

БАДЛАЕВА АЛИНА СТАНИСЛАВОВНА

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И АУТОФАГОЦИТАРНОЙ
ДИСФУНКЦИИ В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ**

1.5.22. Клеточная биология

3.3.2. Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Сухоруков Владимир Сергеевич**

доктор медицинских наук, профессор **Гулевская Татьяна Сергеевна**

Официальные оппоненты:

Конорова Ирина Львовна

доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рыжова Марина Владимировна

доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н.Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

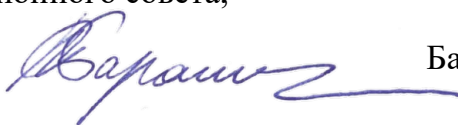
Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.02 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в научном отделе библиотеки федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте организации: <https://rsmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук



Баранич Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Во всех странах мира отмечается феномен старения населения. По данным Всемирной Организации Здравоохранения к 2050 году число людей старше 60 лет удвоится и составит 22% [Beard J.R. et al., 2016; Rechel B. et al., 2009]. Старение является одним из основных факторов риска развития многих возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний, а многие изменения, возникающие при возрастной инволюции и патологической нейродегенерации, имеют схожую морфологическую картину и различаются между собой в основном количественно [Мишнев О.Д., 2010; Emery Thompson M. et al., 2020]. Однако в литературе представлены противоречивые данные об изменениях стареющего головного мозга [Brody H., 1955; Cabello C.R. et al., 2002; Costa K.M., 2014; Lowe J., 2015; Martínez-Pinilla E. et al., 2016; Peters A., 1993]. Все вышеперечисленное отражает актуальность исследования морфологических изменений и морфометрических параметров структурных элементов головного мозга при старении для их дальнейшего использования в качестве сравнительных показателей при исследовании нейродегенеративных заболеваний.

Наиболее универсальным представляется определение старения как многофакторного процесса, характеризующегося снижением функции клеток вследствие накопления повреждений с течением времени. В результате многочисленных исследований было показано, что маркерами старения являются генетические и эпигенетические альтерации, биоэнергетический дефицит и окислительный стресс, измененный протеостаз, а также нарушение соотношения процессов анаболизма и катаболизма, неэффективный синтез, деградация органелл [Руководство по геронтологии и гериатрии п/р В.Н.Ярыгина и А.С.Мелентьева, 2010; Farr J.N. et al., 2016; Kunizheva S.S. et al., 2022; Li Z. et al., 2021].

Одну из ключевых ролей в регулировании старения играют митохондрии и процессы аутофагии. Являясь источниками энергии и строительных белков, митохондрии и компоненты системы аутофагии не только активно участвуют в

координации обменных процессов и поддержании гомеостаза, но и тесно связаны между собой [Deus C.M.et al., 2020].

Исследование вышеописанных звеньев клеточного гомеостаза представляется наиболее перспективным в энергозависимой нервной ткани, имеющей максимальное внутриклеточное представительство митохондрий. Актуальность изучения данного вопроса также связана и с огромной значимостью системы обновления цитоплазмы для постмитотической нейрональной популяции. Поддержание базального уровня аутофагии критически важно для обеспечения функционирования нервных клеток, а его снижение может приводить к агрегации белков – ключевому патогенетическому механизму таких нейродегенеративных заболеваний как болезнь Паркинсона и Альцгеймера [Fivenson E.M. et al., 2017; Overhoff M. et al., 2021; Wang J.L. et al., 2020]. Следовательно, морфофункциональные особенности нервной ткани определяют важность митохондриально-аутофагоцитарного взаимодействия в поддержании функционального пула нейронов.

Ввиду всего вышеперечисленного, крайне актуальным представляется определение взаимосвязи между потенциальными ключевыми маркерами митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции и их вкладом в старение и нейродегенерацию с конечной целью установить фармацевтические мишени.

Цель: определение взаимосвязи между параметрами морфофункционального состояния митохондрий и компонентов системы аутофагоцитоза в нейронах головного мозга в процессе старения.

Задачи исследования:

1. Выявить гистологические особенности серого и белого вещества головного мозга человека и лабораторных животных при старении.
2. Определить состояние митохондрий в нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных с помощью иммуногистохимического метода.

3. Оценить состояние макроаутофагии и шаперон-индуцированной аутофагии в нейронах головного мозга человека и лабораторных животных при старении с использованием метода иммуногистохимии.
4. Провести ультраструктурную оценку митохондрий и компонентов системы аутофагоцитоза в процессе старения головного мозга лабораторных животных.
5. Определить корреляционные взаимосвязи между полученными данными и выявить значимые гистологические маркеры нарушения взаимодействия митохондрий и системы аутофагоцитоза при старении.

Научная новизна:

В работе комплексно исследованы, детально описаны и подробно проиллюстрированы морфологические проявления сенильных изменений нервной ткани и сосудистой системы в структурах головного мозга человека, вовлеченных в патогенез возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний.

Проведена оценка и детальное сравнение морфометрических параметров серого и белого вещества головного мозга человека и лабораторных животных при старении; при отсутствии у старых лабораторных животных коморбидных заболеваний выявлено увеличение глиального индекса преимущественно за счет пролиферации глии, что в сочетании с незначительным уменьшением числа нейронов в моторной коре и стриатуме, подтверждает важную роль сердечно-сосудистых заболеваний в гибели нейронов головного мозга человека с течением времени.

В работе впервые выявлена прямая корреляционная зависимость между маркерами макроаутофагии LC3B, шаперон-индуцированной аутофагии (ШИА) HSP70 и LAMP2A и маркером АТФ-синтазы АТР5А1; обратная корреляционная зависимость между маркерами шаперон-индуцированной аутофагии и маркером системы контроля качества митохондрий DJ-1.

Показано увеличение интенсивности окрашивания маркера АТФ-синтазы, что в сочетании с данными электронно-микроскопического исследования

подтверждает увеличение размеров митохондрий в качестве компенсаторно-приспособительной реакции при старении.

Обнаруженный нами характер экспрессии маркеров шаперон-индуцированной аутофагии и макроаутофагии позволяет предположить активное участие различных механизмов утилизации дисфункциональных белков в обеспечении выживаемости нейронов с течением времени. С другой стороны, результаты окрашивания иммуногистохимических маркеров двух типов аутофагии в сочетании с их корреляционным анализом, свидетельствуют о развивающейся с возрастом аутофагоцитарной дисфункции.

Практическая и теоретическая значимость

Диссертация вносит вклад в разработку концепции клеточных и молекулярных механизмов старения головного мозга человека. Полученные данные помогут углубить и расширить знания о том, каким образом нейроны накапливают повреждения в процессе старения, а также послужат основой для изучения патогенеза заболеваний, связанных с возрастом, в частности, таких патологических процессов как нейродегенерация. Исследование вносит существенный вклад в представления о возрастных изменениях митохондриальной и аутофагоцитарной активности в нервной ткани человека и лабораторных животных, что является необходимой основой для развития трансляционных технологий в области клинического изучения старения.

Практическая значимость исследования состоит в определении биомаркеров и предикторов старения клеточных элементов нервной ткани для разработки новых патологоанатомических маркеров, необходимых для дифференциальной диагностики возраст-ассоциированных заболеваний, а также для развития новых технологий профилактики и таргетной терапии возрастных нарушений.

Положения, выносимые на защиту

1. Показаны региональные и видовые различия патоморфологических сенильных изменений в сером и белом веществе головного мозга человека и лабораторных животных при сохранении общих типовых проявлений нейродегенерации.

2. Обнаружено снижение эффективности системы контроля качества митохондрий при старении, что объясняет выявленное уменьшение количества митохондрий в нейронах головного мозга на фоне компенсаторного увеличения объема сохранных органелл и повышения активности в них синтеза АТФ.
3. В нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных имеет место значительное повышение активности как шаперон-индуцируемой аутофагии, так и макроаутофагии, что свидетельствует о нарастании общей аутофагоцитарной активности и, учитывая корреляцию этих изменений с увеличением синтеза АТФ, может быть связано с оксидативным стрессом в этих клетках.
4. Корреляции между изученными иммуногистохимическими маркерами макроаутофагии, шаперон-индуцированной аутофагии, АТФ-синтазы и маркера системы контроля качества митохондрий свидетельствует о существовании связи между митохондриями и компонентами системы аутофагии, которая имеет сложный двунаправленный характер и может иметь компенсаторно-приспособительный характер для поддержания функционального пула нейронов при старении.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты научного исследования используются в материалах лекций и семинаров для ординаторов и аспирантов ФГБНУ «Научный центр неврологии», студентов ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова и практической деятельности патологоанатомического отделения ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов в данной научной работе обусловлена четкой постановкой цели; комплексным подходом к выполнению поставленных задач с использованием различных методов исследования, таких как морфометрия, гистохимия и иммуногистохимия, электронная микроскопия; использованием корректных методов статистического анализа.

