

На правах рукописи

**КУРСКАЯ Оксана Васильевна**

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИДАНА  
НА УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНУЮ ПАМЯТЬ И  
СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
ГИППОКАМПА КРЫС**

**03.00.13 – «Физиология»**

**03.00.25 – «Цитология, гистология, клеточная биология»**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена на кафедре высшей нервной деятельности Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (заведующий кафедрой – доктор биологических наук, профессор В.В. Шульговский) и в лаборатории функциональной нейроморфологии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор института – доктор биологических наук, профессор П.М. Балабан).

**Научные руководители**

доктор биологических наук, профессор  
**Н.А. Тушмалова**

доктор биологических наук  
**Е.В. Лосева**

**Официальные оппоненты**

доктор биологических наук, профессор  
**С.А. Чепурнов**

доктор медицинских наук, профессор  
**Т.А. Воронина**

**Ведущая организация**

ГОУ ВПО Российский Государственный  
Медицинский Университет Росздрава

Защита состоится 26 февраля 2007 г. в 15 часов 30 минут на заседании Диссертационного совета Д 501.001.93 при Биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские Горы, дом 1, строение 12, Биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 25 января 2007 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Б.А. Умарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Известно, что многочисленные клинические синдромы, а также процессы старения, часто сопровождаются нарушениями памяти. Поэтому коррекция памяти является актуальной задачей при лечении этих патологий. Традиционным и эффективным подходом к управлению механизмами памяти и обучения является использование различных психофармакологических соединений и биологически активных веществ (Бородкин, Зайцев, 1982; Izquierdo, 1984; Вальдман, 1989; Воронина, 1989; Виссасузо, Терри, 2000; Воронина, Серединин, 2001; Воронина, 2001 и др.).

В течение ряда лет на Кафедре высшей нервной деятельности в лаборатории эволюции механизмов памяти МГУ им. М.В. Ломоносова проводятся исследования по изучению влияния различных биологически активных соединений на условнорефлекторную память у крыс (Прагина и др., 1990; Тушмалова и др., 1999; Прагина и др., 2003).

В основе этих исследований лежит синтез двух общебиологических подходов: эволюционно-физиологического и молекулярно-биологического (Тушмалова, 1965-1994; Тушмалова и др., 1965-1994; Тушмалова, Маракуева, 1986; Ванюшин и др., 1973, 1998; Ашапкин и др., 1981). В результате этих комплексных исследований у животных, независимо от уровня структурной организации их нервной системы, было показано, что формирование памятного следа сопровождается однонаправленными внутриклеточными изменениями ультраструктур, свидетельствующими об активации белково-нуклеинового синтеза. К таким изменениям были отнесены агрегация рибосом в полисомы, повышение степени шероховатости эндоплазматического ретикулума, изменения в ядрышке, отражающие интенсификацию синтеза рибосомальной РНК и т.п. (Гуськова и др., 1977; Тушмалова, Маракуева, 1986). Кроме того, биохимически было обнаружено, что на фоне обучения животных условным рефлексам в различных структурах мозга, в частности, неокортексе и гиппокампе, повышается степень метилирования ДНК и индукция синтеза ДНК и РНК (Ванюшин и др., 1974; Гуськова и др., 1977; Ашапкин и др., 1981). С этими результатами согласуются многочисленные электронно-микроскопические и биохимические исследования, указывающие на активацию белково-нуклеинового синтеза в мозге млекопитающих при обучении и памяти (Меерсон, 1975; Wenzel et al., 1975; Salganik et al., 1983; Goelet et al., 1986; Levenson et al., 2006).

Индукция синтеза нуклеиновых кислот в мозге крыс обнаружена и без выработка условных рефлексов, но на фоне применения мнемотропных препаратов (пирацетама и лоразепама) (Тушмалова и др., 1991; Tewari et al., 1992). Эти данные позволили сформулировать гипотезу о влиянии различных психотропных препаратов на мозг. Согласно этой гипотезе, любые фармакологические препараты, которые усиливают процессы белково-нуклеинового синтеза в организме, могут оказывать активирующее влияние и на мозг и, таким образом, приводить к улучшению обучения и памяти (Тушмалова, 1994; Tushmalova, 1997; 2001; Tushmalova et al., 1989, 2000).

Данный подход позволяет прогнозировать ранее неизвестные мнемотропные свойства у ряда известных аптечных форм биологически активных

соединений природного происхождения, используемых в медицинской практике для различных целей. Так, были спрогнозированы и подтверждены на нескольких условнорефлекторных моделях у крыс мнемотропные свойства таких препаратов, как пантогематоген, пиявит и полидан (Тушмалова, 1994; Прагина и др., 1998; Тушмалова и др., 1999; Тушмалова, Прагина, 2002). Основанием для прогноза мнемотропного действия полидана послужило то, что этот препарат является метаболитом молок осетровых рыб, который используется в онкологической практике, как стимулятор кроветворения. Полидан состоит из стандартизованной смеси натриевых солей полихлоралгидратов дериватов ДНК и РНК и проходит гематоэнцефалический барьер (Бычков и др., 1997).

Настоящая работа посвящена сопоставлению влияния полидана и такого классического ноотропного препарата, как пирацетам, на память у крыс. Для этого была выбрана модель условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), которая широко используется для доклинического изучения влияния различных веществ на процессы обучения и памяти у грызунов (Ковалев, 1990; Буреш и др., 1991; Воронина, Островская, 2000).

Известно, что гиппокамп является структурой мозга, играющей ключевую роль в механизмах обучения и памяти (Douglas, 1973; Виноградова, 1975; Пигарева, 1978; Архипов, 2004; Mizuno, Giese, 2005; и др.). Как влияет полидан на структурно-функциональное состояние нейронов в разных полях гиппокампа у животных без обучения и после выработки УРПИ - не известно. Не до конца ясен этот вопрос и в отношении пирацетама. Тем не менее, поиск структурных коррелятов действия мнемотропных препаратов на мозг, и на гиппокамп в частности, является актуальной задачей как для современной нейробиологии при исследовании механизмов памяти, так и для практической медицины при лечении ее нарушений.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании структурно-функциональных показателей оптимизации памяти в гиппокампе крыс под влиянием препаратов с мнемотропными свойствами полидана и пирацетама. При этом ставились следующие задачи:

1. Провести исследование влияния полидана и пирацетама на формирование у крыс условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) и поведение этих животных в открытом поле;
2. Провести ультраструктурный анализ митохондрий и рибосомального аппарата нейронов поля СА3 гиппокампа необученных животных на фоне введения полидана и пирацетама;
3. Изучить распределение выделенных нами типов клеток с различной степенью функциональной активности среди пирамидных нейронов полей СА1, СА3 и клеток-зерен зубчатой фасции гиппокампа под влиянием полидана и пирацетама у обученных и необученных УРПИ крыс и в соответствующих контролях,
4. Исследовать количество ядрышек в тех же типах нейронов полей СА1, СА3 гиппокампа и клеток-зерен зубчатой фасции в тех же группах контрольных и экспериментальных животных.

**Научная новизна и практическая значимость.** Впервые показано, что полидан, который используется в онкологической практике в качестве стимулятора кроветворения у больных после химеотерапии, оказывает активирующее воздействие на ткань головного мозга, в частности гиппокампа, и демонстрирует мнемотропный эффект, сопоставимый с действием классического ноотропного препарата пирацетама. Эти данные могут послужить основой для расширения спектра терапевтического действия полидана в качестве активатора метаболизма мозга и мнемотропного препарата.

Впервые показано, что полидан активизирует синтетические процессы в цитоплазме нейронов поля СА3 гиппокампа, о чем свидетельствуют соответствующие изменения в рибосомальном аппарате и митохондриях. Однако, если при однократном введении полидана эти изменения функциональны и сопоставимы с изменениями на фоне пятикратного введения пирацетама, то пятикратное введение полидана вызывает чрезмерную активацию ультраструктур нейронов гиппокампа и, таким образом, может оказывать негативный эффект на мозг.

Разработан метод светооптического количественного анализа метаболического состояния однородных популяций нейронов в различных участках мозга. Этот метод заключается в исследовании количественного соотношения нейронов с разной интенсивностью окрашивания ядра и цитоплазмы по методу Ниссля, свидетельствующей о различной степени метаболической активности, и подсчете числа ядрышек, позволяющем оценить степень синтеза рибосомальной РНК в ядрах этих нейронов. Метод может быть использован для выявления структурных коррелятов функциональных состояний разных участков головного мозга при различных экспериментальных воздействиях.

При использовании разработанного метода впервые было показано, что, как при выработке УРПИ, так и под действием однократного введения полидана и пятикратного введения пирацетама у крыс без обучения и после выработки УРПИ в однородных популяциях пирамидных нейронов полей СА1 и СА3 гиппокампа, а также клеток-зерен зубчатой фации, происходит усиление метаболических процессов. Степень этих изменений свидетельствует о том, что улучшение сохранности памятного следа после выработки УРПИ на фоне полидана и пирацетама связано с большим усилением метаболической активности в поле СА3, чем после выработки УРПИ без препаратов. В то же время, в поле СА1 и зубчатой фации гиппокампа на фоне полидана и пирацетама наблюдается неспецифическое усиление синтетических процессов, не связанное с улучшением сохранности памятного следа.

Результаты работы могут быть использованы при чтении курса лекций в ВУЗах медицинского и биологического профиля по высшей нервной деятельности в разделах, посвященных механизмам обучения и памяти и участию в этих процессах гиппокампа.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Однократное введение полидана и пятикратное введение пирацетама оказывают сходное оптимизирующее влияние на сохранность памятного следа у крыс через сутки после выработки УРПИ.

2. Однократное введение полидана оказывает на рибосомальный аппарат и митохондрии нейронов поля СА3 дорзального гиппокампа активирующее влияние, сопоставимое с влиянием пятикратного введения пираретама, а пятикратное введение полидана вызывает чрезмерную активацию рибосомального аппарата и митохондрий.

3. Изменение количественного соотношения типов нейронов, отличающихся по интенсивности окрашивания ядра и цитоплазмы, и увеличение числа ядрышек в них отражают разную степень активации однородных популяций пирамидных нейронов в полях СА1, СА3 и клеток-зерен в зубчатой фации гиппокампа на фоне обучения, мнемотропных препаратов и обучения на фоне мнемотропных препаратов.

