс, перенесших пГГЦ (б, г–з) в сравнении с контрольными (а, в); а, б — микрофотографии поля CA1 гиппокампа у крыс контрольных (а) и перенесших пГГЦ (б) крыс. Окраска по Нисслю, масштабная линейка: 30 мкм. Стрелками показаны пирамидные нейроны в состоянии хроматолиза; N — нейроны, D — дендриты. в–з — электроннограммы области CA1 гиппокампа крыс в контроле (в) и с пГГЦ (г–з); показаны хроматолиз (Chr, г), нейрофиламентозный тип клеточной дегенерации (д, е), выход нейрофиламентов в отросток нейрона (е), активация астроцитарной глии (ж) и аутофагосомы в цитоплазме нейрона (з). Ml — миелинизированные волокна, M — митохондрии, Nf — нейрофиламенты, Ag — отростки астроцитарной глии, Af — аутофагосомы.

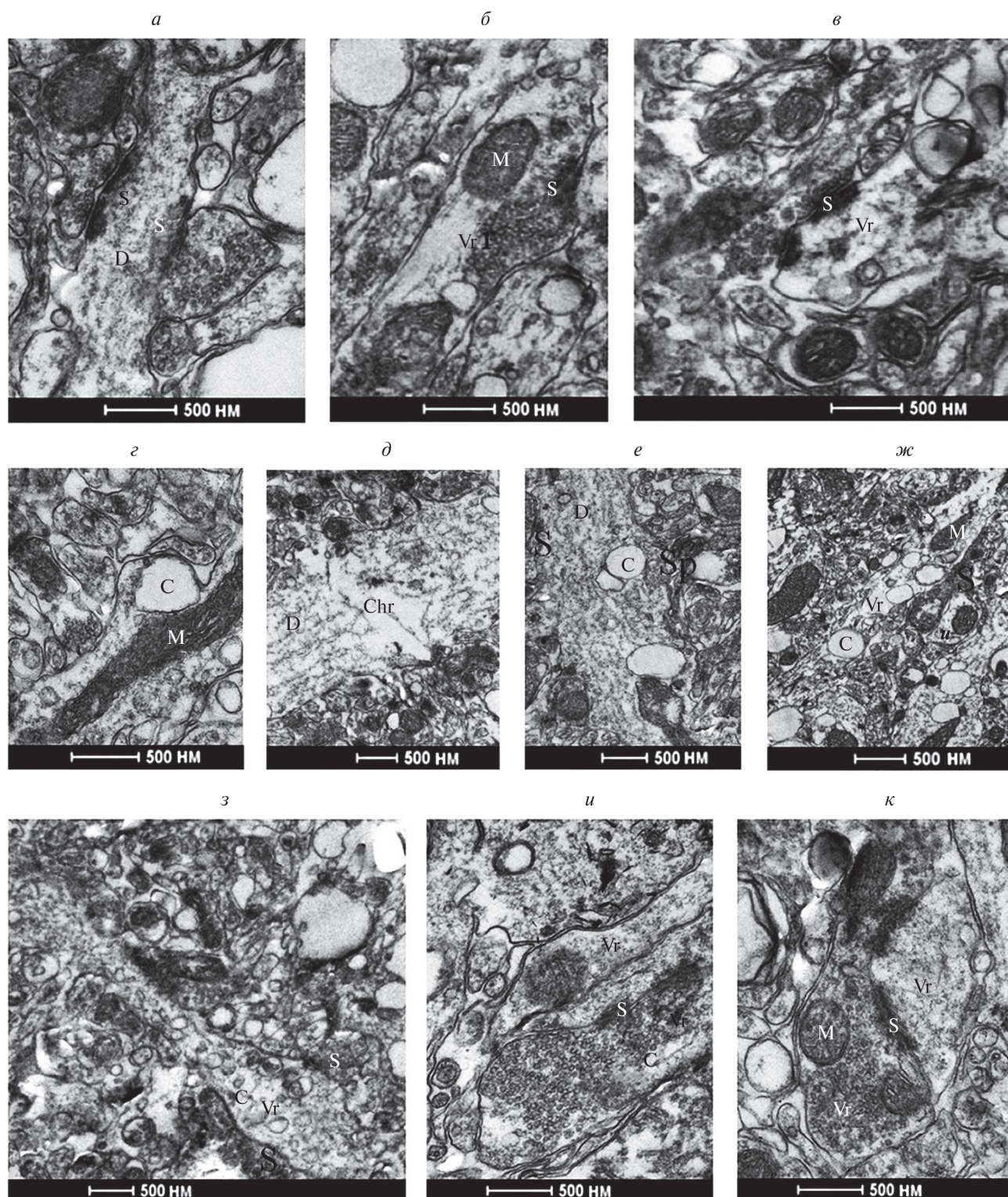


Рис. 2. Деструктивные изменения базальных дендритов области CA1 дорсального гиппокампа. Электроннограммы крыс контрольных (*a–в*) и с ПГЦ (*z–к*) в возрасте P90. С — цистерны, CHR — хроматоллиз, D — дендриты, M — митохондрии, N — нейроны, S — синаптические терминалы с контактами, Sp — дендритные шипики, Vr — варикозные расширения.

По сравнению с контрольными животными у взрослых крыс с ПГЦ в зонах базальных и апикальных дендритов были обнаружены зна-

чительные разрушения в дендритных отростках. В цитоплазме осевого цилиндра дендритов появляется большое количество цистерн, полностью

разрушаются кристы митохондрий, тургор осевого цилиндра дендрита уменьшается, а его оболочка становится извитой. Эти признаки патологии наблюдаются и в базальных (рис. 2г–е), и в апикальных дендритах (рис. 3а–г) по сравнению с контролем (рис. 2а–в).