Материалы диссертации доложены на XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и

молодых ученых (Москва, 17 марта 2022 г.), Нейрофоруме-2022 и V Национальном конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений (Москва, 23-24 июня 2022 г.), 34-м Европейском конгрессе патологов (Швейцария, Базель, 3-7 сентября 2022 г.), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 23-25 ноября 2022 г.), XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 16 марта 2023 г.), Нейрофоруме-2023 (Москва, 22-23 июня 2023 г.).

Работа рекомендована к защите на заседании межлабораторной научной конференции Института мозга ФБГНУ НЦН 12 апреля 2023 года.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором проведен анализ состояния научной проблемы по данным зарубежной и отечественной литературы. Автором сформулированы цель и задачи научной работы, положения, выносимые на защиту, разработан дизайн и сформированы выборки для каждой части исследования. Морфологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследования выполнены лично автором. Автором также проведена подготовка базы данных, ее обработка, анализ и интерпретация полученных результатов с написанием публикаций и подготовкой докладов по теме диссертационной работы.

Публикация результатов исследования

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 печатных работ, из них – 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 1 статья в зарубежном издании, входящем в Web of Science (Q1), 3 тезиса в сборниках российских конференций и 1 зарубежный тезис.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 124 страницах печатного текста, иллюстрирован 30 рисунками, 22 таблицами. Указатель литературы содержит 164 источника, из них 20 отечественных и 144 иностранных автора.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе лаборатории нейроморфологии Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии». В отделении патологической анатомии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №1 им. Н.И. Пирогова» проводился отбор аутопсийного материала в исследование.

Объектом исследования являлся головной мозг 30 умерших в возрасте 75 лет и старше и 10 – молодого возраста, умерших от внезапной сердечной смерти. Непосредственной причиной смерти пациентов старческого возраста явилась тромбоэмболия легочной артерии, возникшая вследствие тромбоза глубоких вен нижних конечностей или малого таза при наличии у пациентов перелома шейки бедренной кости. В медицинской документации всех умерших отсутствовали указания на выраженные когнитивные нарушения и очаговую неврологическую симптоматику. В исследование не включались умершие с асимптомным гемодинамически значимым атеростенозом церебральных артерий (сужение просвета артерий на 70% и более), а также с артериальной гипертонией 2-3 степени в анамнезе.

Также исследование проводили на 20 самцах беспородных мышей. Лабораторные животные массой 20-35 г содержались на базе вивария Института мозга ФГБНУ НЦН в стандартных условиях (12-часовой световой день, свободный доступ к пище и воде). Всего было выделено 2 группы, различные по возрасту: 10 животных в возрасте 2 месяцев и 10 – в возрасте 18 месяцев.

В гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, по методу Ниссля, по методу Ван-Гизона и конго красным проводилась оценка патологических изменений клеточных элементов нервной ткани, белого вещества и сосудов головного мозга, определялось количество нейронов компактной части черного вещества мозга человека, внутреннего пирамидного слоя (слой V) коры предцентральной извилины мозга человека и моторной коры мыши, скорлупы

человеческого мозга и стриатума мыши, CA1 пирамидного слоя гиппокампа человека и животных.

Иммуногистохимическое исследование было выполнено на парафиновых блоках с использованием антител, указанных в Таблице 1, при помощи иммуностейнера BenchMark XT (Ventana, Roche, Швейцария) с использованием стандартных протоколов и метода ручного титрования.

Таблица 1 – Характеристика использованных антител

Наименование антитела	Клон	Разведение	Функция маркера
HSP70	JG1	1:100	Белок теплового шока 70, участвующий в ШИА посредством связывания белков с мотивом KFERQ.
LAMP2A	–	1:750	Лизосомно-ассоциированный мембранный белок 2А, который способствует транслокации субстрата в просвет лизосомы при ШИА.
LC3B	EPR 1870 9	1:3000	Легкая цепь 3В белка, ассоциированного с микротрубочками 1А/1В. Белок входит в убиквитин – подобную систему конъюгации и участвует в элонгации фагофора и формировании мембраны аутофагосомы.
ATP5A1	7F9B G1	1:100	Альфа субъединица АТФ-синтазы (V ферментного комплекса внутренней мембраны митохондрий).
DJ-1	–	1:500	Редокс-чувствительный белок, обеспечивающий контроль митохондриального биогенеза и защиту митохондрий от повреждений при оксидативном стрессе.

Для иммуногистохимических маркеров был определен показатель интенсивности окрашивания, который оценивался в перикарионе 150 нейронов V

слоя коры предцентральной извилины, стриатума, пирамидного слоя гиппокампа с учетом наличия в цитоплазме липофусцина. Интенсивность окрашивания выражалась в условных единицах в градации зеленого цвета на 8-битном изображении при помощи программы LeicaQwin 2.7 (Leica Microsystems, Германия).

Для электронно-микроскопического исследования использовали фрагменты размером 0,5x0,1x0,1см, взятые из стриатума мышей. Полученные образцы обрабатывались по стандартной методике и заключались в эпоксидную смолу Epon. Ультратонкие срезы монтировали на медные сетки, контрастировали 1% спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-1011 (JEOL Ltd., Япония).

Для анализа и оценки полученных данных применяли следующие статистические методы: вычисление средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ) или медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1–Q3) в случае отсутствия нормального распределения. Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение групп выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни и критерия Краскела-Уоллиса, F-критерия Фишера и хи-квадрата Пирсона. Для анализа связи между признаками использовали коэффициент корреляции Пирсона и Спирмена. Статистически значимым считали значение $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Морфологические изменения структурных компонентов ткани головного мозга человека при старении

Между возрастными группами установлены статистически значимые различия в количестве нейронов исследованных областей головного мозга на единицу исследованной площади (Таблица 2). Согласно полученным результатам, у лиц старческого возраста по сравнению с лицами молодого возраста отмечено уменьшение количества нейронов в черном веществе на 24,8%,

скорлупе – на 48,9%, СА1 пирамидного слоя гиппокампа – на 44,5%, слое V коры предцентральной извилины – на 52,7%.

Таблица 2 – Количество нейронов различных структур головного мозга в исследуемых возрастных группах

Область головного мозга	Возраст (годы)	Кол-во нейронов на 2 мм ²		p
		Me/ M ± SD	Q ₁ – Q ₃ / 95% ДИ	
Черное вещество	35-44	346	328 – 442	< 0,001*
	75-94	260	186 – 306	
Скорлупа	35-44	145	129 – 193	< 0,001*
	75-94	74	58 – 90	
Пирамидный слой гиппокампа	35-44	698 ± 109	621 – 776	< 0,001*
	75-94	387 ± 116	343 – 430	
Кора предцентральной извилины	35-44	220	188 – 250	< 0,001*
	75-94	104	80 – 130	

* – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$); *используемые методы: U-критерий Манна-Уитни, t-критерий Стьюдента.*

В целом, в разных полях зрения срезов этих участков мозга у лиц старческого возраста обнаружено «выпадение» как единичных нейронов, так и целых групп клеток (от 3 до 6). На месте гибели нейронов обнаружены пролиферация и гипертрофия астроцитов, часто с формированием глиальных узелков, а также с явлениями сателлитоза и нейрофагии. При анализе отношения плотности расположения глиальных клеток и нейронов установлено, что величина этого отношения (глиальный индекс) в группе умерших в возрасте 35-44 лет была в 3,3 раза меньше по сравнению с группой умерших старческого возраста ($p < 0,001$).

При старении в разных областях мозга выявлена не только убыль нейронов, но и их белковая дистрофия – хроматолиз, сморщивание, гиперхроматоз,

формирование «клеток-теней» и липопигментная дистрофия (Рисунок 1).