4. На фоне полидана и пираретама усиливаются синтетические процессы в нейронах гиппокампа необученных крыс, и степень этого усиления увеличивается при выработке УРПИ. Эти изменения являются тем структурно-функциональным фоном, на котором происходит улучшение сохранения памятного следа после выработки УРПИ.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были доложены на Научной конференции молодых ученых в ИВНД и НФ РАН (Москва, Россия, 2004, 2005); I-ом международном междисциплинарном конгрессе «Достижения нейронауки для современной медицины и психологии» (Судак, Украина, 2005); I съезде физиологов СНГ (Сочи, Россия, 2005); XIII научной международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2006» (Москва, Россия, 2006); V международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения – 2006» (Санкт-Петербург, Россия, 2006); IV Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, Россия, 2006); II-ом Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2006); Международном Симпозиуме «Гиппокамп и память» (Пушино, Россия, 2006).

Диссертация апробирована на заседании Кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова 20 декабря 2006 г.

**Публикации.** По теме диссертации было опубликовано 19 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных результатов, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на страницах машинописного текста и содержит рисунков и таблиц. Список цитируемой литературы включает литературные ссылки, из них на английском языке.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Объект исследования.** Работа выполнена на 66 крысах-самцах линии «Вистар» массой 180-200 г (питомник «Столбовая»). Крыс содержали в виварии в стандартных условиях. Все эксперименты проводили согласно «Правилам работы

с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.84 г. №724).

### Схема эксперимента.

**Серия I. Исследование влияния полидана и пирацетама на структурно-функциональное состояние нейронов гиппокампа необученных крыс.** В этой серии эксперимента использовали следующие пять групп крыс:

1. «К 1» - внутрибрюшинное (i.p.) введение 1 мл физиологического раствора (0,9% NaCl) один раз в сутки (n=6);
2. «Пол 1» - i.p. введение 1 мл полидана в дозе 75 мг/кг один раз в сутки (n=7);
3. «К 5» - i.p. введение 1 мл 0,9% NaCl один раз в сутки в течение пяти дней (n=7);
4. «Пол 5» - i.p. введение 1 мл полидана в дозе 75 мг/кг один раз в сутки в течение пяти дней (n=6);
5. «Пир 5» - i.p. введение 1 мл пирацетама в дозе 300 мг/кг один раз в сутки в течение пяти дней (n=7).

Через 2 часа после последнего введения препаратов у животных этих групп извлекали головной мозг для последующей гистологической обработки и дальнейшего светооптического и электронномикроскопического исследования нейронов полей и зубчатой фасции дорзального гиппокампа.

**Серия II. Исследование влияния полидана и пирацетама на обучение крыс условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) и структурно-функциональное состояние нейронов гиппокампа в этих условиях.** Были использованы следующие пять групп животных, у которых вырабатывали УРПИ (УР):

1. «Н+УР» - интактные животные (n=7);
2. «К1+УР» - i.p. введение 1 мл 0,9% NaCl один раз в сутки (n=7);
3. «Пол1+УР» - i.p. введение 1 мл полидана в дозе 75 мг/кг один раз в сутки (n=6);
4. «К5+УР» - i.p. введение 1 мл 0,9% NaCl один раз в сутки в течение пяти дней (n=6);
5. «Пир5+УР» - i.p. введение 1 мл пирацетама в дозе 300 мг/кг один раз в сутки в течение пяти дней (n=7).

Всех животных из этих групп за неделю до начала введения препаратов тестировали в «Открытом поле». Повторное тестирование проводили через неделю после первого тестирования в группах «К1+УР» и «Пол1+УР», «К5+УР» и «Пир5+УР» - через час после последней инъекции. В группе «Н+УР» повторное тестирование проводили одновременно с группами, которым вводили препараты.

Через два часа после последнего введения препаратов у животных этих групп вырабатывали УРПИ. Через сутки после обучения проводили тестирование. После тестирования УРПИ у животных извлекали головной мозг для последующего морфометрического исследования.

В эксперименте использованы следующие аптечные формы препаратов: полидан (ООО «Научно-производственное фармацевтическое предприятие «Полидан», регистрационный номер 95/292/8); пирацетам (ООО «Хант-Холдинг», регистрационный номер 79/463/7); физиологический раствор (ОАО «Биохимик», регистрационный номер 002134/01-2003).

**Тест «Открытое поле».** Тест проводили в квадратной камере (100X100 см) со стенками высотой 40 см с полом из черного пластика, разделенном на 25 равных квадратов (20x20 см). В центре каждого квадрата имелось отверстие (диаметр 3 см). Освещение производилось лампой 60 Вт, расположенной на высоте 150 см над центром поля. За поведением животного наблюдали в течение 5 минут. Фиксировали количество пересеченных квадратов, количество и общее время вертикальных стоек, количество и время норковых реакций, количество и время замираний животного, количество и время груминга. Тесты проводили в одно и тоже время суток.

Статистический анализ данных проводили по непараметрическим критериям Манна-Уитни (сравнение разных групп) и Уилкоксона для разностей пар (внутригрупповые сравнения) с использованием компьютерной программы STATISTICA.

**Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ).** В эксперименте использовали челночную камеру (60×30×35 см), разделённую перегородкой с отверстием на два симметричных отсека. Один из отсеков был тёмный с электрифицированным решётчатым полом, а другой – прозрачный с дополнительным освещением. Процедуру выработки УРПИ проводили по стандартной методике (Любимов, 1965). При обучении крысу помещали в светлый отсек спиной к отверстию тёмного отсека (стартовое положение). Регистрировали время (латентный период, сек) пребывания в светлом отсеке. Как только крыса переходила в темный отсек камеры, она получала электрокожное раздражение на лапы (ток 0,8 мА), заставлявший крысу перебежать в светлый отсек. После этого крысу сразу удаляли из экспериментальной камеры.

Контрольное тестирование без подачи тока проводили через 24 часа после обучения. Животное помещали в светлый отсек установки в стартовое положение и регистрировали латентный период (сек) его пребывания в этом отсеке. Как только животное переходило в темный отсек, крысу сразу удаляли из экспериментальной камеры. Длительность латентного периода отражает степень сохранения памятного следа. Если крыса не покидала светлый отсек в течение максимально допустимого времени (180 сек), считали, что у нее наилучшее сохранение УРПИ.

Межгрупповое статистическое сравнение латентного периода проводили по непараметрическому критерию Манна-Уитни с использованием компьютерной программы STATISTICA.

После тестирования животных декапитировали под глубоким эфирным наркозом и извлекали мозг для морфологических исследований. Левое полушарие использовали для светооптического исследования. Блоки дорзального гиппокампа из правого полушария обрабатывали по стандартной методике для электронной микроскопии (Саркисов, Боголепов, 1967).

**Светооптическое исследование нейронов полей CA1, CA3 и зубчатой фации гиппокампа.** Светооптическое исследование было выполнено для всех экспериментальных и контрольных групп крыс.

Левое полушарие мозга фиксировали в 4% растворе формальдегида на фосфатном буфере (pH=7,2-7,4) и замораживали в парах жидкого азота. Серийные



фронтальные срезы мозга толщиной 16 мкм изготавливали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  при помощи криостата фирмы Zeiss (Германия). Каждый шестой срез на уровне дорзального гиппокампа монтировали на предметные стекла, покрытые 0,1% раствором желатина. Срезы окрашивали тионином и крезил-виолетом по методу Ниссля, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, осветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам под покровное стекло. Срезы исследовали в световом микроскопе AXIOPLAN 2 (ZEISS, Германия). Для ввода изображений в компьютер использовали программу KS-300.

Среди однородных популяций пирамидных нейронов полей CA1, CA3 и гранулярных нейронов зубчатой фации дорзального гиппокампа было выделено пять типов нормальных (патологически не измененных) нейронов, различающихся по интенсивности окрашивания ядра и цитоплазмы: 1- с темно-синими ядром и цитоплазмой, 2- с синими ядром и цитоплазмой, 3- с синей цитоплазмой и светлым ядром, 4- со светлыми ядром и цитоплазмой, 5- со светлой цитоплазмой и синим ядром. Исследовали только те нейроны, срез которых проходил на уровне ядрышка.

В полях CA1, CA3 и зубчатой фации дорзального гиппокампа с использованием метода визуально-ранговой классификации изображений (Лосева, Стефанов, 1983) при увеличении 1000 измеряли следующие параметры:

- I. количество нормальных нейронов каждого из пяти выделенных типов, число патологически измененных (сморщенных и отечных) нейронов и общее количество нейронов в 20 случайных полях зрения с пяти срезов на одну крысу;
- II. в ядрах нейронов 2, 3, 4, и 5 типов считали количество ядрышек. В нейронах 1 типа подсчет числа ядрышек не производили в связи с высокой интенсивностью окрашивания их ядер. Ядрышки считали в 50 нейронах каждого типа на одну крысу, которые набирали с пяти срезов.

Статистическое сравнение групп крыс проводили по t-критерию для независимых признаков, используя компьютерную программу STATISTICA.

**Электронно-микроскопическое исследование.** Из правого полушария мозга крыс иссекали фронтальный блок дорзального гиппокампа, фиксировали в течение 15 минут в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере ( $\text{pH}=7,2-7,4$ ) и разрезали на 4-5 тонких пластин во фронтальной плоскости. Пластины дофиксировали в глутаровом альдегиде (15 мин) и в 1% растворе четырёхокси осмия на фосфатном буфере по Палладу (3 часа) (Pallade, 1954), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и 100% ацетоне (по 15 мин) и заливали в аралдит (Fluka) по общепринятой методике (Саркисов, Боголепов, 1967). На участок, содержащий поле CA3, затачивали пирамидку. Ультратонкие срезы толщиной 500 Å изготавливали с помощью ультратома (Reichert, Австрия), контрастировали в растворе уранил-ацетата и цитрата свинца и исследовали в электронном микроскопе JEM-100B (Япония).

Проводили количественный анализ поля CA3 гиппокампа крыс из групп «K1», «Пол1», «K5», «Пол5» и «Пир5» при увеличении микроскопа 100 000.