Расширенные цистерны обнаруживаются и в местах дендритов, откуда отходят шиповидные выросты и шипики (см. рис. 3в, г). Такие же деструктивные явления можно наблюдать и в строении многочисленных дендритных варикозных расширений базальных (см. рис. 2ж) и апикальных дендритов (см. рис. 3а, б).

На рис. 2ж, з показаны мелкие варикозные расширения базальных дендритов. У них в осевых цилиндрах в цитоплазме заметны крупные цистерны (см. рис. 2г–е), разрушенные кристы митохондрий. Такие же признаки дегенеративных изменений обнаружены и в осевых цилиндрах апикальных дендритов (см. рис. 3а, б).

Из-за меньших размеров дистальных участков базальных дендритов, по сравнению с апикальными дендритами, варикозные расширения у первых гораздо меньшего размера и характеризуются большим количеством цистерн, занимающих значительный объем варикозного расширения (рис. 2ж, з).

Те же признаки разрушений заметны и в аксонных варикозных расширениях, у которых в зоне синаптических контактов происходит скопление синаптических пузырьков (см. рис. 2и, к). Шипики в основном находятся на дендритных ответвлениях между варикозными расширениями и имеют разнообразные формы: на длинной тонкой ножке с маленькой головкой, на толстой ножке с крупной головкой, либо встречаются шипики без головки (см. рис. 3д, е).

Для более полного понимания состояния нейронных сетей в области CA1 дорсального гиппокампа мы прибегли к данным, полученным с помощью хромосеребряного метода Гольджи у контрольных крыс. По этим данным, от тел пирамидных нейронов отходят многочисленные тонкие, длинные базальные дендриты размером до 300 мкм со вторичными и третичными ответвлениями, с многочисленными шипиками на их поверхности (рис. 4а–в).

Они направлены дорсально, перпендикулярно к поверхности гиппокампа. В слое *stratum oriens* базальные дендриты меняют направление и двигаются уже параллельно дорсальной поверхности гиппокампа, направляясь в *tractus temporo-ammoni*.

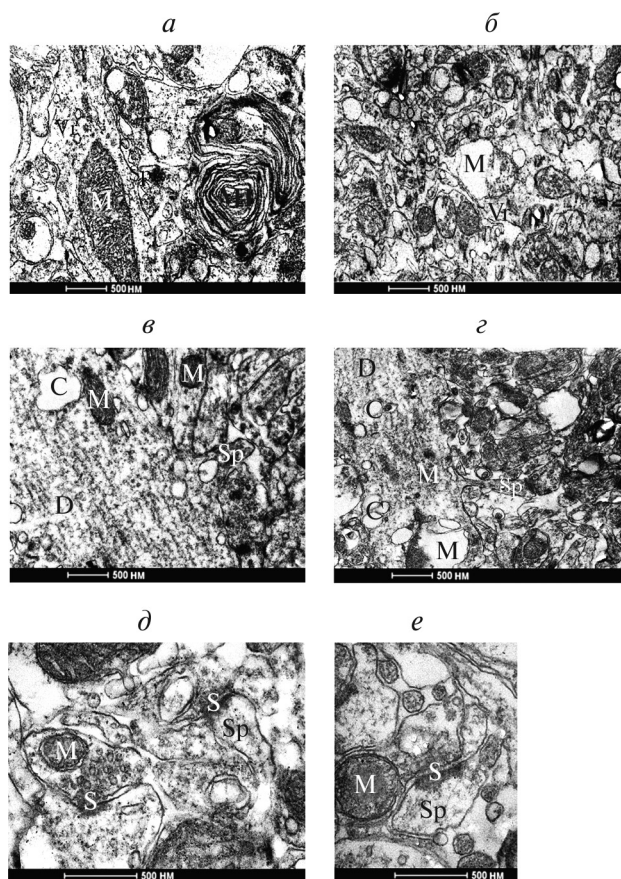


Рис. 3. Деструктивные изменения апикальных дендритов области CA1 дорсального гиппокампа. Электроннограммы крыс с пГГЦ в возрасте P90 (а–е). MI — миелинизированные волокна, D — дендриты, M — митохондрии, Vr — варикозные расширения, C — цистерны, S — синаптические терминалы с контактами, Sp — дендритные шипики.

В этом тракте отмечены многочисленные варикозные расширения на ответвлениях базальных дендритов и аксонов, заметны шиповидные дендритные шипики.

Мощные апикальные дендриты с многочисленными ответвлениями, длиной до 500 мкм направлены от тел пирамидных нейронов вентрально в слой *stratum radiatum*, где проходят коллатерали Шаффера. Поверхность дендритных отростков густо усеяна многочисленными дендритными шипиками и варикозными расширениями. На дендритных ответвлениях второго и третьего порядка заметна густая сеть варикозных расширений. На рис. 4г показаны пирамидные нейроны с многочисленными отростками апикальных дендритов. Помимо многочисленных варикозных расширений, на дистальных участках дендритов встречается большое количество дендритных шипиков.

Морфометрический анализ показал, что у взрослых контрольных животных среднее чис-