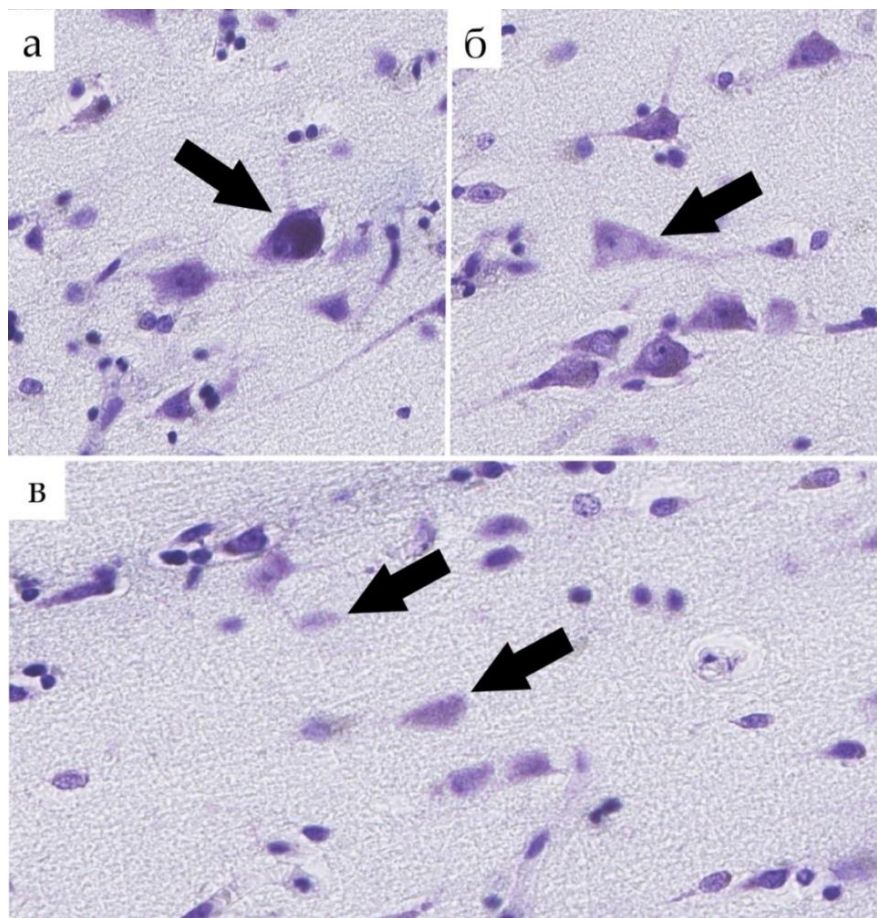


Рисунок 1– Изменения пирамидных нейронов коры предцентральной извилины при старении. а – гиперхроматоз цитоплазмы нейрона со смещением ядра к периферии клетки (стрелка); б – нейрон с хроматолизом (стрелка); в – «клетки-тени» (стрелки). Окраска по методу Ниссля. ×400.

При световой микроскопии в нейронах выявлялись белковые цитоплазматические и внутриядерные включения (тельца), характеризующиеся определенной формой, размером и тинкториальными свойствами [Григорьев И.П. и соавт., 2015; Krygowska-Wajs A., 2018]. Так, в 2 случаях группы лиц старческого возраста в цитоплазме нейронов черном веществе обнаружены округлые включения с плотным интенсивно окрашенным центром и более разреженной светлой аморфной периферической частью – тельца Леви (Рисунок 2,а). Кроме цитоплазматических включений, выявлены округлые эозинофильные включения, сопоставимые по размеру с ядрышком – тельца Маринеско, которые располагались в нигростриарных нейронах у 8 лиц старческого возраста (Рисунок 2,б)

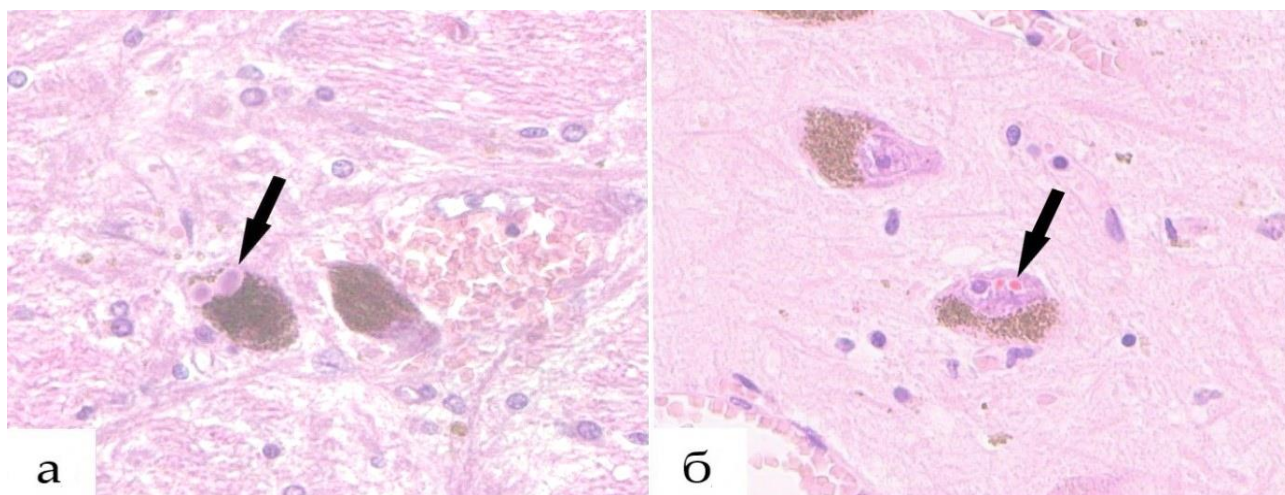


Рисунок 2 – Изменения нейронов черном веществе среднего мозга при старении. а – цитоплазматические тельца Леви с плотным интенсивно окрашенным центром и более разряженной светлой аморфной периферической частью (стрелка); б – два эозинофильных внутриядерных включения, расположенных около ядрышка (тельца Маринеско) (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Особое внимание обратил на себя такой специфический признак старения как сенильная бляшка, состоящая из центрально расположенного β -амилоида и измененных отростков нейронов и/или глиальных клеток, локализующихся по периферии амилоидных масс [Добрынина Л.А., 2008; Weller R. Et al., 2015]. Сенильные бляшки в небольшом количестве были обнаружены у 6 лиц старческого возраста (из 30) в коре прецентральной извилины и скорлупе (Рисунок 3).

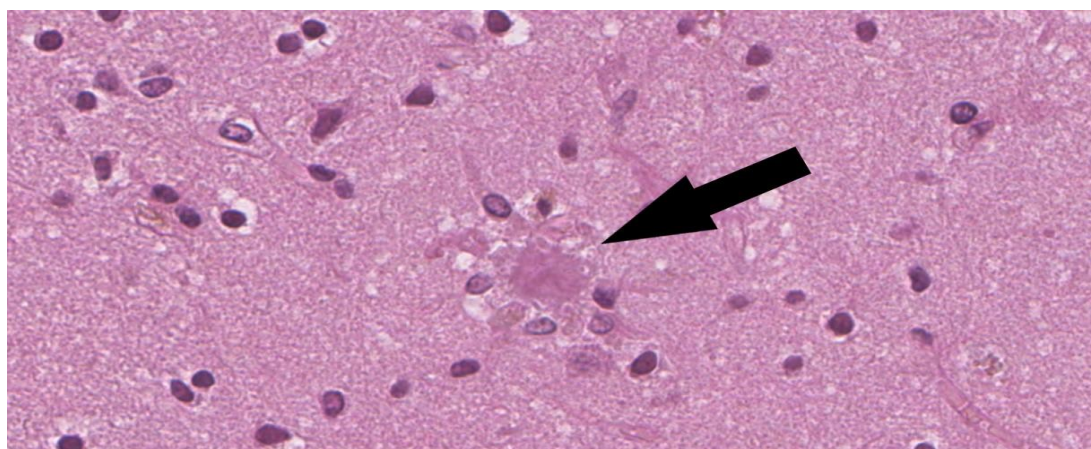


Рисунок 3 – Сенильная бляшка в коре прецентральной извилины (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

Важной особенностью старения головного мозга являлось наличие изменений в белом веществе в виде спонгиозного состояния ткани мозга и скопления в нем крахмалистых телец, которые представляют собой дегенеративную форму астроглии [Pisa D. et al., 2016]. При этом в белом веществе встречалась дилатация периваскулярных пространств с образованием криблур.

В элементах сосудистой системы головного мозга, включающих в себя интрацеребральные артерии и вены, а также сосуды микроциркуляторного русла были выявлены значительные изменения в группе лиц старческого возраста по сравнению с группой условного контроля. Так, в одних сосудах отмечался фиброз и утолщение стенок, в других – их истончение. Кроме того, в коре и стриатуме при старении наблюдалось формирование сосудистых конволютов (капиллярных и микрососудистых формаций с несколькими просветами), что свидетельствует о компенсаторной реакции в ответ на гипоксию, обусловленную нарушениями общей гемодинамики.

Венозное русло при старении подвергалось ремоделированию в виде утолщения стенок с облитерацией просвета сосудов. Вышеперечисленные изменения могут быть обозначены термином «венозный коллагеноз», являющийся отдельным типом церебральной микроангиопатии [Moody D.M. et al., 1995].

При изучении артериального русла при возрастной инволюции обращали на себя внимание очаги обызвествления, расположенные вокруг мелких артерий и артериол – периваскулярные петрификаты. Последние, наиболее вероятно, возникают в связи с развитием ишемии и гипоксии [Marchiori D.M. et al., 2014].

2. Морфологические изменения головного мозга экспериментальных животных при старении

В результате оценки толщины моторной коры установлено её уменьшение на 12,9% у мышей в возрасте 18 месяцев (старческий возраст) по сравнению с группой этих животных в возрасте 2 месяцев (молодой возраст) (Таблица 3).