Были исследованы следующие параметры:

- I. Количество свободных рибосом, полисом, рибосом в полисомах и число рибосом, связанных с эндоплазматическим ретикуломом в случайных полях зрения с участков цитоплазмы нейронов. Измерения проводили в 40 полях зрения на одну крысу;
- II. Количество митохондрий с различной степенью целостности крист (целые, частично разрушенные и разрушенные кристы) и оптической плотности матрикса (электронноплотный, частично просветленный и просветленный матрикс) в цитоплазме нейронов. Измерения проводили в 100 случайно встреченных митохондриях на одну крысу.

Статистическое сравнение групп крыс проводили по t-критерию для независимых признаков, используя компьютерную программу STATISTICA.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

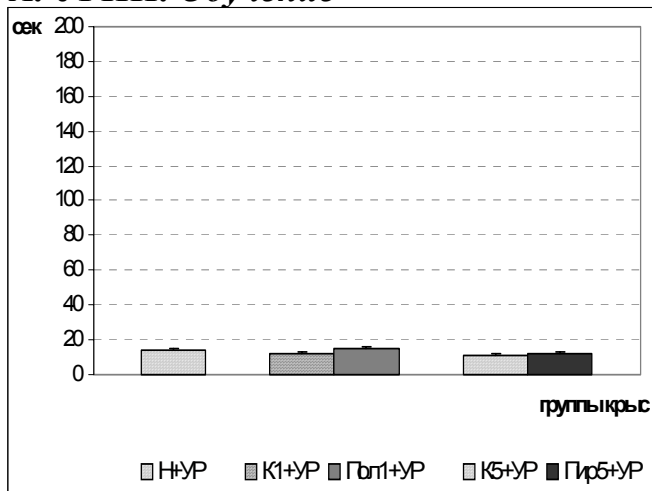
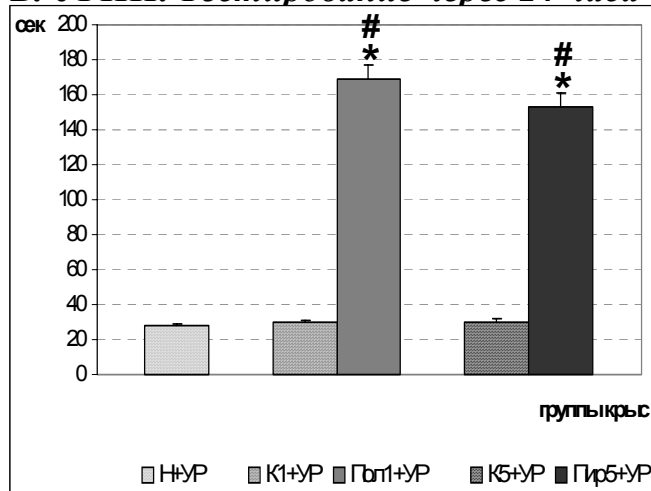
**Тест «Открытое поле».** Тестированию подвергали крыс из групп «Н+УР», «К1+УР», «Пол1+УР», «К5+УР» и «Пир5+УР» за неделю до начала введения препаратов, а повторное тестирование проводили в группах «К1+УР» и «Пол1+УР» - через час после единственной инъекции, а в группах «К5+УР» и «Пир5+УР» - через час после пятой инъекции. Интервал между первым и вторым тестированием крыс из группы «Н+УР» составлял 8 дней.

Во втором тестировании по сравнению с первым были отмечены следующие различия. Количество пересеченных квадратов уменьшалось во всех группах ( $p < 0,05$ ). Количество и время норковых реакций уменьшались в группах «К1+УР» ( $p < 0,05$ ), «К5+УР» ( $p < 0,1$  – тенденция,  $p < 0,05$  соответственно) и «Пол1+УР» ( $p < 0,1$ ). Количество вертикальных стоек уменьшалось во всех группах ( $p < 0,05$ ), за исключением «К1+УР». Время вертикальных стоек уменьшалось в группах «Пол1+УР» ( $p < 0,05$ ), «Н+УР» ( $p < 0,05$ ) и «Пир5+УР» ( $p < 0,1$ ). Количество актов замирания увеличивалось в группах «Пол1+УР» и «Пир5+УР» ( $p < 0,05$ ). Время замирания увеличивалось во всех группах ( $p < 0,05$ , в группе «К1+УР» -  $p < 0,1$ ). Количество актов и времени груминга не изменялось во всех группах крыс.

При сравнении экспериментальных групп «Пол1+УР», «Пир5+УР» с соответствующими контрольными («К1+УР», «К5+УР») статистически значимых отличий в поведении по всем исследованным параметрам не обнаружено ни в первом, ни во втором тестировании.

Таким образом, во время второго тестирования по сравнению с первым снижались показатели двигательной и исследовательской активности у всех групп животных, что свидетельствовало о привыкании крыс к обстановке в открытом поле. Введение полидана и пираретама не оказывало влияния на изменение поведения крыс из экспериментальных групп по сравнению с соответствующими контролями.

**Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ).** УРПИ вырабатывали через два часа после последней инъекции препаратов у крыс из групп «Н+УР», «К1+УР», «К5+УР», «Пол1+УР» и «Пир5+УР». Проверку сохранности памятного следа проводили через 24 часа после выработки рефлекса, оценивая латентный период пребывания крыс в светлом отсеке камеры.

**А. УРПИ. Обучение****Б. УРПИ. Тестирование через 24 часа**

**Рис. 1. Обучение УРПИ (А) и тестирование через 24 часа после обучения (Б).**

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим контролем;

# -  $p < 0,001$  по сравнению с группой «Н+УР».

Обозначения групп крыс даны в разделе «Материалы и методы».

При сравнении контрольных групп крыс («Н+УР», «К1+УР», «К5+УР») между собой статистически значимых отличий по этому показателю не обнаружено. В группах крыс «Пол1+УР», «Пир5+УР» по сравнению с соответствующими контролями («К1+УР», «К5+УР») латентный период увеличивался ( $p < 0,05$ ), что свидетельствовало об улучшении сохранения памятного следа под влиянием полидана и пираретама (рис. 1). При сравнении групп «Пол1+УР» и «Пир5+УР» между собой статистически значимых различий не обнаружено.

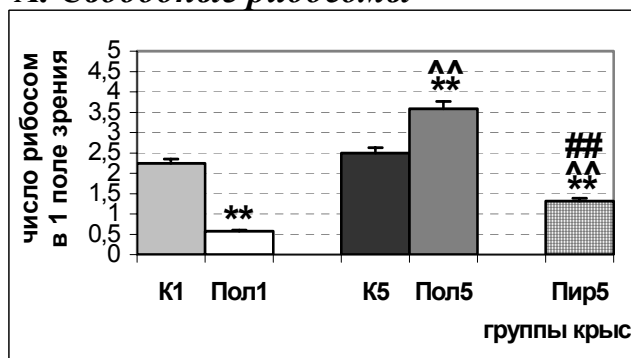
Таким образом, стимулятор гемопоза полидан при однократном его введении оказывает мнемотропный эффект, сопоставимый с мнемотропным эффектом классического ноотропного препарата пираретама при пятикратном его введении (общепринятая схема).

**Электронно-микроскопическое исследование.** Был проведен анализ состояния рибосомального аппарата и митохондрий в экспериментальных («Пол1», «Пол5», «Пир5») и контрольных группах («К1», «К5») необученных крыс в нейронах поля СА3 дорзального гиппокампа.

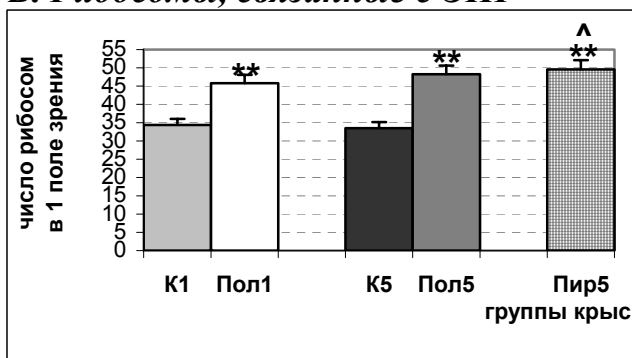
Количество свободных рибосом уменьшалось в группах «Пол1» и «Пир5» по сравнению с соответствующими контролями, но увеличивалось в группе «Пол5» по сравнению с группой «К5» (рис. 2, А). Число рибосом, связанных с канальцами эндоплазматического ретикулула (ЭПР), увеличивалось в группах «Пол1», «Пол5» и «Пир5» по сравнению с соответствующими контрольными группами (рис. 2, Б). Число полисом также увеличивалось в группах «Пол1», «Пол5» и «Пир5» по сравнению с соответствующими контрольными группами. Причем в группах «Пол1» и «Пол5» это увеличение было меньшим, чем в группе «Пир5» (рис. 2, В). Количество рибосом в одной полисоме в группах «Пол1», «Пол5» и «Пир5» увеличивалось по сравнению с соответствующими контролями (рис. 2, Г). Таким образом, на фоне однократного введения полидана и пятикратного введения пираретама по сравнению с соответствующими контролями наблюдались сходные изменения в состоянии рибосомального

аппарата, свидетельствующие об усилении процессов белкового синтеза в нейронах. Пятикратное же введение полидана вызывало новообразование свободных рибосом, что свидетельствовало о гиперактивации синтетических процессов в цитоплазме нейронов.