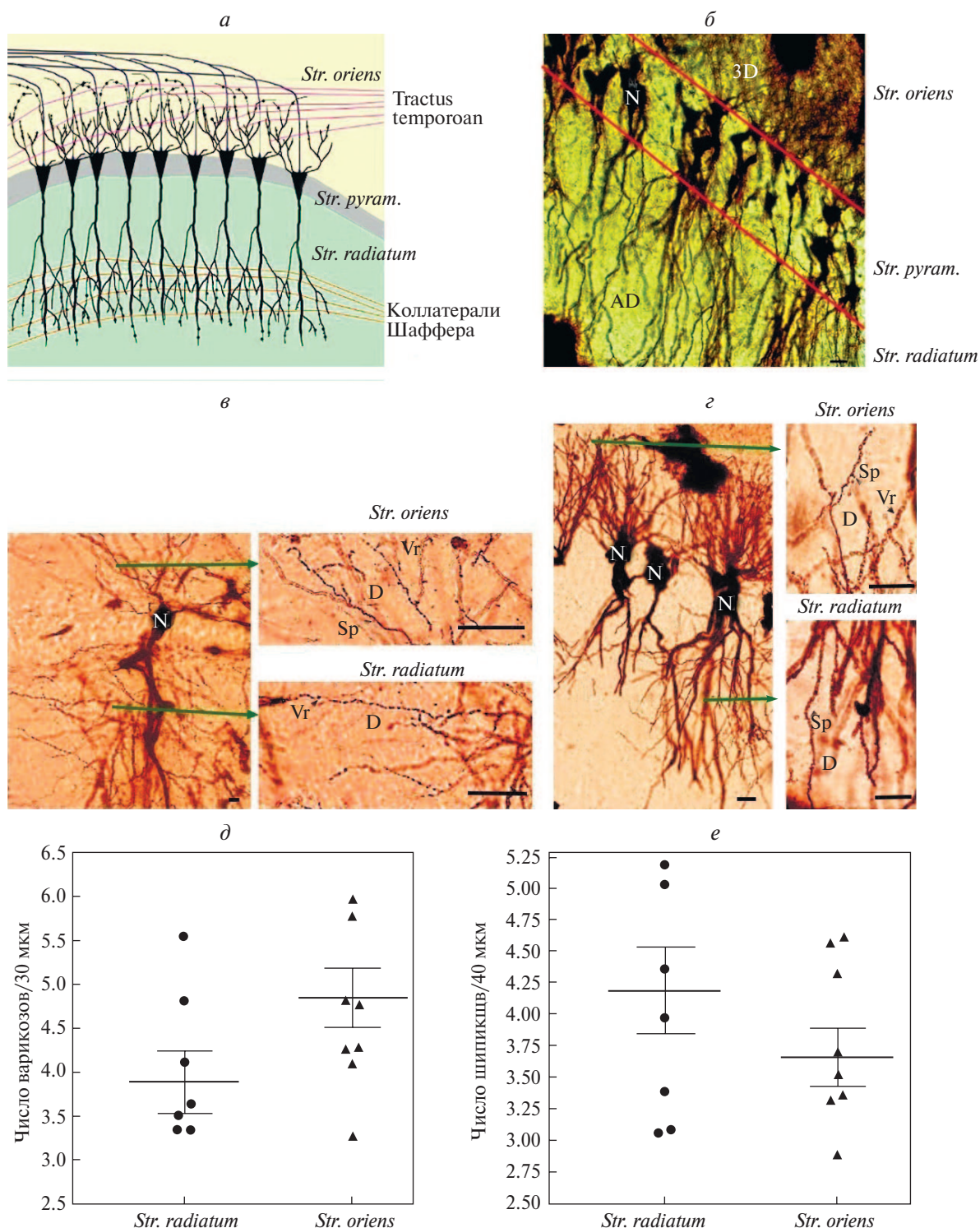


Рис. 4. Структурная организация базальных и апикальных дендритов пирамидных нейронов области CA1 дорсального гиппокампа взрослых контрольных крыс: *a* — схематическое изображение цитоархитеконики области CA1 дорсального гиппокампа крыс; *б–г* — микрофотографии области CA1 дорсального гиппокампа взрослых (P90) контрольных крыс. Метод Гольджи, масштабная линейка 10 мкм, в центре располагается слой пирамидных нейронов (*Str. pyramidale*); *в* — варикозные расширения на базальных и апикальных дендритах пирамидных нейронов; *г* — мощные пучки базальных и апикальных дендритов с дендритными шипиками и варикозными расширениями; *д, е* — количественный анализ варикозных расширений (*д*) и дендритных шипиков (*е*) на участке базальных (*Str. oriens*) и апикальных (*Str. radiatum*) дендритов пирамидных нейронов у контрольных крыс; показаны средние значения и их ошибки. Обозначения: *Str.* — *stratum*, N — нейроны, AD — апикальные дендриты, D — дендриты, BD — базальные дендриты, Vr — варикозные расширения дендритов, Sp — дендритные шипики.

ло варикозных расширений в *stratum radiatum* в пересчете на 1 мкм длины участка дендрита составляло 0.13 ± 0.01 , а в *stratum oriens* — 0.03 ± 0.01 (см. рис. 4д). Распределение дендритных шипиков было неравномерным (на дистальных участках они были более многочисленны), среднее число дендритных шипиков в пересчете на 1 мкм составляло 0.10 ± 0.02 в *stratum radiatum* и 0.09 ± 0.02 в *stratum oriens* (см. рис. 4е). В проксимальной части дендритов, вблизи тел нейронов, шипики отсутствовали.

Миелинизация у потомства крыс с пГГЦ. Чтобы выявить возможные причины нарушений миелинизации аксонов у взрослых животных с пГГЦ, иммуногистохимически исследовали распределение ГО в период активной миелинизации волокон гиппокампа на P20 и P90.

У крыс, перенесших пГГЦ, в области СА1 дорсального гиппокампа наблюдали нейродегенеративные изменения по сравнению с контролем. В зонах базальных и апикальных дендритов области СА1 на взрослой стадии развития (P90) обнаружены признаки деструкции миелинизированных волокон, играющих важную роль в проведении стимулов в гиппокампе. В миелинизированных волокнах обнаружены изменение тургора аксоплазмы, деструкция крист митохондрий, появление в ней расширенных цистерн и значительное расслоение миелиновой оболочки в виде выпуклых карманов с закрученными ламеллами (рис. 5а, б; см. рис. 3а).