Таблица 3 – Гистологические изменения в исследуемых возрастных группах

Показатель	Возраст (месяцы)	Полученные значения		p
		Me/ M \pm SD	Q ₁ – Q ₃ / 95% ДИ	
Толщина коры, мкм	2	620 \pm 57	560 – 679	0,012
	18	540 \pm 44	503 – 577	*
Количество нейронов моторной коры в 1 мм ²	2	247 \pm 32	213 – 280	0,783
	18	238 \pm 75	175 – 301	
Количество нейронов стриатума в 1 мм ²	2	333 \pm 32	299 – 366	0,104
	18	276 \pm 74	214 – 337	
Количество нейронов гиппокампа в 1 мм ²	2	730	619 – 780	0,010
	18	540	528 – 551	*
Глиальный индекс	2	0,86 \pm 0,09	1 – 2	<
	18	1,3 \pm 0,22	1 – 1	0,001 *

* – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$); используемые методы: *t*-критерий Стьюдента, *U*-критерий Манна-Уитни.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что атрофические процессы в мозге мышей старческого возраста характеризуются только тенденцией к сокращению количества нейронов слоя V моторной коры и стриатума, но, вместе с тем, значительной гибелью нервных клеток пирамидного слоя гиппокампа. При этом, не смотря на отсутствие значимого уменьшения нейронов моторной коры, в ней отмечается выраженная глиальная реакция.

3. Электронно-микроскопическое исследование нейронов головного мозга экспериментальных животных при старении

При анализе данных электронной микроскопии было обнаружено снижение количества митохондрий на 100 мкм² в 1,5 раза у лабораторных животных в возрасте 18 месяцев по сравнению с 2-месячными животными ($p < 0,001$). Кроме того, результаты проведенного нами морфометрического исследования

продемонстрировали снижение объемной доли митохондрий при старении, то есть соотношение суммарной площади всех митохондрий в клетке к площади цитоплазмы этой клетки снижалось с течением времени. Следовательно, сокращение количества митохондрий и снижение объемной доли митохондрий в клетке закономерно приводит к уменьшению площади хондриома в нейронах стареющего головного мозга мышей.

При этом обращало на себя внимание одновременное увеличение площади сохранных органелл с $0,216 \pm 0,17$ в 2 месяца до $0,232 \pm 0,18$ в 18 месяцев ($p=0,025$), а также преобладание сферических форм митохондрий у мышей за счет увеличения их округлости с $0,661 \pm 0,19$ в 2 месяца до $0,685 \pm 0,19$ в 18 месяцев ($p=0,001$).

Вышеописанные результаты дают основание предполагать, что изменение митохондриальной морфологии при уменьшении объемной доли митохондрий в клетке имеет компенсаторно-приспособительный характер на фоне более низкого уровня энергии в клетке при старении.

4. Иммуногистохимическое исследование маркеров митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга

4.1. Результаты иммуногистохимического исследования маркеров ШИА

Результаты проведенного нами иммуногистохимического исследования показали повышенный уровень интенсивности окрашивания двух маркеров ШИА – HSP70 и LAMP2A в нейронах всех исследованных зон головного мозга человека и лабораторных животных при старении.

При анализе интенсивности окрашивания маркера HSP70 в двух возрастных группах были выявлены статистически значимые различия во всех исследуемых зонах головного мозга человека (Рисунок 4). Интенсивность окрашивания вышеуказанного белка в нейронах коры предцентральной извилины у умерших старше 75 лет была в 2,3 раза выше по сравнению с образцами умерших в молодом возрасте ($p=0,01$). Аналогичная тенденция наблюдалась в нейронах стриатума и пирамидного слоя гиппокампа. Так, в образцах, полученных от лиц старческого возраста, при сравнении с образцами от лиц 35-44 лет уровень

интенсивности окрашивания HSP70 был в 2,1 ($p=0,021$) и 2 раза выше ($p=0,036$), соответственно.

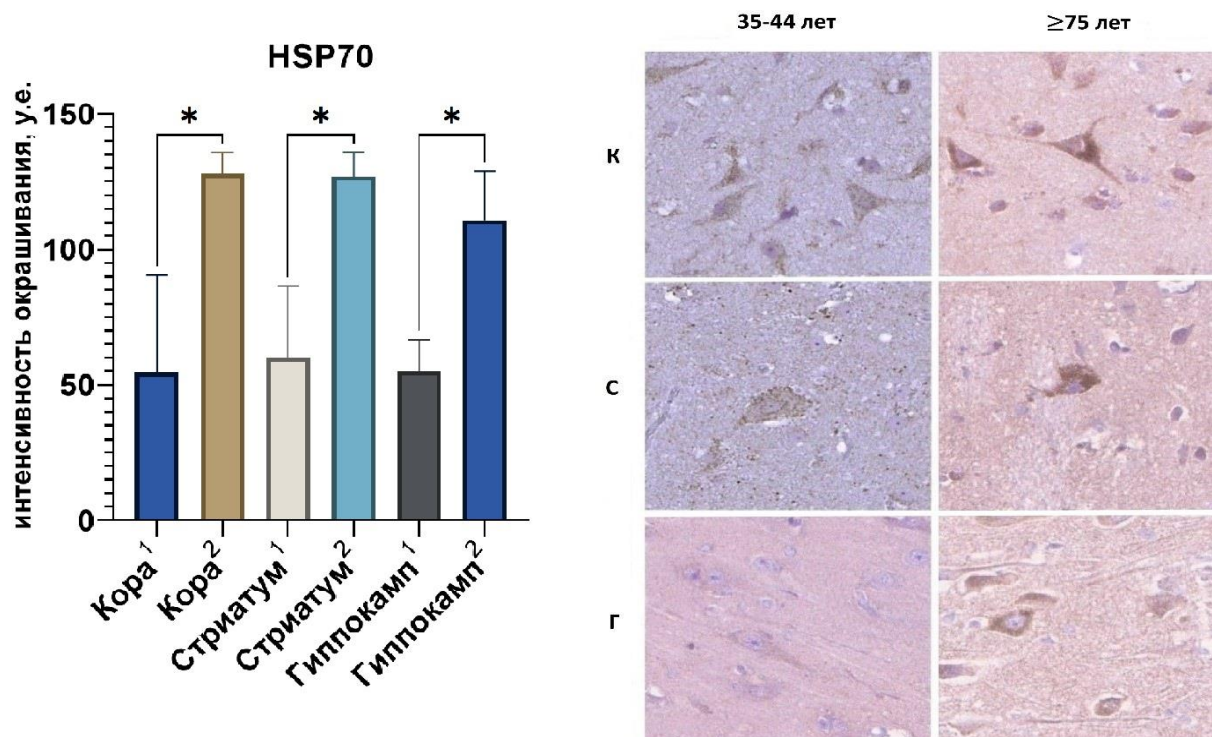


Рисунок 4 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к HSP70. ¹ группа 35 – 44 лет, ² группа старше 75 лет; К – нейроны коры предцентральной извилины, С – крупные нейроны стриатума; Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; * – $p < 0,05$. $\times 400$.

При изучении интенсивности окрашивания маркера HSP70 в двух возрастных группах лабораторных животных были выявлены статистически значимые различия во всех исследуемых зонах головного мозга. Интенсивность окрашивания вышеуказанного белка в нейронах двигательной коры лабораторных животных в возрасте 18 месяцев была на 27,3% выше по сравнению с образцами в возрасте 2 месяцев ($p=0,008$). Аналогичная тенденция наблюдалась в нейронах базальных ядер и пирамидного слоя гиппокампа. Так, в образцах, полученных от мышей в возрасте 18 месяцев, при сравнении с образцами мышей в возрасте 2 месяцев уровень интенсивности окрашивания HSP70 был на 22,9% ($p=0,2$) и на 25,1% выше ($p=0,02$), соответственно.

При изучении маркера LAMP2A нами также были обнаружены статистически значимые различия во всех исследуемых зонах головного мозга в

зависимости от возраста (Рисунок 5). При анализе показателей интенсивности окрашивания данного белка в нейронах коры предцентральной извилины было выявлено, что величина последней у умерших старше 75 лет была в 1,6 раза больше по сравнению с лицами молодого возраста ($p=0,017$); в нейронах полосатого тела и нейронах пирамидного слоя гиппокампа – в 1,8 ($p=0,006$) и 1,5 ($p=0,025$) раза больше по сравнению со значениями, полученными в группе условного контроля, соответственно.