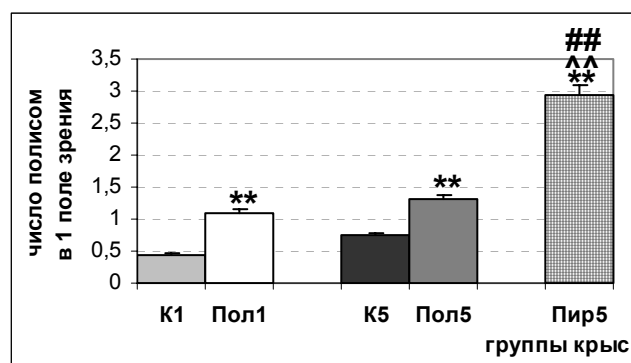
### А. Свободные рибосомы



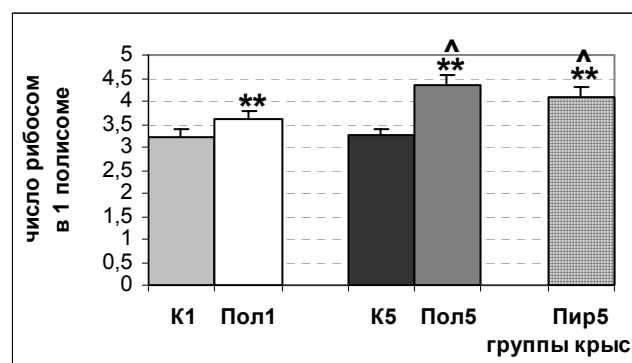
### Б. Рибосомы, связанные с ЭПР



### В. Полисомы



### Г. Рибосомы в одной полисоме



**Рис. 2. Анализ состояния рибосомального аппарата в нейронах поля СА3 дорзального гиппокампа крыс на фоне разных схем введения полидана, пирацетама и физиологического раствора.**

\*\* -  $p < 0,0001$  по сравнению с соответствующим контролем;

^ -  $p < 0,05$ , ^^ -  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «Пол 1»;

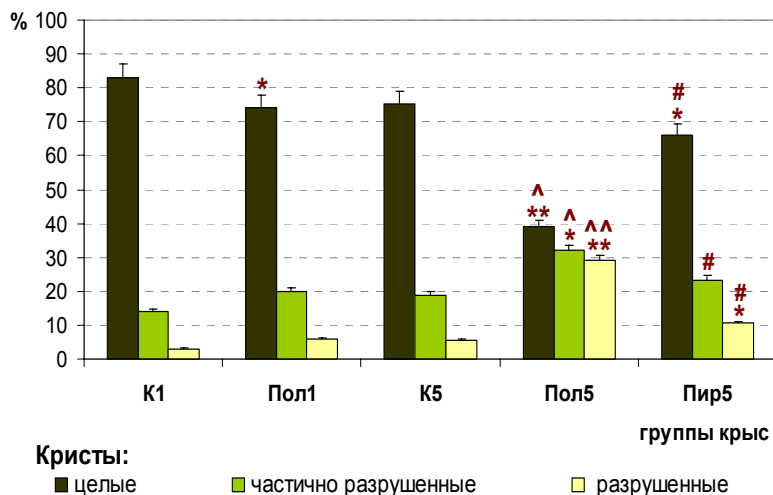
# -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «Пол 5».

Обозначения групп крыс даны в разделе «Материалы и методы».

Число митохондрий с целыми кристами уменьшалось во всех экспериментальных группах («Пол1», «Пол5», «Пир5») по сравнению с соответствующими контрольными («K1», «K5»). При этом в группах «Пол5» и «Пир5» увеличивалось количество митохондрий с разрушенными кристами (рис. 3, А). Во всех экспериментальных группах по сравнению с соответствующими контролями уменьшалось количество митохондрий с электронноплотным матриксом и увеличивалось число митохондрий с просветленным матриксом (рис. 3, Б). При этом, в группе «Пол5» уменьшалось число митохондрий с частично просветленным матриксом (рис. 3, Б).

В группе «Пол5» по сравнению с группой «Пол1» было обнаружено больше свободных рибосом и рибосом в одной полисоме, меньше митохондрий с целыми кристами и больше - с разрушенными кристами, а также - больше митохондрий с электронно-плотным матриксом и меньше - с частично просветленным матриксом (рис. 2, А, Г; рис. 3, А, Б).

### А. Митохондрии. Кристы



### Б. Митохондрии. Матрикс

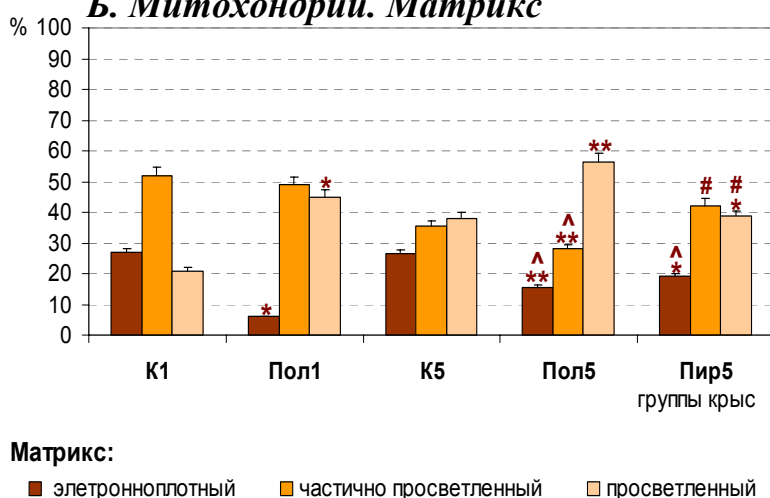


Рис 3. Анализ состояния крист (А) и матрикса (Б) митохондрий в нейронах поля СА3 дорзального гипокампа крыс на фоне разных схем введения полидана, пирацетама и физиологического раствора.

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,0001$  по сравнению с соответствующим контролем;

^ -  $p < 0,05$ , ^^ -  $p < 0,0001$  по сравнению с группой «Пол 1»;

# -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Пол 5».

Обозначения групп крыс даны в разделе «Материалы и методы».

В группе «Пир5» по сравнению с группой «Пол1» было больше свободных рибосом, рибосом, связанных с ЭПР, полисом и рибосом в одной полисоме, а по сравнению с «Пол5» - меньше свободных рибосом и больше полисом (рис. 2, А, Б, В, Г). При этом, в группе «Пир5» по сравнению с группой «Пол1» не было отличий по состоянию крист митохондрий, но было больше митохондрий с электронно-плотным матриксом. В то же время, в группе «Пир5», по сравнению с группой «Пол5», было больше митохондрий с целыми кристами и меньше – с частично и полностью разрушенными кристами. При этом было больше митохондрий с частично просветленным матриксом и меньше – с полностью просветленным матриксом (рис. 3, А, Б).

Таким образом, на фоне всех схем введения полидана и пирацетама наблюдалась активация рибосомального аппарата и митохондрий. Причем, при однократном введении полидана активация рибосомального аппарата была выражена в меньшей степени, а митохондрий - в большей степени, чем при пятикратном введении пирацетама. В то же время, наибольшее число свободных рибосом и наиболее высокая степень разрушения крист и просветленности матрикса митохондрий на фоне пятикратного введения полидана по сравнению, как с контрольными, так и с остальными экспериментальными группами, свидетельствовали о гиперактивации рибосомального и энергетического аппарата нейронов.

### Светооптическое исследование.

**1. Влияние полидана и пирацетама на количественное соотношение (распределение) нейронов различных типов в гиппокампе крыс.** Был проведен анализ количества нормальных нейронов выделенных типов и патологически измененных (сморщенных и отечных) нейронов в полях СА1, СА3 и зубчатой фасции гиппокампа необученных и обученных УРПИ крыс из всех групп, за исключением группы «Пол5», поскольку на ультраструктурном уровне было показано, что пятикратное введение полидана оказывает негативное воздействие на мозг. Описание групп крыс и выделенных типов нейронов дано в разделе «Материалы и методы».

Согласно литературным данным, типы нейронов, различающиеся по интенсивности окрашивания, представляют собой структурно-функциональные состояния клеток с разной степенью интенсивности синтетических процессов в них (Аврущенко и др., 1990; Клещинов, 1990; Калимуллина, 2002). Сопоставляя нашу классификацию с литературными данными, можно заключить, что нейроны 1 типа (гиперхромные) являются наименее, а нейроны 3 (с гипохромным ядром и нормохромной цитоплазмой) и 4 типа (гипохромные) - наиболее функционально активными клетками. При физиологических нагрузках нейроны 4 типа могут переходить в функционально покоящиеся нейроны 1 типа. Промежуточной формой при этом переходе являются нейроны 5 типа (с гиперхромным ядром и гипохромной цитоплазмой). Нейроны 2 типа (нормохромные) находятся в состоянии относительного покоя.

**Поле СА1.** При сравнении группы «К1+УР» с группой «Н+УР» ни по распределению различных типов нормальных нейронов, ни по числу нормальных и патологически измененных нейронов, а также по суммарному количеству нейронов статистически значимых различий обнаружено не было.

У крыс из группы «К1+УР» по сравнению с группой «К1» было меньше нейронов 1 типа и больше – 4 типа (рис. 4, А). То есть, выработка УРПИ вызывает в поле СА1 переход большинства нейронов в функционально более активное состояние.

В группе «Пол1» по сравнению с группой «К1» было меньше количество нейронов 1 и 2 типов, но больше - нейронов 4 и 5 типов (рис. 4, А). То есть, однократное введение полидана, также, как и выработка УРПИ без препарата, вызывало активацию большинства нейронов поля СА1.

В группе «Пол1+УР» по сравнению с группами «К1+УР» и «Пол1» было больше нейронов 1 и 4 типа и меньше - нейронов 3 типа (рис. 4, А). То есть, выработка УРПИ на фоне полидана вызывала еще большую активацию нейронов в поле СА1, чем выработка рефлекса без полидана или фоновое введение этого препарата. Группы «Пол1+УР», «Пол1», «К1+УР» и «К1» по общему количеству нейронов статистически значимо не различались.

В группе «К5» по сравнению с группой «К1» было меньше нормальных нейронов 2, 3, 4 и 5 типов ( $p < 0,05$ ) и общее количество всех нейронов ( $p < 0,05$ ). По-видимому, пятикратные инъекции физ. раствора являются негативным воздействием, приводящим к гибели части нейронов.

В группе «К5+УР» по сравнению с группой «К5» было меньше нейронов 1 типа, больше нейронов 3, 4 и 5 типов (рис. 4, Б), были большими общее

количество нормальных нейронов и сумма всех нейронов ( $p < 0,05$ ). То есть, выработка УРПИ на фоне пятикратного введения физ. раствора приводила не только к активации большинства пирамидных нейронов поля СА1, но и оказывала нейропротективное воздействие на популяцию этих нейронов в целом.