Для сравнения: на P20 у крыс с пГГЦ отмечено нарушение процесса миелинизации нервных волокон в области СА1 дорсального гиппокампа. Исследование распределения ГО в норме (см. рис. 5д, з) и при пГГЦ (см. рис. 5л, о) показало разницу индексов миелинизации, характеризующих темпы миелинизации нервных волокон.

Так, после пренатальной пГГЦ этот индекс в *stratum oriens* был снижен на 21.2% относительно уровня контроля (тест Манна–Уитни, $U=10$, $P=0.005$; см. рис. 5е), а в *stratum radiatum* — на 21.4% (тест Манна–Уитни, $U=5$, $P<0.001$; см. рис. 5м). На взрослой стадии (P90) статистически значимого различия между контрольной и экспериментальной группами не обнаружено ни в *stratum oriens* (тест Манна–Уитни, $U=20$, $P=0.08$; см. рис. 5у), ни в *stratum radiatum* (тест Манна–Уитни, $U=26$; $P=0.22$; см. рис. 5н).

В ткани печени крысы, в которой отсутствует ГО, иммунохимическая реакция отсутствовала. Полученные данные могут свидетельствовать об

отставании в процессе миелинизации афферентных и эфферентных волокон в области СА1 гиппокампа, а также указывать на развитие процесса расслоения миелиновой оболочки у пГГЦ-крысят, что согласуется с результатами электронной микроскопии на взрослых животных.

Предпочтения запахов у взрослых крыс контрольных и с пГГЦ. Результаты исследования показали, что крысы, перенесшие пГГЦ, активнее интересовались запахами: среднее число подходов к емкости с эфирными маслами у крыс с пГГЦ было выше ($t=-2.42$, $P=0.02$, тест Стьюдента для независимых выборок), чем у контрольных животных, и составляло соответственно 67.19 ± 5.99 против 49.58 ± 4.14 . Контрольные животные наибольшее предпочтение отдавали маслу валерианы (рис. 6а): число подходов к емкости с ним преобладало над остальными пятью ($F_{5; 84}=42.35$, $P<0$, однофакторный анализ ANOVA, тест post hoc Бонферрони).

Реже всего контрольные крысы подходили к емкости с маслом полыни, однако статистически достоверной разницы с числом подходов к другим запахам, кроме валерианы, выявлено не было.

Внимание к запаху валерианы для крыс с пГГЦ находилось на уровне остальных четырех одорантов — гвоздики, мяты, эвкалипта и лаванды, за исключением запаха полыни (см. рис. 6б), характеризовавшимся наименьшим числом подходов к емкости с этим одорантом. Число подходов к емкости с запахом полыни статистически достоверно отличалось от такового для валерианы и гвоздики ($F_{5; 84}=3.42$, $P=0.039$ и $P=0.006$ соответственно: однофакторный анализ ANOVA, тест post hoc Бонферрони).

По сравнению с контрольными животными крысы, перенесшие пГГЦ, подходили к емкости с маслом валерианы в 1.5 раза реже ($t=6.19$, $P<0.0001$, тест Стьюдента для независимых выборок). Поскольку считается, что масло валерианы обладает феромональными свойствами и является в норме физиологически значимым стимулом, можно сделать вывод о негативном влиянии пГГЦ на работу обонятельного анализатора.

ОБСУЖДЕНИЕ

При нарушении эмбрионального развития, в частности при пГГЦ, в области СА1 дорсального гиппокампа крыс обнаружены деструктивные изменения в ультраструктурной организации нейронных сетей этого важного отдела. Нами показа-