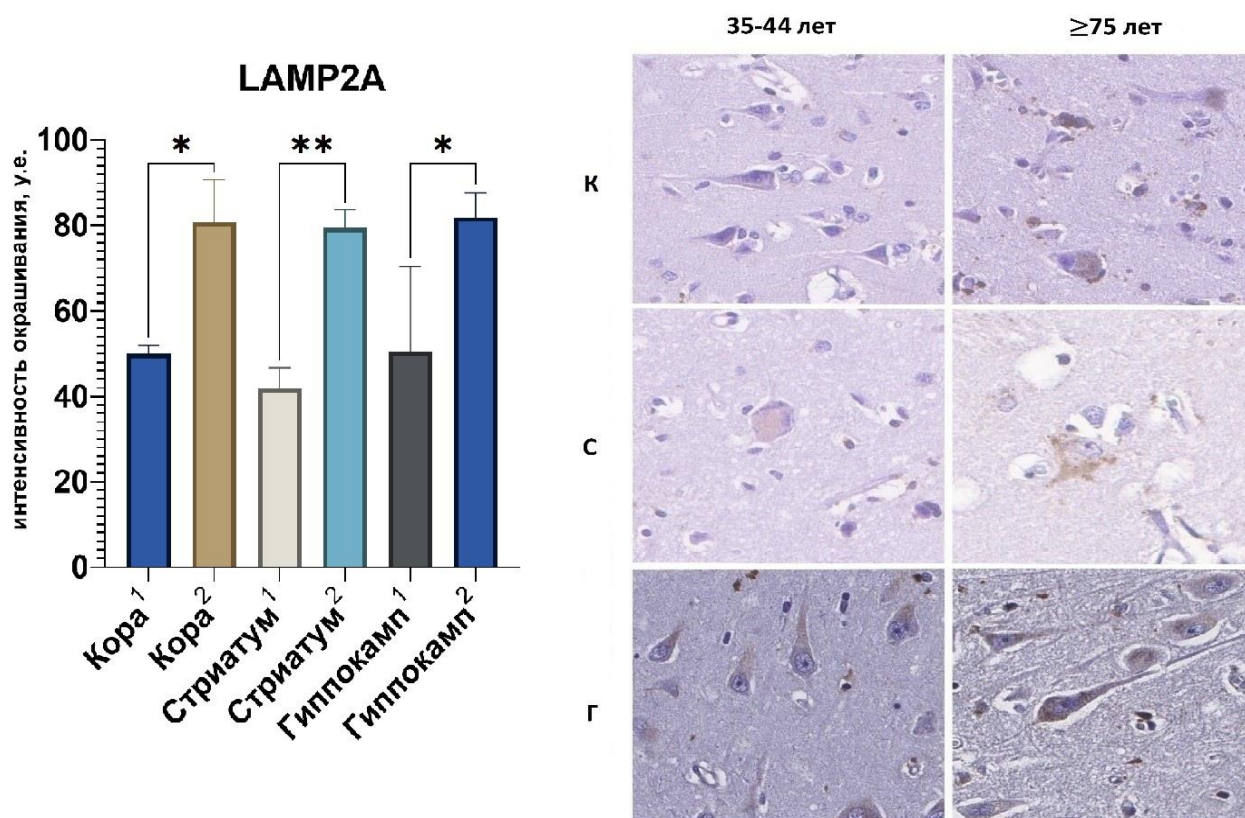


Рисунок 5 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к LAMP2A. ¹ группа 35 – 44 лет, ² группа старше 75 лет; К – нейроны коры предцентральной извилины, С – крупные нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$. $\times 400$.

При анализе показателей интенсивности окрашивания данного белка в нейронах коры лабораторных животных было обнаружено, что величина последней у мышей в возрасте 18 месяцев была на 25,9% больше по сравнению с условным контролем ($p=0,02$). Уровень интенсивности окрашивания белка LAMP2A в нейронах базальных ядер и нейронах пирамидного слоя гиппокампа в образцах, полученных от мышей в возрасте 18 месяцев, был на 26,5% ($p=0,03$) и

20,9% ($p=0,2$) больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей молодого возраста, соответственно.

Выявленные нами при иммуногистохимическом исследовании повышенные уровни маркеров ШИА в нейронах головного мозга при старении могут быть обусловлены тем, что ШИА является одним из регуляторов клеточного гомеостаза, ввиду чего уровень активности его компонентов может быть стресс-индуцирован в ответ на повышенное количество конформационно дефектных белков и активных форм кислорода, накапливающихся с течением времени.

4.2. *Результаты иммуногистохимического исследования маркера макроаутофагии*

В нашей работе при анализе данных было обнаружено, что при старении показатели интенсивности окрашивания белка LC3B в нейронах различных зон головного мозга человека и лабораторных животных увеличиваются.

При анализе маркера макроаутофагии убиквитин-подобного белка LC3B были выявлены статистически значимые различия показателя интенсивности окрашивания во всех исследуемых зонах головного мозга человека (Рисунок 6). Величина последней в нейронах коры предцентральной извилины была выше в 1,3 раза в группе лиц пожилого возраста по сравнению с группой условного контроля ($p=0,009$). Идентичные результаты были получены и для нейронов полосатого тела ($p=0,025$) и гиппокампа ($p=0,002$).

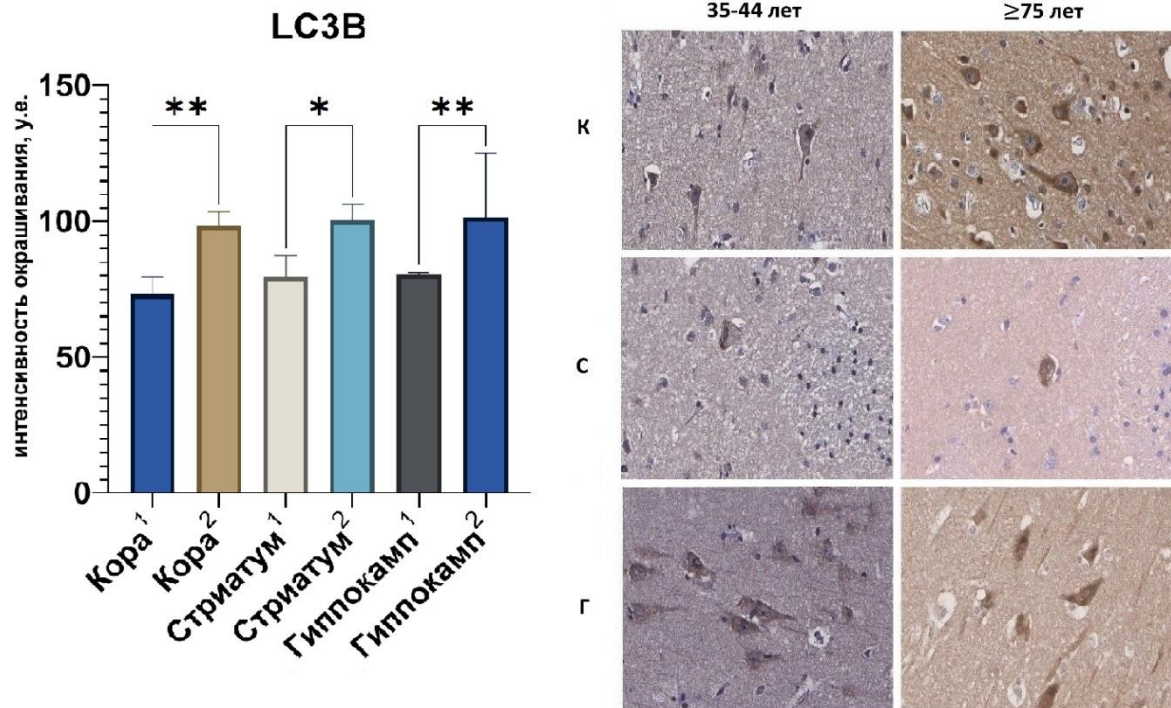


Рисунок 6 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к LC3B. ¹ группа 35 – 44 лет, ² группа старше 75 лет; К – нейроны коры предцентральной извилины, С – крупные нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$. $\times 400$.

При анализе маркера макроаутофагии убиквитин-подобного белка LC3B во всех исследуемых зонах головного мозга мышей нами также были обнаружены статистически значимые различия вышеописанного показателя. Величина интенсивности окрашивания LC3B в нейронах двигательной коры была выше на 25,8% в группе мышей в возрасте 18 месяцев по сравнению с группой в возрасте 2 месяцев ($p=0,01$). Идентичные результаты были получены и для нейронов в двух других исследуемых зонах. Уровень интенсивности окрашивания белка LC3B в нейронах базальных ядер и нейронах пирамидного слоя гиппокампа в образцах, полученных от мышей в возрасте 18 месяцев, был на 25,8% ($p=0,01$) и 29,1% ($p=0,02$) больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей в возрасте 2 месяцев, соответственно.

Известно, что использованный нами маркер для определения уровня макроаутофагии LC3B расположен на внутреннем и внешнем слое мембраны фагофора. Во время созревания аутофагосомы он удаляется с наружной поверхности, но остается на ее внутренней поверхности [Loeffler D.A. , 2019].

Следовательно, уровень LC3В с относительной долей вероятности может коррелировать с количеством аутофагосом. С другой стороны, увеличение уровня LC3В может быть связано не только с активацией макроаутофагии, но и со снижением активности процесса слияния аутофагосомы и лизосомы.