В группе «Пир5» по сравнению с «К5» было меньше нейронов 1 типа, больше нейронов 3 и 4 типов (рис. 4, Б) и общее число нормальных нейронов ( $p < 0,05$ ). В группе «Пир5» по сравнению с группой «Пол1» было больше нейронов 2 и 3 типов ( $p < 0,05$ ), и меньше нейронов 1 и 5 типов ( $p < 0,05$ ). То есть, фоновое пятикратное введение пирасетама оказывает нейропротективное воздействие на нейроны поля СА1 и вызывает их активацию, причем степень этой активации меньше, чем при фоновом однократном введении полидана.

В группе «Пир5+УР» по сравнению с группой «Пир5» было меньше нейронов 3 типа и больше нейронов 4 и 5 типа (рис. 4, Б). При этом в группе «Пир5+УР» по сравнению с группой «К5+УР» практически не отличалась от соответствующей контрольной (рис. 4, Б). То есть, выработка УРПИ на фоне введения пирасетама вызывала еще большую активацию нейронов поля СА1 по сравнению с фоновым введением пирасетама, однако пирасетам при этом не оказывал дополнительного активирующего воздействия по сравнению с выработкой рефлекса на фоне физ. раствора.

**Поле СА3.** По общему числу нормальных, сморщенных, отечных нейронов и общему количеству нейронов между группами «К1+УР» и «Н+УР» статистически значимых различий обнаружено не было.

В группе «К1+УР» по сравнению с группой «К1» было больше активных нейронов 4 типа и менее активных - 5 типа. В группе «Пол1» по сравнению с группой «К1» было меньше нейронов 1 типа и значительно больше нейронов 3 типа (рис. 4, В). То есть, УРПИ на фоне однократного введения физ. раствора вызывает активацию пирамидных нейронов поля СА3, но степень этой активации меньше, чем при однократном введении полидана без выработки УРПИ.

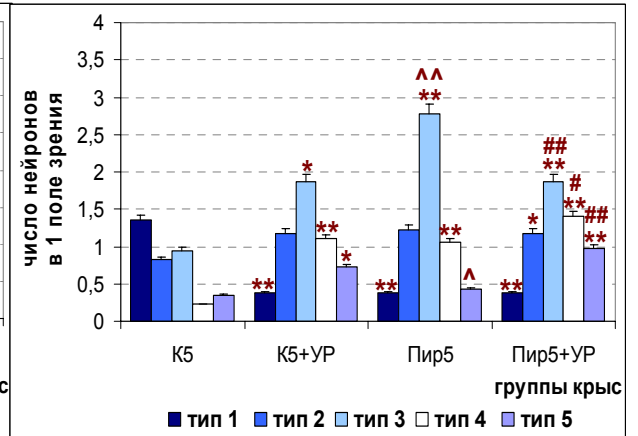
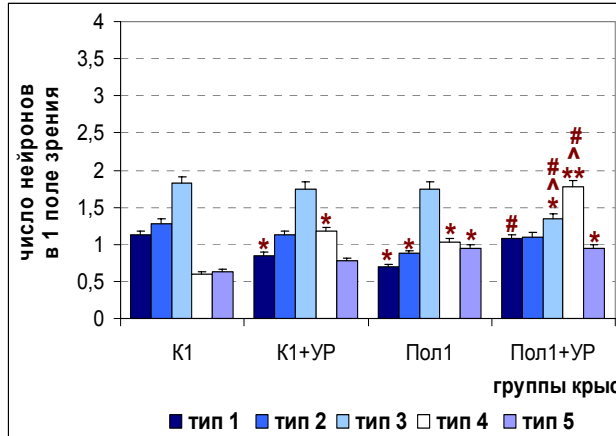
В группе «Пол1+УР» по сравнению с группой «Пол1» было меньше нейронов 3 типа и больше нейронов 1, 4 и 5 типов, а по сравнению с группой «К1+УР» было меньше число нейронов 2 типа и больше нейронов 3 и 4 типов (рис. 4, В). То есть, при выработке УРПИ на фоне полидана происходит наибольшая активация нейронов поля СА3, которая, по-видимому, обуславливает мнемотропный эффект этого препарата.

В группе «К5» по сравнению с группой «К1» было меньше нормальных и больше сморщенных нейронов ( $p < 0,05$ ). То есть, пятикратные инъекции физ. раствора оказывают на пирамидные нейроны поля СА3, как и поля СА1, негативное воздействие. В то же время, в группах «К5+УР», «Пир5» и «Пир5+УР» число нормальных нейронов было большим, чем в группе «К5», что свидетельствовало о нейропротективном эффекте выработки УРПИ и применения пирасетама.

В группах «К5+УР» и «Пир5» по сравнению с группой «К5» было меньше нейронов 1 типа и больше нейронов 3, 4 и 5 типов (рис. 4, Г). То есть, как выработка на фоне пятикратного введения физ. раствора, так и фоновое введение пирасетама, вызывали сходную степень активации пирамидных нейронов поля СА3.

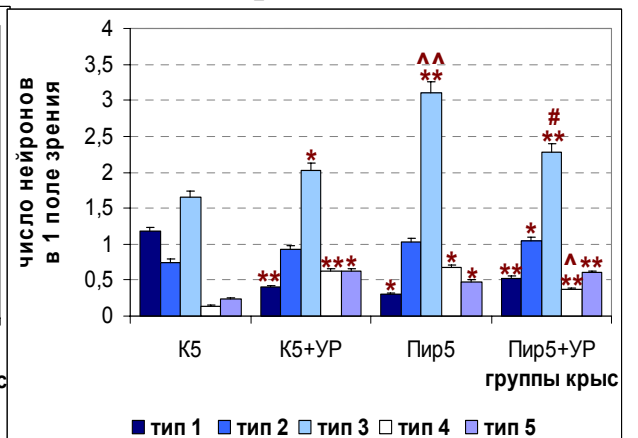
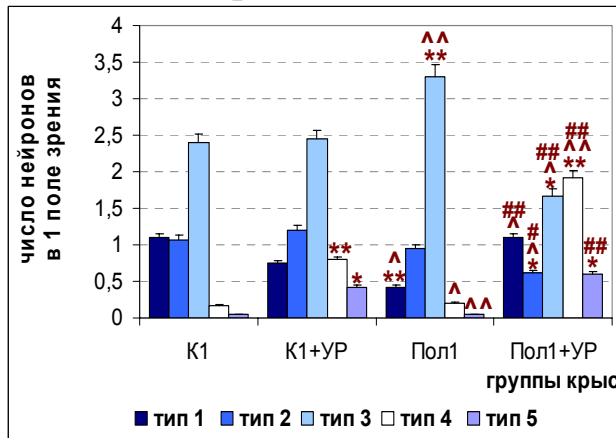
**А. СА1. Однократное введение**

**Б. СА1. Пятикратное введение**



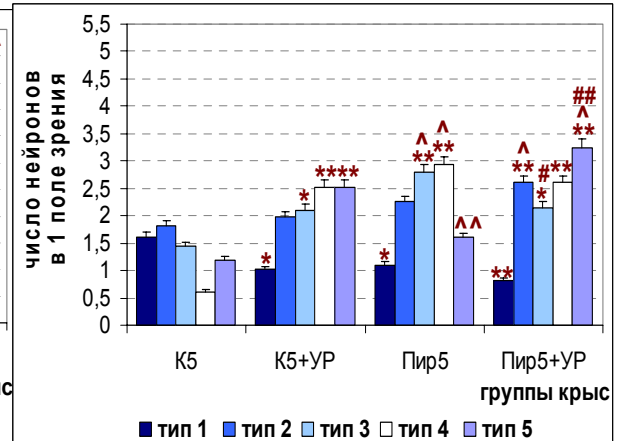
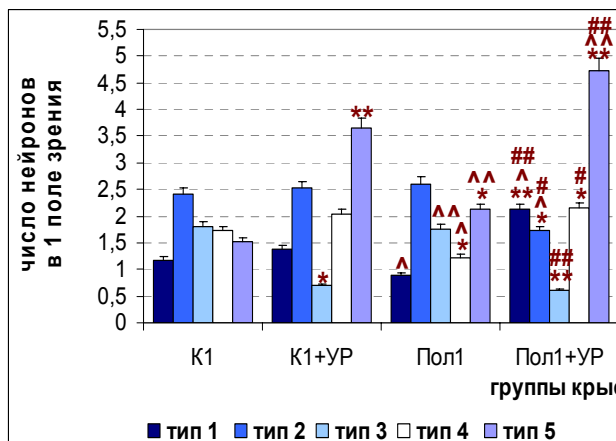
**В. СА3. Однократное введение**

**Г. СА3. Пятикратное введение**



**Д. Зубчатая фасция. Однократное введение**

**Е. Зубчатая фасция. Пятикратное введение**



**Рис. 4. Распределение типов нейронов (среднее количество нейронов каждого типа в одном поле зрения) в поле СА1 (А, Б), СА3 (В, Г) и зубчатой фасции (Д, Е) гиппокампа крыс. Типы нейронов: 1 - с темно-синими ядром и цитоплазмой, 2 - с синими ядром и цитоплазмой, 3 - со светлым ядром и синей цитоплазмой, 4 - со светлыми ядром и цитоплазмой, 5 - с синим ядром и светлой цитоплазмой.**

Обозначения групп крыс см. «Материалы и методы».

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,0001$  по сравнению с фоновой контрольной группой (K1, K5); ^ -  $p < 0,05$ , ^^ -  $p < 0,0001$  по сравнению с контрольной группой после обучения УРПИ (K1+УР, K5+УР); # -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,0001$  по сравнению с фоновой группой, которой вводили препарат (Пол1, Пир5).



В группе «Пир5» по сравнению с группой «Пол1» было больше нейронов 2, 4 и 5 типов и меньше нейронов 1 и 3 типа. То есть, пятикратное введение пиретама вызывало усиление синтетических процессов в поле СА3 в большей степени, чем однократное введение полидана.

В группе «Пир5+УР» по сравнению с группой «Пир5» было меньше нейронов 3 типа (рис. 4, Г), а по сравнению с группой «К5+УР» - статистически значимых различий не обнаружено. То есть, выработка УРПИ на фоне введения пиретама вызывала незначительную активацию нейронов поля СА3 по сравнению с фоновым введением пиретама, при этом пиретам не оказывал дополнительного активирующего воздействия по сравнению с выработкой рефлекса на фоне физ. раствора.