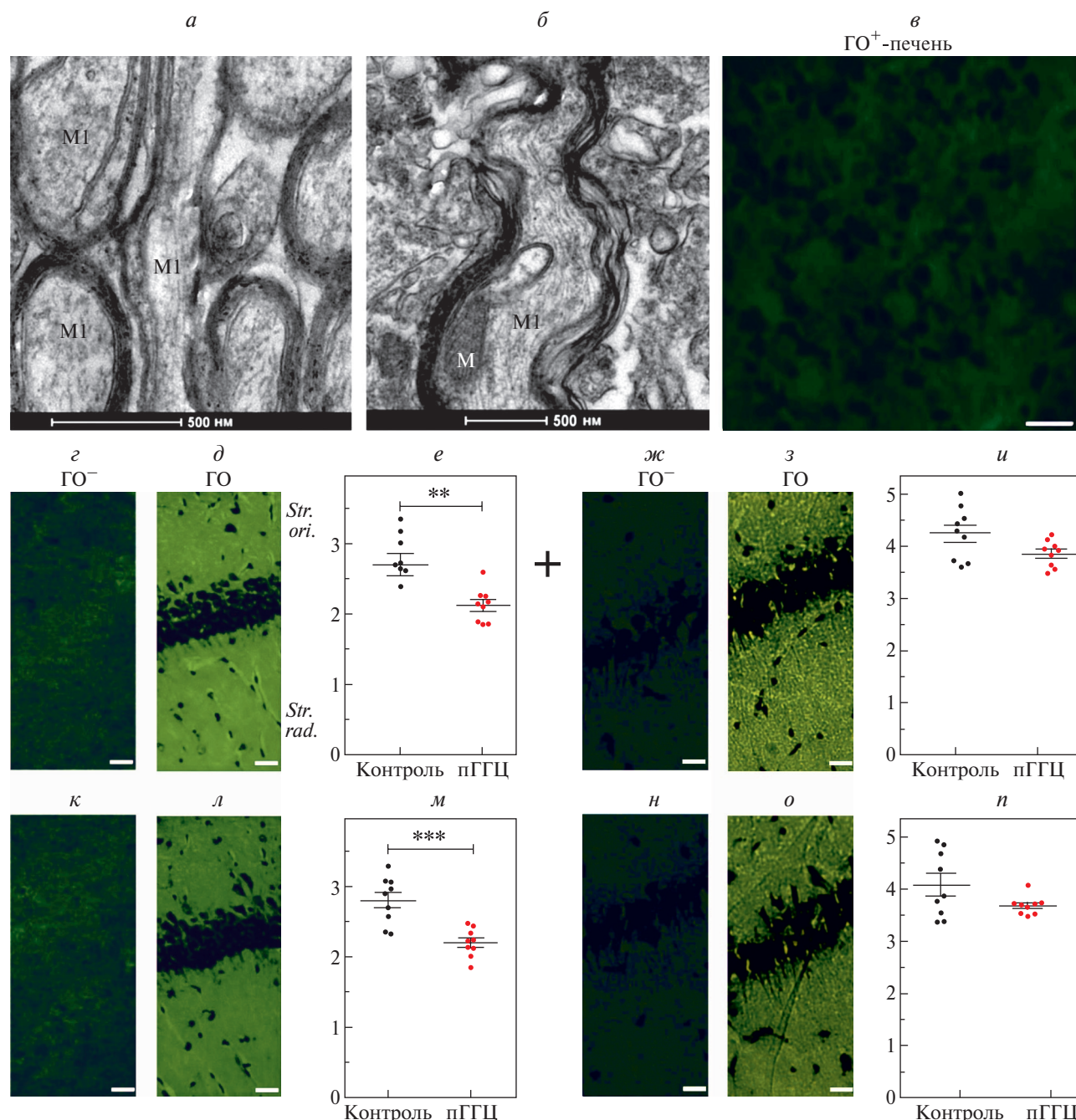


Рис. 5. Влияние пГГЦ на миелинизацию нервных волокон в поле дорсального гиппокампа крыс: электроннограммы крыс контрольных (*a*) и с пГГЦ (*б*) в возрасте P90. M1 — миелинизированные волокна, M — митохондрии; *в–п* — сравнение распределения гликопротеина олигодендроцитов (ГО, свечение FITC) в ткани печени (*в*) и области СА1 гиппокампа (*г, д, ж, з, к, л, н, о*) контрольных крыс (*г, д, ж, з*) и крыс с пГГЦ (*к, л, н, о*) в возрасте P20 (*г, д, к, л*) и P90 (*ж, з, н, о*). Иммуногистохимическое окрашивание, масштабная линейка: 20 мкм; *в* — негативный контроль (ГО⁺-печень — полная иммунохимическая реакция на препарате ткани печени контрольной крысы на P20) с первичными и вторичными антителами, масштаб: 40 мкм; *г, ж, к, н* — негативный контроль (ГО⁻ — иммунохимическая реакция на препарате ткани гиппокампа в отсутствие первичных антител); *е, и, м, п* — индекс миелинизации, усл. ед. (разница в яркости свечения между исследуемым участком ткани и соответствующим ему негативным контролем ГО⁻) — результаты денситометрии иммунохимического окрашивания ГО в слое *stratum oriens* (Str. ori.: *е, и*) и в слое *stratum radium* (Str. rad.: *м, н*) у крыс на P20 (*е, м*) и P90 (*и, н*). Данные представлены в виде среднего и его ошибки. Звездочки показывают различия между контрольной группой и с пГГЦ на P20 при $P=0.005$ (**) и $P=0.0008$ (***) (непараметрический критерий Манна–Уитни).

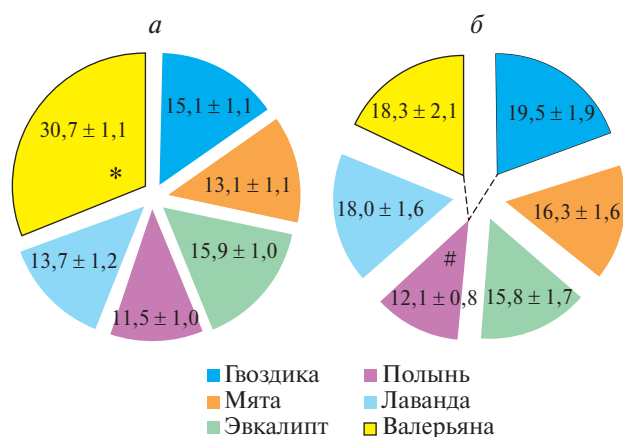


Рис. 6. Схема распределения индексов предпочтения запаха одоранта взрослыми крысами — контрольными (а) и с пГГЦ (б). Индексы представлены разноцветными секторами и выражены числом подходов (средним значением и его ошибкой) к емкости с соответствующим одорантом натурального растительного масла в процентах от общего числа подходов ко всем емкостям. Черной границей выделен сектор, соответствующий физиологически значимому запаху валерианы. Штриховые линии между секторами указывают на статистически достоверные различия индексов предпочтения между одорантами у животных с пГГЦ. Объем каждой выборки $n = 15$. Однофакторный анализ ANOVA с последующим анализом post hoc Бонферрони. * — предпочтение запаха валерианы относительно других пяти запахов достоверно при $P < 0.0001$; # — предпочтение запаха полыни относительно гвоздики, а также запаха полыни относительно валерианы достоверны при $P < 0.05$.

но, что после пГГЦ в раннем онтогенезе (P5) во всех зонах CA1 дорсального гиппокампа у крыс появлялись признаки отставания в созревании и развитии основных элементов нервной ткани по сравнению с контрольными животными: большой объем межклеточного пространства, большое количество конусов роста, задержка в развитии дендритных и аксонных отростков и недостаточное развитие органоидов в цитоплазме нейронов (Shcherbitskaia et al., 2021; Vasilev et al., 2023).

В данной работе мы исследовали влияние гомоцистеина на изменения в ультраструктурной организации гиппокампа крыс пГГЦ в более поздний период онтогенетического развития — у взрослых крыс на P90. Обнаружено, что большинство дегенерирующих нейронов пирамидного слоя CA1 подвержены не только хроматолизу, но и филаментозному типу дегенерации и окружены многочисленными отростками активированной астроглии.