4.3. Результаты иммуногистохимического исследования маркера АТФ-синтазы

При изучении показателя интенсивности окрашивания маркера АТР5А1 нами также были обнаружены статистически значимые различия в пятом слое коры предцентральной извилины и пирамидном слое гиппокампа в зависимости от возраста (Рисунок 7). При анализе показателей интенсивности окрашивания данного белка в вышеперечисленных зонах было выявлено, что величина последней у умерших старческого возраста была в 1,4 раза больше по сравнению с условным контролем ($p=0,03$ и $p=0,01$, соответственно). Исследуемый показатель белка АТР5А1 в нейронах полосатого тела в образцах, полученных от лиц старческого возраста, был в 1,2 раза больше по сравнению со значениями, полученными в группе лиц молодого возраста, однако этот результат не был статистически значимым ($p=0,32$).

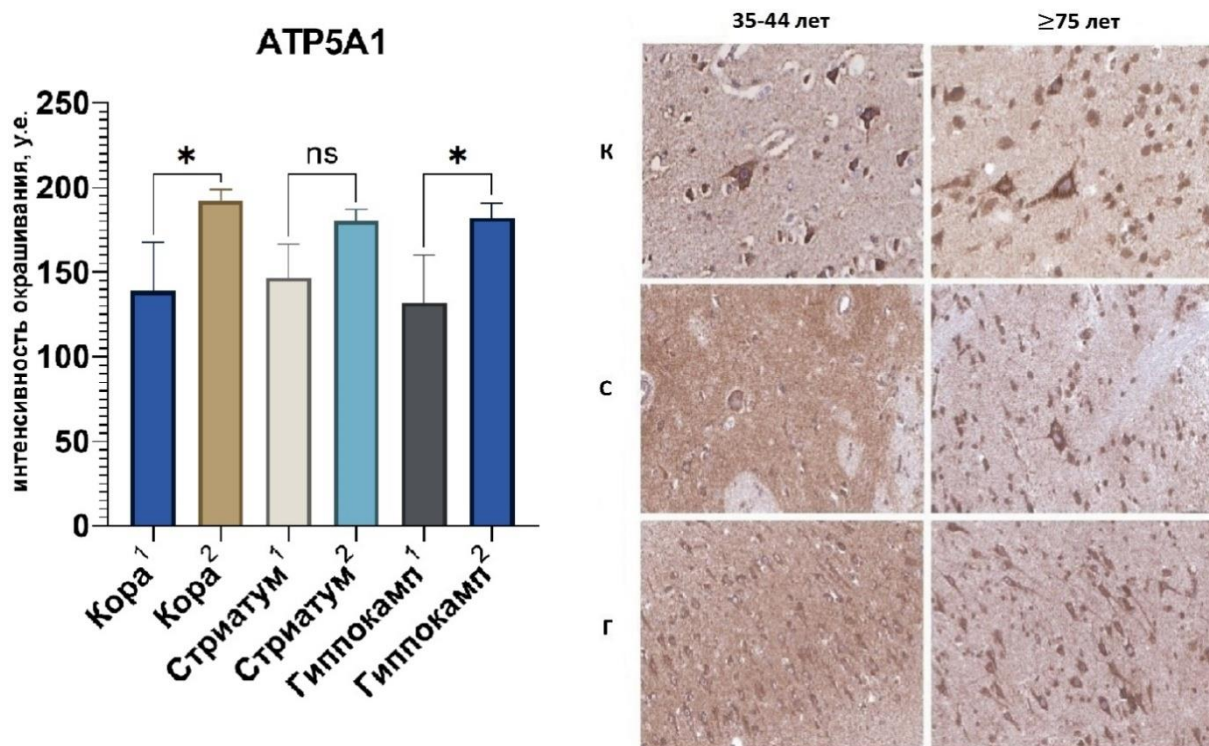


Рисунок 7 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к АТР5А1. ¹ группа 35 – 44 лет, ² группа старше 75 лет; К – нейроны коры

предцентральной извилины, С – крупные нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; ns – $p \geq 0,05$, * – $p < 0,05$. $\times 400$ (К,С), $\times 200$ (Г).

При анализе маркера АТФ-синтазы во всех исследуемых зонах головного мозга мышей статистически значимые различия обнаружены не были. Однако в группе лабораторных животных в возрасте 18 месяцев отмечалась тенденция к увеличению значений интенсивности окрашивания АТР5А1. Величина последней в нейронах двигательной коры была выше на 5% в группе мышей в возрасте 18 месяцев по сравнению с группой в возрасте 2 месяцев ($p=0,99$). Идентичные результаты были получены и для нейронов в двух других исследуемых зонах. Уровень интенсивности окрашивания белка внутренней мембраны митохондрий в нейронах стриатума и нейронах пирамидного слоя гиппокампа в образцах, полученных от мышей в возрасте 18 месяцев, был на 10,2% ($p=0,83$) и 20,3% ($p=0,13$) больше по сравнению со значениями, полученными в группе молодых мышей, соответственно.

Повышенный уровень маркера V комплекса внутренней мембраны митохондрий АТР5А1 в нейронах стареющего головного мозга человека во всех исследованных зонах, вероятно, отражает увеличение размеров вышеупомянутых органелл и количества их крист. Подобные изменения могут иметь компенсаторный характер для интенсификации энергообмена [Лукьянова Л.Д., 2019]. В то же время, в образцах старых мышей наблюдалась лишь тенденция к увеличению показателя АТР5А1 по сравнению с молодыми животными, но эти различия не были статистически значимы. Данные результаты, возможно, обусловлены отсутствием у лабораторных животных признаков ангиопатии и как следствие, гипоксические изменения были выражены в меньшей степени.

4.4. Результаты иммуногистохимического исследования маркера контроля качества митохондрий

При исследовании интенсивности окрашивания маркера DJ-1 между двумя возрастными группами статистически значимых различий нами обнаружено не было. Однако во всех изученных зонах в группе лиц старческого возраста отмечалась тенденция к снижению значений DJ-1. Так, при старении в нейронах

коры предцентральной извилины интенсивность окрашивания вышеуказанного белка была на 26% ($p=0,17$), в полосатого тела – на 14% ($p=0,78$), в пирамидном слое гиппокампа – на 12% ($p=0,99$) ниже по сравнению с группой условного контроля.

В свою очередь, при анализе показателей интенсивности окрашивания белка DJ-1 данного в двух возрастных группах лабораторных животных были обнаружены статистически значимые различия (Рисунок 8). Уровень интенсивности окрашивания вышеуказанного маркера в нейронах коры головного мозга, полученных от лабораторных животных в возрасте 2 месяцев, был на 27,8% больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей 18 месяцев ($p=0,02$). Показатели интенсивности окрашивания DJ-1 в нейронах базальных ядер и пирамидного слоя гиппокампа в образцах, полученных от молодых мышей, был на 38,4% ($p=0,03$) и 23,9% ($p=0,02$) больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей в возрасте 18 месяцев, соответственно.

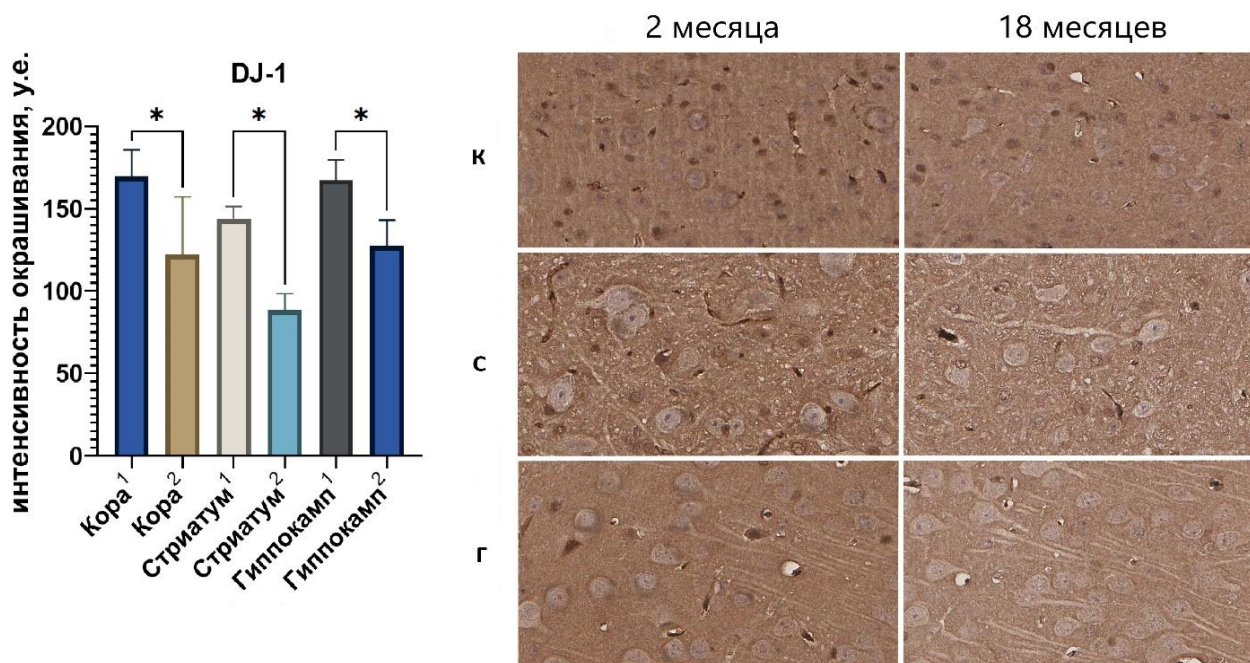


Рисунок 8– Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к DJ-1. ¹ – группа 2 месяца, ² – группа 18 месяцев; К – нейроны моторной коры, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; * – $p < 0,05$. $\times 400$