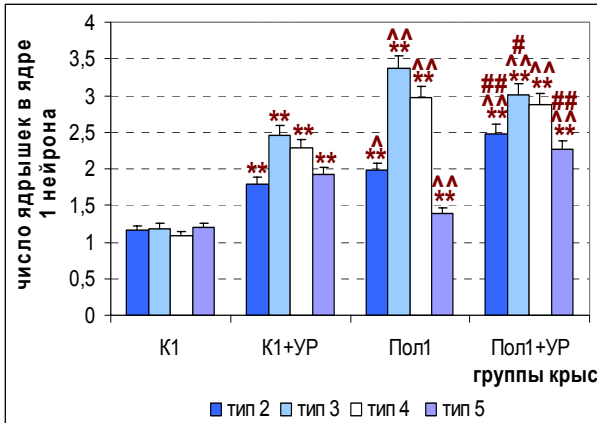
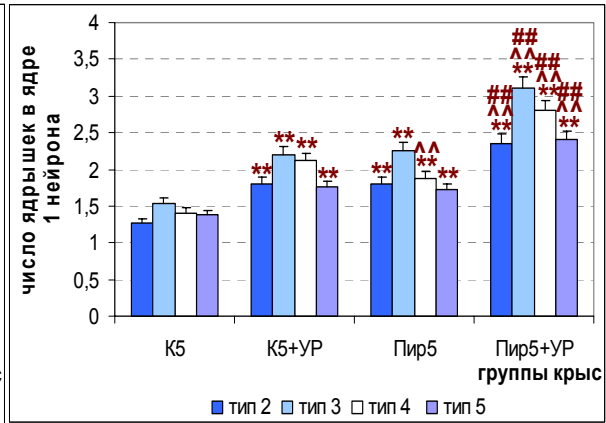
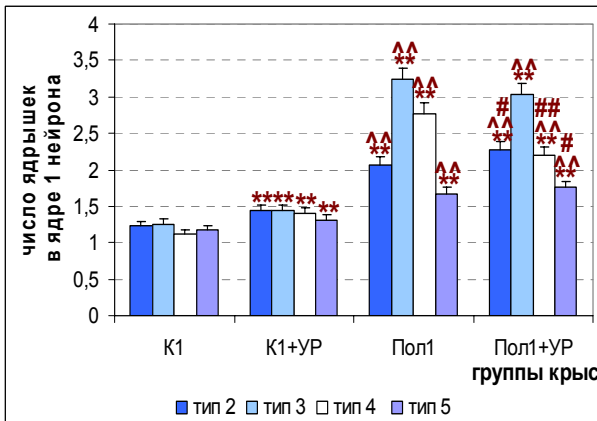
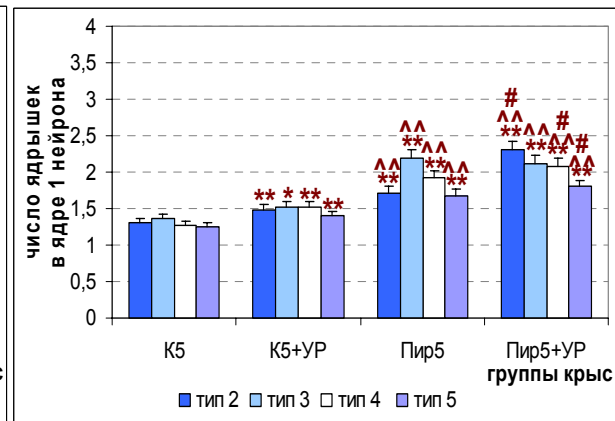
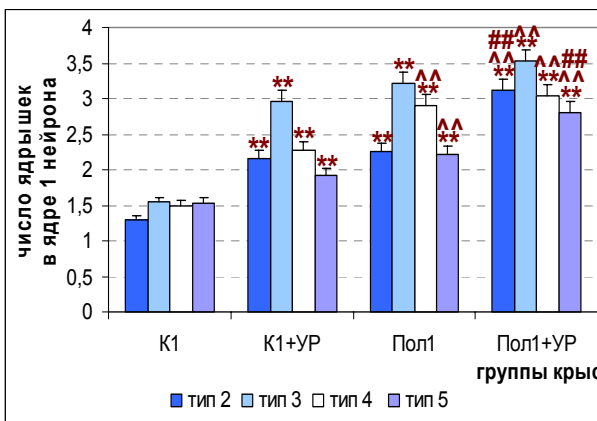
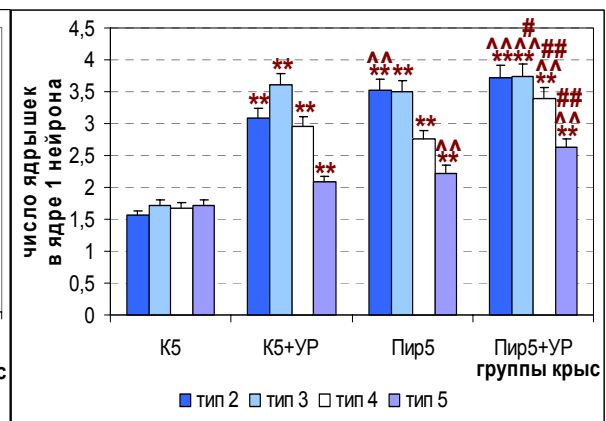
**Зубчатая фасция.** В группе «К1+УР» по сравнению с группой «Н+УР» было меньше нормальных нейронов ( $p < 0,05$ ). По общему количеству всех нейронов статистически значимых различий между этими группами не обнаружено.

В группе «К1+УР» по сравнению с группой «К1» было меньше наиболее активных нейронов 3 типа и больше менее активных нейронов 5 типа. В группе «Пол1» по сравнению с группой «К1» было меньше нейронов 4 типа и больше нейронов 5 типа. В группе «Пол1+УР» по сравнению с группой «Пол1» было больше нейронов 1, 4 и 5 типов и меньше нейронов 2 и 3 типов, а по сравнению с группой «К1+УР» было больше нейронов 1 и 5 типов и меньше нейронов 2 типа (рис. 4, Д). То есть, через сутки после выработки УРПИ на фоне введения физ. раствора и при введении полидана без обучения усиливался переход нейронов зубчатой фасции, находившихся на пике функциональной активности, в менее активные состояния. Через сутки после выработки УРПИ на фоне введения полидана переход нейронов в менее активные метаболические состояния из более активных усиливался еще больше. Кроме того, этот процесс дополнялся переходом нейронов из менее активных состояний в более активные.

В группе «К5» по сравнению с группой «К1» было меньше нормальных нейронов ( $p < 0,05$ ) и общее количество нейронов ( $p < 0,05$ ), что, по-видимому, связано с негативным влиянием пятикратных инъекций физ. раствора.

В группах «К5+УР» и «Пир5» по сравнению с группой «К5» было меньше нейронов 1 типа, больше нейронов 3, 4 и 5 типов (рис. 4, Е) и большее общее количество нейронов ( $p < 0,05$ ). То есть, в зубчатой фасции, также наблюдались активирующий и нейропротективный эффекты обучения без введения мнемнотропного препарата и введения пиретама без обучения на гранулярные нейроны.

В группе «Пир5» по сравнению с группой «Пол1» было больше число более активных нейронов 3 и 4 типов ( $p < 0,05$ ) и меньше менее активных нейронов 5 типа ( $p < 0,05$ ). То есть, при пятикратном введении пиретама гранулярные нейроны находились еще на пике активности, а при однократном введении полидана уже происходил переход активных форм в менее активные. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что полидан оказывает большее стимулирующее воздействие на нейроны зубчатой фасции, чем пиретам.

**А. СА1. Однократное введение****Б. СА1. Пятикратное введение****В. СА3. Однократное введение****Г. СА3. Пятикратное введение****Д. Зубчатая фасция. Однократное введение****Е. Зубчатая фасция. Пятикратное введение**

**Рис. 5. Количество ядрышек в различных типах пирамидных нейронов полей СА1 (А, Б), СА3 (В, Г) и клеток-зерен зубчатой фасции (Д, Е) гиппокампа крыс. Типы нейронов: 2 - с синими ядром и цитоплазмой, 3 - со светлым ядром и синей цитоплазмой, 4 - со светлыми ядром и цитоплазмой, 5 - с синим ядром и светлой цитоплазмой.**

Обозначения групп крыс даны в разделе «Материалы и методы».

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,0001$  по сравнению с фоновой контрольной группой (K1, K5);

^ -  $p < 0,05$ , ^^ -  $p < 0,0001$  по сравнению с контрольной группой после обучения УРПИ (K1+УР, K5+УР);

# -  $p < 0,05$ , ## -  $p < 0,0001$  по сравнению с фоновой группой, которой вводили препарат (Пол1, Пир5).

В группе «Пир5+УР» по сравнению с группой «Пир5» было больше нейронов 5 типа, а по сравнению с группой «К5+УР» было больше нейронов 2 и 5 типов (рис. 4, Е). То есть, при выработке УРПИ на фоне предварительного введения пираретама усиливается цикл переходов нейронов из более активных метаболических состояний в менее активные и наоборот.

**2. Изменение числа ядрышек в различных типах нейронов гиппокампа крыс.** Известно, что увеличение числа ядрышек в клетках свидетельствует об усилении синтеза рибосомальной РНК (рРНК), что приводит к усилению внутриклеточных процессов белкового синтеза (Ченцов, Поляков, 1974). Был проведен анализ количества ядрышек в нейронах 2, 3, 4 и 5 типов в полях СА1, СА3 и зубчатой фации гиппокампа необученных и обученных УРПИ крыс из всех групп, за исключением группы «Пол5».

Во всех изученных областях гиппокампа в группах «К1+УР», «Пол1», «Пол1+УР» по сравнению с группой «К1», а в группах «К5+УР», «Пир5», «Пир5+УР» по сравнению с группой «К5» количество ядрышек в нейронах было большим (рис. 5, А, Б, В, Г, Д, Е). Однако степень этого увеличения отличалась в разных группах крыс и была неодинакова в разных типах нейронов.