В цитоплазме дегенерирующих нейронов обнаружено большое количество аутофагосом и лизосом. Показано, что повышенный уровень

провоспалительных цитокинов свидетельствует о нейровоспалительной реакции в гиппокампе взрослых крыс после пГГЦ, что наблюдали и на более ранних этапах онтогенеза (Shcherbitskaia et al., 2021).

В зонах расположения базальных и апикальных дендритов происходят нейродегенеративные изменения в проводящих путях: распад миелинизированных волокон, деструкция базальных дендритов (в слое *stratum oriens*) и апикальных дендритов (в слое *stratum radiatum*), а также в дендритных варикозных расширениях, расположенных в большом количестве на дистальных участках этих дендритов, направленных в тракты *tractus temporoammonii* и коллатерали Шаффера. Согласно данным электронной микроскопии, у контрольных животных дегенеративных изменений в этих варикозных расширениях не возникает.

В более ранних наших исследованиях по влиянию гомоцистеина на формирование отделов мозга крыс было показано, что на ранних стадиях (P5) постнатального развития крыс, миелиновая оболочка у аксональных волокон в CA1 еще не сформирована (Shcherbitskaia et al., 2021). Однако на P20 в CA1 дорсального гиппокампа нами отмечено снижение иммунохимической реакции на ГО, что может свидетельствовать об отставании процесса миелинизации аксонов у крыс с пГГЦ и о нарушении слоев миелина. ГО (myelin oligodendrocyte glycoprotein) является важным маркером миелинизации. Он локализован как на поверхности олигодендроцитов, так и во всех миелинизированных волокнах гиппокампа и участвует в стабилизации и интеграции слоев миелина.

Показана его роль в патогенезе рассеянного склероза (Berger et al., 2003). Из данных литературы известно, что ГО вовлечен в стабилизацию слоев миелина и рассматривается в качестве перспективного маркера для выявления демиелинизации в экспериментальных моделях и диагностики демиелинизирующих заболеваний (Kitley et al., 2012). Его недостаточная экспрессия или нейтрализация специфическими антителами (Berger et al., 2003; Kitley et al., 2012) вызывает дезинтеграцию (расслоение) миелиновых слоев, аналогичное таковому при рассеянном склерозе (Ketelslegers et al., 2015), аутоиммунном энцефаломиелите (Kezuka et al., 2012) и нашим наблюдениям в данном исследовании. Сведения об изменении распределения ГО на P20 согласуются с результатами дезинтеграции миелиновых слоев у взрослых животных, описанными в настоящей работе.

По сравнению с контрольными крысами все перечисленные признаки дегенеративных изменений нейронов пирамидного слоя, миелинизированных волокон, немиелинизированных аксонов, дендритов и варикозных расширений зоны базальных дендритов и зоны апикальных дендритов свидетельствуют о токсическом действии гомоцистеина и серьезном нарушении строения нервной ткани в области CA1 дорсального гиппокампа крыс, перенесших пГГЦ, и указывают на возможность снижения пластичности этого важного отдела мозга, которое отражается на поведении животных.

Ранее нами было показано, что пГГЦ нарушает обучение и память у взрослых животных (Postnikova et al., 2022). Поскольку гиппокамп является одним из звеньев обонятельного анализатора, в представленной работе мы исследовали влияние пГГЦ на обоняние и обнаружили, что пГГЦ способна влиять на поведение взрослых крыс, сопряженное с обонятельной функцией.

В норме среди шести запахов натуральных эфирных масел наиболее привлекательным для всех контрольных крыс являлось валериановое масло. Этот результат согласуется с нашими данными, описанными ранее (Dubrovskaya et al., 2022) и является вполне закономерным, поскольку компоненты валерианового масла, в частности, изовалериановая кислота, имеют феромональное значение для этого вида животных и широко используются при исследовании обонятельной функции у грызунов (Борякова и др., 2007; Мельник и др., 2009, 2012). У взрослых крыс пГГЦ полностью нивелировала предпочтение запаха валерианы, являющегося в норме физиологически значимым стимулом, поэтому можно сделать вывод о пагубном влиянии пГГЦ на нормальную работу обонятельного анализатора.

У взрослых контрольных крыс с помощью метода Гольджи нами было показано, что при вхождении в тракты *temporoammonic* и коллатерали Шаффера на поверхности дистальных отрезков базальных и апикальных дендритов появляется густая сеть варикозных расширений.

Морфометрический анализ, проведенный на светооптическом уровне показал, что количество дендритных шипиков в *stratum radiatum* больше, чем в *stratum oriens*, а дендритных варикозных расширений больше в *stratum oriens*, чем в *stratum radiatum*.

Сходные признаки вхождения в тракты нервных волокон и дендритов с варикозными расширениями мы наблюдали ранее в таламусе и в амигдале

у рептилий, где также осуществлялись интегративные связи в рамках различных сенсорных систем (Белехова, Туманова, 1988). Авторы отмечали сходство принципов организации мозга, осуществляющих такую интегративную деятельность у животных в эволюционном ряду позвоночных (Белехова, Туманова, 1988). На основании полученных фактов можно судить о специфичности восприятия разномодальных импульсов и сделать принципиально важный вывод относительно появления других приспособительных систем в ряду позвоночных животных.

Факт вхождения в тракты дендритов с варикозными расширениями свидетельствует об увеличении специализированной поверхности для аксодендритических синапсов. Согласно представлениям об особенностях организации и строении отделов мозга низших позвоночных животных, истоки гетеросенсорной конвергенции базируются на филогенетически древних механизмах афферентации нейронных сетей мозга у низших позвоночных. Поэтому прогрессивная специализация сенсорных центров в эволюции позвоночных животных проходила путем преобразования этих систем (Белехова, Туманова, 1988).