Таким образом, снижение при старении интенсивности окрашивания белка системы «контроля качества» митохондрий DJ-1 в сочетании с обратной связью с

маркерами HSP70 и LAMP2A свидетельствует о снижении (вероятно, компенсаторно-приспособительном в связи с уменьшением общего количества митохондрий) уровня элиминации дефектных митохондрий в клетке и может объясняться усиленной утилизацией DJ-1 за счет ШИА. Эти результаты не только указывают на развитие окислительного стресса в нейронах головного мозга с течением времени, но и подтверждают важную роль ШИА в защите морфофункционального состояния митохондрий.

4.5. Результаты корреляционного анализа маркеров ШИА

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и HSP70 в нейронах всех исследованных структур головного мозга была установлена прямая корреляционная связь (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи маркеров HSP70 и LAMP2A в нейронах головного мозга человека

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	ρ/ r_{xy}	Теснота связи по шкале Чеддока	p
HSP70 – LAMP2A (кора)	0,587	Заметная	< 0,001*
HSP70 – LAMP2A (стриатум)	0,727	Высокая	< 0,001*
HSP70 – LAMP2A (гиппокамп)	0,502	Заметная	0,006*

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и HSP70, обнаруженных в нейронах всех исследованных зон головного мозга мышей, были получены аналогичные результаты (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи маркеров HSP70 и LAMP2A в нейронах головного мозга лабораторных животных

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	ρ/ r_{xy}	Теснота связи по шкале Чеддока	p
HSP70 – LAMP2A (кора)	0,859	Высокая	0,001*
HSP70 – LAMP2A (стриатум)	0,808	Высокая	0,015*
HSP70 – LAMP2A (гиппокамп)	0,775	Высокая	0,024*

Вероятно, обнаруженная в нашем исследовании прямая корреляция связана с тем, что при ШИА вслед за активацией комплекса шаперонов происходит мультимеризация LAMP2A [Juste Y.R., 2019]. Этот механизм позволяет образовать каналы для перемещения в просвет лизосомы субстрат, который затем подвергается аутофагической деградации [Juste Y.R., 2019].

4.6. Результаты корреляционного анализа маркеров двух типов аутофагии

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания HSP70 и LC3B в нейронах коры и гиппокампа головного мозга человека, была установлена прямая корреляция ($p < 0,001$, $r=0,712$ и $r=0,820$, соответственно). Аналогичные результаты были получены между значениями интенсивности окрашивания вышеуказанных показателей, выявленными в нейронах стриатума ($p < 0,001$, $r=0,616$). При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и LC3B в нейронах коры, стриатума и гиппокампа также была установлена прямая взаимосвязь ($p < 0,001$, $r=0,744$, $r=0,682$ и $r=0,613$, соответственно).

В группах лабораторных животных результаты корреляционного анализа продемонстрировали прямую зависимость между значениями интенсивности окрашивания маркеров HSP70 и LC3B в нейронах коры ($p < 0,001$, $r=0,848$). При оценке связи показателей интенсивности окрашивания HSP70 и LC3B в нейронах стриатума и гиппокампа, также была установлена прямая связь ($p < 0,05$, $r=0,563$ и $r=0,667$, соответственно).

Кроме того, при изучении взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и LC3B в нейронах коры, стриатума и гиппокампа, также была установлена прямая корреляция ($p < 0,05$, $r=0,839$, $r=0,784$ и $r=0,782$, соответственно).

Прямая связь между маркерами ШИА и макроаутофагии, возможно, связана с вышеупомянутой сложностью интерпретации результатов LC3B, повышенный уровень которого может отражать как повышение активности макроаутофагии за счет увеличения количества аутофагосом, так и ее снижение за счет нарушения докинга аутофагосомы с лизосомой. Кроме того, полученные результаты положительной связи между HSP70, LAMP2A и LC3B могут быть обусловлены

более высокими показателями базального уровня всех вышеперечисленных тканевых маркеров в образцах лиц старческого возраста и старых лабораторных животных по сравнению с условным контролем.

4.7. Результаты корреляционного анализа маркеров ШИА и контроля качества митохондрий DJ-1

Для уточнения возможных связей между показателями интенсивности окрашивания маркеров ШИА HSP70 и LAMP2A и маркером контроля качества митохондрий DJ-1 был проведен корреляционный анализ. Обнаружена отрицательная корреляция в нейронах коры, стриатума и гиппокампа головного мозга человека между маркерами DJ-1 и HSP70, а также DJ-1 и LAMP2A (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи маркеров HSP70, LAMP2A и DJ-1 в нейронах головного мозга человека

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	ρ/ r_{xy}	Теснота связи по шкале Чеддока	p
HSP70 – DJ-1 (кора)	-0,576	Заметная	0,012*
HSP70 – DJ-1(стриатум)	-0,695	Заметная	0,001*
HSP70 – DJ-1 (гиппокамп)	-0,189	Слабая	0,326
LAMP2A – DJ-1 (кора)	-0,404	Умеренная	0,096
LAMP2A – DJ-1(стриатум)	-0,481	Умеренная	0,008*
LAMP2A – DJ-1(гиппокамп)	-0,436	Умеренная	0,018*

В группах лабораторных животных результаты корреляционного анализа продемонстрировали обратную связь между значениями интенсивности окрашивания маркеров DJ-1 и HSP70 в нейронах стриатума и гиппокампа ($p < 0,001$, $r = -0,846$ и $r = -0,867$, соответственно). При оценке связи показателей интенсивности окрашивания DJ-1 и HSP70, обнаруженных в нейронах стриатума и гиппокампа, также была установлена обратная зависимость ($p < 0,05$, $r = 0,-592$). Аналогичная обратная связь обнаружена и при корреляционном анализе между DJ-1 и LAMP2A.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что ШИА утилизирует дисфункциональный поврежденный окислительными процессами белок DJ-1 и опосредованно участвует в поддержании митохондриального гомеостаза при старении нейронов головного мозга человека. Активность ШИА является необходимой для защиты морфологии и функции митохондрий при стрессе, что указывает на прямую регуляторную связь между аутофагией и функцией митохондрий.

4.8. *Результаты корреляционного анализа маркеров ШИА и маркера АТФ-синтазы*

Полученные результаты корреляционного анализа маркеров ШИА HSP70 и LAMP2A и маркера АТФ-синтазы АТP5A1 показали положительную прямую связь между ними в образцах головного мозга человека.

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания HSP70 и АТP5A1 в нейронах коры и стриатума, была установлена прямая корреляция ($p < 0,05$, $r = 0,575$ и $r = 0,534$, соответственно). Корреляционный анализ также продемонстрировал прямую взаимосвязь между значениями интенсивности окрашивания HSP70 и АТP5A1, выявленными в нейронах гиппокампа ($p < 0,001$, $r = 0,847$).

Кроме того, в нейронах коры и гиппокампа была установлена заметная прямая связь между показателями интенсивности окрашивания LAMP2A и АТP5A1 ($p < 0,001$, $r = 0,647$ и $r = 0,662$, соответственно). При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и АТP5A1 в нейронах стриатума, была установлена умеренная прямая связь ($p < 0,05$, $r = 0,417$).

В образцах лабораторных животных между HSP70 и АТP5A1 нами была выявлена слабая связь в нейронах коры ($p = 0,537$, $\rho = 0,209$) и прямая связь (на уровне статистической тенденции) в нейронах стриатума ($p = 0,092$, $\rho = 0,532$). Достоверной корреляции между HSP70 и АТP5A1 в нейронах гиппокампа, а также между LAMP2A и АТP5A1 в образцах головного мозга мышей обнаружено не было.

Полученная нами взаимосвязь между HSP70 и маркером АТФ-синтазы, вероятно, объясняется тем, что для коррекции неправильного фолдинга белков при помощи системы шаперонов используются молекулы АТФ, достаточное количество которых может быть обеспечено повышенными уровнями АТФ-синтазы [Hubert V. et al., 2022].