В группе «К1+УР» по сравнению с группой «К1», а в группе «К5+УР» по сравнению с группой «К5», в поле СА3 степень увеличения числа ядрышек была меньшей, чем в поле СА1 и зубчатой фации ( $p < 0,0001$ ). Причем, если в поле СА3 увеличение числа ядрышек было сходным в нейронах всех типов (рис. 5, В, Г), то в поле СА1 и зубчатой фации этот показатель в нейронах 2 и 5 типов был наименьшим, а в нейронах 3 и 4 типов – наибольшим (рис. 5, А, Б, Д, Е).

В группе «Пол1» по сравнению с группой «К1» во всех изученных областях гиппокампа, а в группе «Пир5» по сравнению с группой «К5», в полях СА1, СА3 увеличение числа ядрышек в нейронах 2 и 5 типов было наименьшим, а в нейронах 3 и 4 типов – наибольшим (рис. 5, А, Б, В, Г, Д, Е). В то же время, в зубчатой фации в группе «Пир5» по сравнению с группой «К5» увеличение числа ядрышек в нейронах 2 типа было сходным с таковым в нейронах 3 типа (рис. 5, Е).

В группе «Пир5» по сравнению с группой «Пол1» в полях СА1 и СА3 число ядрышек было меньшим в нейронах 2, 3 и 4 типов ( $p < 0,05$ ). Кроме того, в поле СА1 этот показатель был большим в нейронах 5 типов ( $p < 0,05$ ), а в зубчатой фации – в нейронах 2 типа ( $p < 0,05$ ). То есть фоновое введение полидана в большей степени активировало ядрышковый аппарат нейронов гиппокампа, чем фоновое введение пираретама.

В группе «Пол1+УР» по сравнению с группой «Пол1» в полях СА1, СА3 и зубчатой фации было больше ядрышек в нейронах 2 и 5 типов (рис. 5, А, В, Д). При этом, в поле СА1 было меньше ядрышек в нейронах 3 типа (рис. 5, А), а в поле СА3 - в нейронах 4 типа (рис. 5, В).

В группе «Пир5+УР» по сравнению с группой «Пир5» в поле СА1 число ядрышек было больше в нейронах всех типов, в поле СА3 – в нейронах всех типов за исключением 3 типа, а в зубчатой фации – в нейронах всех типов за исключением 2 типа (рис. 5, Б, Г, Е).

В группе «Пол1+УР» по сравнению с группой «К1+УР» во всех изученных областях гиппокампа число ядрышек увеличивалось во всех типах нейронов, причем в нейронах 2 и 5 типов это увеличение было наименьшим, а в нейронах 3 и 4 типов – наибольшим (рис. 5, А, В, Д).

В группе «Пир5+УР» по сравнению с группой «К5+УР» в полях СА1, СА3 и зубчатой фасции число ядрышек увеличивалось в нейронах всех типов (рис. 5, Б, Г, Е). Исключение составляли нейроны 3 типа в поле СА3, количество ядрышек в которых уменьшалось (рис. 5, Г).

Таким образом, в полях СА1, СА3 и зубчатой фасции выработка УРПИ на фоне обеих схем введения физ. раствора вызывала усиление синтеза рРНК в нейронах, причем в поле СА3 эта активация была наименьшей. Фоновое введение полидана и пирацетама без обучения также вызывало активацию ядрышкового аппарата в нейронах этих областей, причем в поле СА3 степень этой активации была большей, чем после выработки УРПИ без препаратов. После выработки УРПИ на фоне полидана и пирацетама в пирамидных нейронах поля СА1 и клеток-зерен зубчатой фасции наблюдалась наибольшая степень усиления синтеза рРНК, чем после выработки рефлекса без препаратов или фонового их введения. В то же время, в поле СА3 активация ядрышкового аппарата пирамидных нейронов была большей только по сравнению с выработкой УРПИ без препарата. По-видимому, улучшение сохранности памятного следа после выработки УРПИ под действием полидана и пирацетама обусловлено активирующим действием этих мнемотропных препаратов на ядрышковый аппарат пирамидных нейронов поля СА3. В то же время, усиление синтеза рРНК в популяциях пирамидных нейронов поля СА1 и клеток-зерен зубчатой фасции в этих условиях является неспецифическим и не связано с улучшением сохранности памятного следа.

## **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Обучение и воспроизведение УРПИ считается наиболее удобной и широко используемой моделью для доклинического изучения влияния различных веществ на процессы обучения и памяти в эксперименте на животных. Благодаря этому методу можно оценить избирательность действия веществ на стадиях фиксации, консолидации, хранения и извлечения памятного следа, вводя исследуемое вещество в разные сроки эксперимента: до или после обучения, либо перед проверкой выработанного навыка (Ковалев, 1990; Буреш и др., 1991; Воронина, Островская, 2000). Наши результаты свидетельствуют о том, что однократное внутрибрюшинное введение полидана, используемого в клинической практике в качестве стимулятора гемопоза (Бычков и др., 1997), перед выработкой УРПИ улучшает сохранность памятного следа у крыс. Причем этот эффект полидана сопоставим с мнемотропным эффектом такого классического ноотропного препарата, как пирацетам. Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают данные о мнемотропном эффекте полидана, ранее полученные на различных моделях оборонительных условных рефлексов у крыс (Прагина и др., 1990; Тушмалова и др., 1999; Прагина и др., 2003).

Мнемотропный эффект полидана был спрогнозирован на основании предложенной Н.А. Тушмаловой гипотезы об улучшении памяти различными фармакологическими препаратами, активирующими процессы синтеза в

организме (Тушмалова, 1994; Тушмалова, Прагина, 2000; Тушмалова, Прагина, 2003). Данные нашей работы подтвердили прогноз не только мнемотропного эффекта полидана, но и активации на фоне этого препарата синтетических процессов в мозге на ультраструктурном уровне на примере поля СА3 дорзального гиппокампа крыс.

Изменения состояния белоксинтезирующего аппарата и митохондрий в нейронах поля СА3, обнаруженные нами под воздействием полидана и пирацетама, согласуются с описанием в ряде работ состояния ультраструктур нейронов в условиях повышенной синтетической активности мозга (Попова и др., 1976; Манина, 1976). Так, на фоне этих препаратов наблюдалось увеличение количества полисом и рибосом в одной полисоме, а также рибосом, связанных с канальцами эндоплазматического ретикулула. Однако, если при однократном введении полидана и пятикратном введении пирацетама наблюдалось уменьшение количества свободных рибосом, то на фоне пятикратного введения полидана – их увеличение. Согласно литературным данным, подобные изменения в рибосомальном аппарате свидетельствуют об активации белок-синтетических процессов в нейронах (Манина, 1976; Тушмалова, Маракуева, 1989). Увеличение числа свободных рибосом при пятикратном введении полидана может указывать на синтез новых рибосом, и, следовательно, на более высокую степень интенсивности белок-синтетических процессов в нейронах по сравнению с таковой при однократном введении этого препарата или применении пирацетама.

Анализ состояния митохондрий также свидетельствует об активации синтетических процессов в нейронах гиппокампа на фоне полидана и пирацетама. Однако, если при однократном введении полидана изменения в митохондриях были функциональны, то при пятикратном они свидетельствовали о гиперактивации этих органелл, большинство которых было с разрушенными кристами. То есть, однократное введение полидана вызывает изменения в ультраструктурах нейронов, сопоставимые с изменениями, наблюдаемыми на фоне пятикратного введения пирацетама, а пятикратное введение полидана оказывает негативный эффект на мозг.

Результаты электронно-микроскопического исследования согласуются с данными светооптического анализа об активации ядрышкового аппарата в пирамидных нейронах полей СА1, СА3 и клетках-зернах зубчатой фации гиппокампа под воздействием полидана и пирацетама. Известно, что увеличение числа ядрышек в клетках свидетельствует об усилении синтеза рибосомальной РНК (рРНК) в нейронах (Ченцов, Поляков, 1974). Применение полидана и пирацетама без последующего обучения вызывало увеличение количества ядрышек в нейронах всех выделенных типов в исследованных областях гиппокампа.

Выработка УРПИ на фоне физиологического раствора так же вызывала увеличение числа ядрышек, т.е. усиление синтеза рРНК, в нейронах всех выделенных типов по сравнению с введением физиологического раствора без обучения. Это подтверждает общепринятое положение о том, что формирование памяти вызывает усиление синтетических процессов в мозге (Гуськова и др., 1977; Ашапкин и др., 1981; Urnov, 2000; Bolognani et al., 2004; Sharma et al., 2005). Следует подчеркнуть, что в наших экспериментах степень увеличения числа

ядрышек после обучения в поле СА3 была меньшей, а в зубчатой фасции – большей, по сравнению с полем СА1.

После обучения животных УРПИ на фоне применения и полидана, и пираретама наблюдалось еще большее увеличение числа ядрышек в нейронах всех изученных областей гиппокампа, чем при фоновом введении этих препаратов или обучении без их введения. То есть, мнемотропный эффект полидана и пираретама может быть обусловлен повышением синтеза рРНК в нейронах гиппокампа в результате введения этих препаратов перед обучением, что может являться важным условием для улучшения сохранения памятного следа. Анализ наших данных позволяет предположить, что важную роль для улучшения сохранения памятного следа под воздействием мнемотропных препаратов играет высокая степень активации синтеза рРНК пирамидных нейронов поля СА3. В то же время, активация ядрышкового аппарата пирамидных нейронов поля СА1 и клеток-зерен зубчатой фасции при обучении в этих условиях является неспецифической и не отражает мнемотропного эффекта полидана и пираретама.

Известно, что усиление синтеза рРНК приводит к усилению внутриклеточных процессов белкового синтеза (Ченцов, Поляков, 1974). В наших экспериментах в нейронах выделенных типов с различной интенсивностью окрашивания ядра и цитоплазмы степень увеличения числа ядрышек под воздействием полидана и пираретама была неодинаковой. Так, во всех областях гиппокампа в большинстве случаев при использованных экспериментальных воздействиях этот показатель был наименьшим в нейронах 5-го типа и наибольшим – в нейронах 3-го типа. Эти результаты являются подтверждением литературных данных, согласно которым различная интенсивность окрашивания ядра и цитоплазмы нейронов отражает разную степень метаболизма в них (Аврущенко и др., 1990; Калимуллина, 2002; Соловьева, Есипова, 1989).