Образование густой сети варикозных расширений на дендритных отростках CA1 свидетельствует о специализированном построении нейронных сетей с значительным увеличением контактной синаптической поверхности с многофункциональными волокнами, направленными в гиппокамп. Наблюдавшиеся нами признаки нейродегенеративных изменений в проводящих путях в области CA1 дорсального гиппокампа крыс с пГГЦ в раннем онтогенезе и у взрослых крыс, а также нарушенное поведение указывают на возможное изменение в построении нейронных сетей.

В литературе отмечена повышенная чувствительность сенсорных систем и когнитивных функций к действию повреждающих факторов (Rice, Barone, 2000). Нарушение этих функций наблюдается при развитии различных нейродегенеративных процессов как в случае старения (развитие нейродегенеративных заболеваний — Ribaut-Barassin et al., 2003), так и у потомства животных при различных осложнениях беременности (Rice et al., 2000).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что пГГЦ влияет на структуру ткани области CA1 дорсального гиппокампа крыс, являющейся важным интегративным центром, участвующим в обработке разномодальных стимулов. Действие пГГЦ

вызвало деструктивные изменения нервной ткани, обнаруженные нами в области CA1 дорсального гиппокампа не только в раннем онтогенезе, но и на взрослой стадии.

Наблюдаемые нарушения могут оказывать пагубное влияние на работу сенсорных систем, а также на когнитивные функции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.В. Михель (ИЭФБ, Санкт-Петербург) за помощь в постановке модели пГГЦ. Электронную микроскопию проводили на оборудовании центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН с помощью оборудования для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00967-23-00) без сторонней финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН, основанного на директиве Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive 86/609 for the Care of Laboratory Animals).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Л. Туманова: идея работы и планирование эксперимента, написание и редактирование текста; Н.Л. Туманова, Д.С. Васильев, Н.М. Дубровская: сбор данных и их обработка; текст и рисунки одобрены всеми соавторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арутюнян А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Пустыгина А.В., Козина Л.С., Кореньевский А.В. Использование различных экспериментальных моделей гипергомо-

цистеинемии в нейрохимических исследованиях. Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 2. С. 83. (Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S., Bulygina Y., Mashkina A., Khavinson V. 2012. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia. Int. J. Clin. Exper. Med. 5(2). P. 179).

Белехова М.Г., Туманова Н.Л. Структурные основы слухо-соматического взаимодействия в мозгу черепахи *Emys orbicularis*. Дендритный обмен между ядрами. Журнал эвол. биохим. и физиол. 1988. Т. 24. № 3. С. 326. (Belekhova M.G., Tumanova N.L. 1988. Structural bases of audio-somatic interactions in turtle *Emys orbicularis* brain. Dendrite exchange between nuclei. J. Evol. Biochem. Physiol. (Russ.) V. 24. P. 326.)

Борякова Е.Е., Гладышева О.С., Крылов В.Н. Возрастная динамика обонятельной чувствительности у самок лабораторных мышей и крыс к запаху изовалериановой кислоты. Сенсорные системы. 2007. Т. 21. № 4. С. 341. (Boryakova E.E., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2007. Age dynamics of olfactory sensitivity in female laboratory mice and rats to the smell of isovaleric acid. Sensory systems. V. 21. P. 341.)

Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. Возрастные изменения обонятельной чувствительности самцов мышей к запаху изовалериановой кислоты. Сенсорные системы. 2009. Т. 23. № 2. С. 151. (Mel'nik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2009. Age-related changes in the olfactory sensitivity of male mice to the smell of isovaleric acid. Sensory systems. V. 23. P. 151.)

Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. Влияние предварительного воздействия паров изовалериановой кислоты на обонятельную чувствительность самцов домовых мышей. Сенсорные системы. 2012. Т. 26. № 1. С. 52. (Mel'nik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. 2012. Influence of preliminary exposure to isovaleric acid vapors on the olfactory sensitivity of male house mice. V. 26 P. 52.)

Allen T.A., Fortin N.J. 2013. The evolution of episodic memory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 110. P. 10379.

Berger T., Rubner P., Schautzer F., Egg R., Ulmer H., Mayringer I., Dilitz E., Deisenhammer F., Reindl M. 2003. Antimyelelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. New England J. Med. V. 349. 139. doi:10.1056/NEJMoa022328

Bergmann E., Zur G., Bershadsky G., Kahn I. 2016. The organization of mouse and human corticohippocampal networks estimated by intrinsic functional connectivity. Cereb. Cortex. 26. P. 4497–4512. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw327>

Buckner R.L., Krienen F.M. 2013. The evolution of distributed association networks in the human brain. Trends Cogn. Sci. V. 17. P. 648. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.09.017>

Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Tumanova N.L., Alekseeva O.S., Nalivaeva N.N. 2022. Prenatal hypoxia impairs olfactory function in postnatal ontogeny in rats. Neurosci. Behav. Physiol. V. 52. P. 262. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01233-3>

Gass N., Schwarz A.J., Sartorius A., Schenker E., Risterucci C., Spedding M., Zheng L., Meyer-Lindenberg A., Weber-