4.9. *Результаты корреляционного анализа маркера макроаутофагии и маркера АТФ-синтазы*

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LC3В и маркером АТФ-синтазы АТР5А1 в нейронах коры и гиппокампа, была установлена заметная прямая связь ($p < 0,001$, $r = 0,649$ и $r = 0,805$, соответственно). В нейронах стриатума интенсивность окрашивания маркера АТФ-синтазы имеет тенденцию к прямой зависимости маркера макроаутофагии ($p < 0,215$, $r = 0,238$).

В группах лабораторных животных результаты корреляционного анализа продемонстрировали умеренную прямую связь между значениями интенсивности окрашивания маркеров LC3В и маркером АТФ-синтазы АТР5А1 в нейронах коры и гиппокампа ($p \geq 0,05$, $\rho = 0,336$ и $\rho = 0,489$, соответственно). В нейронах стриатума была установлена полученные результаты корреляционного анализа не были статистически значимы ($p \geq 0,05$, $\rho = 0,188$).

Выявленная прямая взаимосвязь между маркерами макроаутофагии и АТФ-синтазы, вероятно, обусловлена определенным каскадом реакций, приводящих к слиянию митохондрий при стимуляции макроаутофагии. Следовательно, обнаруженная при корреляционном анализе прямая связь между одним из основных белков макроаутофагии LC3В и маркером АТФ-синтазы может указывать на то, что при старении клетки пытаются повысить эффективность преобразования энергии посредством увеличения размеров митохондрий, которые демонстрируют более высокие уровни димеров АТФ-синтазы и повышение количества молекул АТФ.

Можно с большой долей вероятности предположить, что выявленные в нашем исследовании изменения количественных иммуногистохимических параметров и изменение морфологии митохондрий нейронов стареющего

головного мозга имеют компенсаторно-приспособительный характер в условиях энергетической депривации и оксидативного стресса.

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенного комплексного морфологического и морфометрического исследования подтверждают, что при старении головного мозга человека происходит утрата крупных нейронов в таких структурах как кора предцентральной извилины, гиппокамп, базальные ядра и черная субстанция, с последующим развитием астроцитарного глиоза. Макроскопически отмечается снижение массы головного мозга и истончение коры полушарий большого мозга.
2. Микроскопически выявляются изменения ткани мозга, свойственные старению и феноменологически сходные с нейродегенеративными процессами позднего возраста, отличаясь от последних преимущественно количественно: статистически значимое уменьшение количества нейронов в результате их гибели в указанных областях; липопигментная дистрофия сохранившихся крупных нейронов; цитоплазматические включения (тельца Леви) и внутриядерные включения (тельца Маринеско) в отдельных нигростриарных нейронах; немногочисленные сенильные бляшки в коре мозга и базальных ядрах; спонгиозные изменения белого вещества с деструкцией миелиновых волокон и формированием резко расширенных периваскулярных пространств (криблур); изменения сосудов микроциркуляторного русла головного мозга (капиллярофиброз и артериолосклероз) с запустеванием их просветов, истончение стенок мелких артерий и вен с утратой их тонуса, периваскулярные петрификаты, образование конволютов, утолщение и склероз стенок перивентрикулярных вен (венозный коллагеноз), а также отложение в ткани мозга крахмалистых телец, характерных для патологической атрофии мозга.
3. В головном мозге стареющих мышей отмечена значительная гибель нейронов преимущественно в пирамидном слое коры гиппокампа при относительно незначительном сокращении их количества в V слое моторной

коры и стриатуме на фоне глиальной реакции. При этом морфологических изменений ткани мозга, характерных для нейродегенеративных процессов у человека, не выявлено, что, возможно, обусловлено дополнительным влиянием на стареющий головной мозг человека изменений, связанных с гораздо большей продолжительностью жизни и обусловленных, в том числе, коморбидными сосудистыми заболеваниями (артериальной гипертонией и атеросклерозом).

4. При электронно-микроскопическом исследовании нейронов головного мозга стареющих лабораторных животных выявлено снижение количества митохондрий по сравнению с таковым у молодых животных, при этом отмечено увеличение объема сохранных органелл (вероятно, компенсаторное), приобретающих сферическую форму.
5. На основании комплексного иммуногистохимического исследования с использованием маркера системы контроля качества митохондрий DJ-1, маркера АТФ-синтазы, а также маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70 и LAMP2A установлено, что в сохранных нейронах исследованных областей головного мозга человека и экспериментальных животных при старении имеет место достоверное уменьшение интенсивности окрашивания иммуногистохимического маркера DJ-1, что, в сочетании с обнаруженным достоверным увеличением интенсивности окрашивания маркера АТФ-синтазы и шаперон-индуцированной аутофагии, свидетельствует о снижении активности системы контроля качества митохондрий и развитии оксидативного стресса.
6. В нейронах исследованных областей головного мозга человека и лабораторных животных при старении выявлено повышение уровня интенсивности окрашивания маркера макроаутофагии – белка LC3B, расположенного на поверхности аутофагосом, что может быть как результатом увеличения количества аутофагосом, так и следствием нарушенной утилизации вышеописанных органелл лизосомами.

7. В результате комплексного изучения маркеров аутофагии в нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных установлено, что при старении преимущественным способом элиминации дисфункциональных белков, которые накапливаются с течением времени, является шаперон-индуцированная аутофагия, что проявляется в достоверном увеличении интенсивности окрашивания иммуногистохимических маркеров HSP70 и LAMP2A , а также в их более высоких средних значениях по сравнению со средними показателями маркера макроаутофагии.
8. При изучении взаимосвязи митохондриальных маркеров и маркеров различных типов аутофагии в нейронах головного мозга человека выявлены следующие достоверные корреляции: обратная связь между интенсивностью окрашивания маркеров шаперон-индуцированной аутофагии и маркера системы контроля качества митохондрий DJ-1, а также прямая корреляция между интенсивностью окрашивания маркера АТФ-синтазы АТР5А1 с одной стороны и маркеров макроаутофагии и шаперон-индуцируемой аутофагии с другой, что, очевидно, является проявлением синхронизированного участия митохондрий и системы аутофагоцитоза в адаптации нейрона к возрастным изменениям.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Magnaeva (Badlaeva), A.S. Impaired Mitophagy in Neurons and Glial Cells during Aging and Age-Related Disorders / V.S. Sukhorukov, D.N. Voronkov, T.I. Baranich [et al.] // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22 – N. 19. – P. 10251. – DOI 10.3390/ijms221910251.
2. Магнаева (Бадлаева), А.С. Морфологическая характеристика нервной ткани головного мозга при старении / А.С. Магнаева, Т.С. Гулевская, П.Л. Ануфриев [и др.] // Архив патологии. – 2022. – Т. 84 – №4. – С. 20-28. – DOI 10.17116/patol20228404120.
3. Magnaeva (Badlaeva), A.S. Brain Neurons during Physiological Aging: Morphological Features, Autophagic and Mitochondrial Contribution / V.S. Sukhorukov, A.S. Magnaeva, T.I. Baranich [et al.] // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23 – N. 18. – P. 10695. – DOI 10.3390/ijms231810695.
4. Магнаева (Бадлаева), А.С. Иммуногистохимическая оценка шаперон-индуцируемой аутофагии в различных отделах головного мозга человека при старении / А.С. Магнаева, Т.И. Баранич, Д.Н. Воронков [и др.] // Морфологические ведомости. – 2023. – Т. 31. – №1. – С. 27-33. – DOI 10.20340/mv-mn.2023.31(1).724.
5. Магнаева (Бадлаева), А.С. Иммуногистохимический анализ маркеров шаперона HSP70 и аутофагии в нейронах головного мозга при старении / А.А. Гофман, Т.И. Баранич, А.С. Магнаева // Сборник тезисов XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – М.: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 2022. – С. 131.
6. Магнаева (Бадлаева), А.С. Иммуногистохимическая оценка митохондриальных и аутофагоцитарных маркеров при старении головного мозга человека / А.С. Магнаева, Т.И. Баранич, А.А. Гофман [и др.] // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17. – №3. – С. 140.

7. Magnaeva (Badlaeva), A.S. Expression of LAMP2A, LC3B, and HSP70 autophagy biomarkers in different brain structures during aging / A.S. Magnaeva, T.I. Baranich, A.A. Gofman [et al.] // *Virchows Arch.* – Springer, 2022. – N. 481 (Suppl 1) – P. 161
8. Бадлаева, А.С. Новые доказательства взаимодействия митохондриального и аутофагоцитозного механизмов адаптации нейронов при гипоксии / А.А. Гофман, А.С. Бадлаева // Сборник тезисов XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – М.: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 2023. – С. 130.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ШИА – шаперон-индуцированная аутофагия

АТР5А1 – альфа субъединица АТФ-синтазы

DJ-1 – белок 7 болезни Паркинсона

HSP70 – белок теплового шока 70

LAMP2A – лизосомно-ассоциированный мембранный белок 2A

LC3B – легкая цепь 3B белка, ассоциированного с микротрубочками 1A/1B