- Fahr W. 2014. Sub-anesthetic ketamine modulates intrinsic BOLD connectivity within the hippocampal-prefrontal circuit in the rat. *Neuropsychopharmacol.* V. 39. P. 895.
- Ketelslegers I.A., Van Pelt D.E., Bryde S., Neuteboom R.F., Catsman-Berrevoets C.E., Hamann D., Hintzen R.Q. 2015. Anti-MOG antibodies plead against MS diagnosis in an acquired demyelinating syndromes cohort. *Multiple Sclerosis.* V. 21. P. 1513. doi:10.1177/1352458514566666
- Kezuka T., Usui Y., Yamakawa N., Matsunaga Y., Matsuda R., Masuda M., Utsumi H., Tanaka K., Goto H. 2012. Relationship between NMO-antibody and anti-MOG antibody in optic neuritis. *J. Neuro-Ophthalmol.* V. 32. P. 107. doi:10.1097/WNO.0b013e31823c9b6c
- Kitley J., Woodhall M., Waters P., Leite M.I., Devenney E., Craig J., Palace J., Vincent A. 2012. Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology.* 79 (12). P. 1273–1277. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826aac4e
- Liska A., Galbusera A., Schwarz A.J., Gozzi A. 2015. Functional connectivity hubs of the mouse brain. *Neuroimage.* V. 115. P. 281. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.04.033
- Lu J., Testa N., Jordan R., Elyan R., Kanekar S., Wang J., Eslinger P., Yang Q., Zhang B., Karunanayaka P. 2019. Functional connectivity between the resting-state olfactory network and the hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Sci.* V. 9. P. 338. https://doi.org/10.3390/brainsci9120338
- Matsumoto-Oda A., Oda R., Hayashi Y., Murakami H., Maeda N., Kumazaki K., Shimizu K., Matsuzawa T. 2003. Vaginal fatty acids produced by chimpanzees during menstrual cycles. *Folia Primatol (Basel).* V. 74. P. 75. https://doi.org/10.1159/000070000
- Mechling A.E., Hübner N.S., Lee H.-L., Hennig J., von Elverfeldt D., Harsan L.-A. 2014. Fine-grained mapping of mouse brain functional connectivity with resting-state fMRI. *Neuroimage.* V. 96. P. 203. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.078
- Müller-Schwarze D., Müller-Schwarze C., Singer A.G., Silverstein R.M. 1974. Mammalian pheromone: identification of active component in the subauricular scent of the male pronghorn. *Science.* V. 183. P. 860. https://doi.org/10.1126/science.183.4127.860
- Paxinos G., Watson C. 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier: Amsterdam-Boston.
- Postnikova T.Y., Amakhin D.V., Trofimova A.M., Tumanova N.L., Dubrovskaya N.M., Kalinina D.S., Kovalenko A.A., Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Zaitsev A.V. 2022. Maternal Hyperhomocysteinemia Produces Memory Deficits Associated with Impairment of Long-Term Synaptic Plasticity in Young Rats. *Cells.* V. 12. P. 58. https://doi.org/10.3390/cells12010058
- Ribaut-Barassin C., Dupont J.-L., Haeberlé a.-M., Bombarde G., Huber G., Moussaoui S., Mariani J., Bailly Y. 2003. Alzheimer's disease proteins in cerebellar and hippocampal synapses during postnatal development and aging of the rat. *Neurosci.* V. 120. P. 405. doi:10.1016/S0306-4522(03)00332-4
- Rice D., Barone S. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* V. 108. P. 511. https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511
- Schwarz A.J., Gass N., Sartorius A., Zheng L., Spedding M., Schenker E., Risterucci C., Meyer-Lindenberg A., Weber-Fahr W. 2013. The low-frequency blood oxygenation level-dependent functional connectivity signature of the hippocampal-prefrontal network in the rat brain. *Neurosci.* V. 228. P. 243. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.032
- Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V. 2021. Prenatal hyperhomocysteinemia induces glial activation and alters neuroinflammatory marker expression in infant rat hippocampus. *Cells.* V. 10. P. 1536. https://doi.org/10.3390/cells10061536
- Vasilev D.S., Shcherbitskaia A.D., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Milyutina Y.P., Kovalenko A.A., Dubrovskaya N.M., Inozemtseva D.B., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V. 2023. Maternal hyperhomocysteinemia disturbs the mechanisms of embryonic brain development and its maturation in early postnatal ontogenesis. *Cells.* V. 12. P. 189. https://doi.org/10.3390/cells12010189
- Zhou G., Olofsson J.K., Koubeissi M.Z., Menelaou G., Rosenow J., Schuele S.U., Xug P., Voss J.L., Lane G., Zelano C. 2021. Human hippocampal connectivity is stronger in olfaction than other sensory systems. *Progress Neurobiol.* V. 201. P. 102027. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102027

STUDY OF NEURODEGENERATIVE CHANGES IN THE CA1 AREA OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS IN ADULT RATS AFTER PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

N. L. Tumanova^a, D. S. Vasiliev^{a,*}, N. M. Dubrovskaya^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223, Russia*

**E-mail: dvasilyev@bk.ru*

The work is devoted to the study of neurodegenerative changes in the ultrastructural organization in CA1 of the hippocampus in adult rats subjected to prenatal hyperhomocysteinemia (pHHC). Electron microscopy revealed signs of pathological changes in the CA1 neural networks of the dorsal hippocampus in adult pHHC rats, unlike in control ones: cell degeneration, destruction of the myelin sheath of axons, and destruction of axial cylinders of basal and apical dendrites directed from the pyramidal neurons to the Schaffer collaterals and the temporo-ammonic tractus. In control animals, a dense network of varicose extensions in the distal branches of the dendrites in the stratum oriens and stratum radiatum layers was detected using the Golgi method, providing an increased area for synaptic contacts. In pHHC rats, significant destructive changes are found in these dendritic varicosities: destruction of mitochondrial cristae and appearance of huge cisterns. In adult rats, pHHC completely negated the preference for the smell of valerian, which is a physiologically significant stimulus in the norm, indicating the negative effect of pHHC on the work of the olfactory analyzer, whose activity is closely connected with the hippocampus. These findings indicate the deleterious effect of homocysteine on the formation of the dorsal hippocampus as a morphological substrate for the integration of the incoming impulses.

Keywords: hippocampus, rat, hyperhomocysteinemia, ontogenesis, ultrastructural organization, neurodegenerative change, dendrite varicose, olfaction