Нейроны с темным ядром и цитоплазмой (1-й тип по нашей классификации) соответствуют классическим характеристикам темных (гиперхромных) нейронов (Клещинов, 1990). Предполагается, что гиперхромные клетки представляют собой популяцию неактивных клеток, в которых накапливаются продукты синтеза и снижен энергетический метаболизм (Соловьева, Есипова, 1989). Ядра темных клеток обладают высокой транскрипционной активностью, в них происходит суперэкспрессия амплификации генов, которая обеспечивает подготовку к белковому синтезу (Калимуллина, 2002). В результате физиологических нагрузок и интенсивной синаптической активации метаболические процессы усиливаются, и гиперхромные нейроны из функционально неактивного состояния могут переходить в функционально более активные клетки через ряд промежуточных состояний (Попова и др., 1974; Клещинов, 1990; Минибаева, Калимуллина, 2002; Гриневич и др., 2004).

Одно из таких состояний отражает синее окрашивание ядра и цитоплазмы нейронов (2 тип по нашей классификации). Эти клетки соответствуют классическим характеристикам нормохромных нейронов. Считается, что нормохромные клетки находятся в состоянии относительного покоя (Попова и др., 1974; Гриневич и др., 2004). В них в нашей работе наблюдалась наименьшая

степень увеличения числа ядрышек под воздействием полидана и пирацетама. Мы полагаем, что эти данные свидетельствуют об умеренной синтетической активности нейронов 2-го типа на ранних стадиях выхода из состояния покоя, что согласуется с мнением ряда авторов (Клещинов, 1990, Гриневич и др., 2004). Кроме того, не исключено, что часть этих клеток может являться клетками-предшественниками, из которых возникают более дифференцированные формы. Так, в зубчатой фасции большинство таких клеток содержится в субгранулярной зоне, а из литературы известно, что именно в этом локусе как раз и находятся недифференцированные клетки-предшественники, вступающие в процесс нейрогенеза (Резников, Назаревская, 1989).

Наиболее функционально активными считаются нейроны 3 и 4 типов по нашей классификации. Согласно литературным данным, нейроны со светлым ядром и синей цитоплазмой (3 тип) имеют такое же ультратонкое строение ядра и митохондрий, как и светлые нейроны (4 тип), но отличаются от них повышенной электронной плотностью матрикса цитоплазмы, большим количеством рибосом и других органелл. Это свидетельствует о более высокой степени синтетических процессов в нейронах 3 типа (Давыдова, 1976; Ахмадеев, Калимуллина, 2005). В пользу этого утверждения говорят и наши данные, свидетельствующие о наибольшем увеличении числа ядрышек в нейронах 3-го типа при различных воздействиях. Светлые, гипохромные, нейроны (4 тип) могут появляться в результате различных физиологических нагрузок и длительной интенсивной синаптической активации (Попова и др., 1974; Гриневич и др., 2004). Считается, что в процессе адаптации или в результате утомления светлые нейроны переходят в гиперхромное состояние (Ярыгин, Ярыгин, 1974). Структурно-функциональному состоянию нейронов на начальных этапах этого перехода соответствуют нейроны с темным ядром и светлой цитоплазмой (5 тип по нашей классификации) (Клещинов, 1990).

Анализ наших данных показал, что при воздействиях, активирующих белковый синтез в нейронах, т.е. при выработке УРПИ, фоновом введении полидана и пирацетама, а также при выработке УРПИ на фоне мнотропных препаратов, происходит изменение количественного соотношения (перераспределение) нейронов выделенных типов во всех изученных областях гиппокампа. Причем неодинаковое перераспределение типов нейронов в полях СА1, СА3 и зубчатой фасции гиппокампа свидетельствует о различной степени вовлечения этих областей гиппокампа в активацию синтетических процессов при разных воздействиях. Так, перераспределение типов нейронов через сутки после выработки УРПИ без введения мнотропных препаратов было сходным в полях СА1 и СА3. Введение полидана и пирацетама без выработки УРПИ вызывало перераспределение нейронов различных типов, свидетельствовавшее о большей активации метаболических процессов в нейронах поля СА3 по сравнению с полем СА1. После выработки УРПИ на фоне полидана и пирацетама наблюдалось перераспределение типов нейронов, указывающее на еще большую активацию метаболических процессов в нейронах гиппокампа. Причем степень этой активации в поле СА3 по сравнению с полем СА1 после обучения на фоне полидана была больше, а на фоне пирацетама - меньше. В зубчатой фасции этот показатель при всех указанных воздействиях указывал на переход нейронов из

более активных функциональных состояний в менее активные, что могло свидетельствовать о более высокой скорости перехода гранулярных нейронов зубчатой фасции по сравнению с пирамидными нейронами полей гиппокампа.

Таким образом, полидан, оказывающий стимулирующее действие на органы кроветворения, вызывает усиление синтетических процессов и в нейронах головного мозга. По-видимому, активация синтеза в нейронах мозга у необученных животных и еще большая активация этого процесса у обученных крыс под действием полидана и классического ноотропа пираретама является тем структурно-функциональным фоном, который обуславливает мнемотропный эффект этих препаратов.

### **ВЫВОДЫ**

1. Полидан оказывает мнемотропное действие, сопоставимое с действием классического ноотропного препарата пираретама, о чем свидетельствует удлинение латентного периода пребывания в светлом отсеке камеры при тестировании через 24 часа после выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) на фоне обоих препаратов.
2. Через сутки после выработки УРПИ у крыс без воздействия мнемотропных препаратов в популяциях пирамидных нейронов полей СА1, СА3 и клеток-зерен зубчатой фасции гиппокампа обнаружены изменения в количественном соотношении клеток различных типов с разной интенсивности окрашивания и увеличение числа ядрышек в них. Эти результаты свидетельствуют об активации синтетических процессов в гиппокампе, причем степень этой активации ниже в поле СА3 по сравнению с полем СА1 и зубчатой фасцией.
3. Анализ состояния митохондрий и рибосомального аппарата в нейронах поля СА3 гиппокампа на фоне введения полидана и пираретама необученным крысам свидетельствует об активации белок-синтетических и энергетических процессов. Однако, если при однократном введении полидана эти изменения функциональны и сопоставимы с изменениями на фоне пятикратного введения пираретама, то пятикратное введение полидана вызывает чрезмерную активацию ультраструктур нейронов гиппокампа и, таким образом, может оказывать негативный эффект на мозг.
4. В полях СА1, СА3 и зубчатой фасции гиппокампа необученных крыс на фоне введения тех же схем введения полидана и пираретама происходят изменения количественного соотношения нейронов разных типов и увеличение количества ядрышек в них, что свидетельствует об активации метаболических процессов и синтеза рибосомальной РНК в нейронах. Степень этой активации неодинакова в различных областях гиппокампа.
5. У крыс на фоне однократного введения полидана и пятикратного введения пираретама улучшение сохранности памятного следа после выработки УРПИ сопровождается еще большим усилением синтетических процессов в полях СА1, СА3 и зубчатой фасции гиппокампа, чем на фоне препаратов без обучения.
6. Изменения, свидетельствующие об еще большей активации синтетических процессов в гиппокампе на фоне применения полидана и пираретама у обученных крыс по сравнению с необученными, могут являться структурными коррелятами мнемотропного действия этих препаратов, что подтверждает



гипотезу о механизмах влияния на мозг различных психотропных средств, оптимизирующих память.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Прагина Л.Л., Тушмалова Н.А., Лосева Е.В., Евдокимова (Каптарь) В.С., Курская О.В. Влияние полидана на условный рефлекс пассивного избегания (отдаленное влияние). Материалы IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство» Москва. 2002. С. 77.
2. Прагина Л.Л., Лосева Е.В., Тушмалова Н.А., Евдокимова (Каптарь) В.С., Курская О.В. Влияние деривата ДНК (полидана) на условнорефлекторную память и структурно-метаболические изменения в нейронах мозга крыс // 1 Международный Симпозиум «Стресс и экстремальные состояния», Кара-Даг. Феодосия, Крым. Украина. Материалы Симпозиума. – М.:МАКС Пресс. 2002. С.111.
3. Курская О.В. Влияние полидана (деривата ДНК) на выработку у крыс условного рефлекса пассивного избегания и структурно-метаболические сдвиги в нейронах поля СА3 дорзального гиппокампа // Научная конференция молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН. 2002. С.14.
4. Евдокимова (Каптарь) В.С., Курская О.В., Лосева Е.В., Тушмалова Н.А., Прагина Л.Л. Влияние полидана (деривата ДНК) на структурно-функциональное состояние нейронов неокортекса и гиппокампа у крыс // Труды Международного Конгресса «Прогрессивные научные технологии для здоровья человека». Кара-Даг. Феодосия. Крым. Украина. М.:МАКС Пресс. 2003. С.65.
5. Прагина Л.Л., Тушмалова Н.А., Лосева Е.В., Курская О.В., Евдокимова (Каптарь) В.С. Полидан – влияние на условнорефлекторную память и структурно-метаболические показатели в нейронах мозга крыс // Журнал клинической и экспериментальной фармакологии. 2003. Т.66. № 6. С. 6-8.
6. Курская О.В. Исследование разных схем введения полидана (деривата ДНК) на условнорефлекторную память // Труды Международного Конгресса «Прогресс в фундаментальных и прикладных науках для здоровья человека». Судак. Крым, Украина. М.: МАКС Пресс. 2004. С.33.
7. Курская О.В. Влияние полидана (деривата ДНК) на структурно-метаболическое состояние нейронов гиппокампа крыс // Научная конференция молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН. 2004. С.11.
8. Лосева Е.В., Евдокимова (Каптарь) В.С., Курская О.В., Прагина Л.Л., Тушмалова Н.А. Морфофункциональные изменения в нейронах полей гиппокампа и слоев неокортекса крыс на фоне препарата «Полидан» // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137. № 6. С. 690-694.
9. Каптарь В.С., Курская О.В. Ультраструктурные изменения в нейронах мозга крыс под влиянием полидана // Научная конференция молодых ученых. Москва, ИВНД и НФ РАН. 2005. С. 61-62.
10. Курская О.В. Влияние полидана (натрия нуклеоспермат) на ультраструктурные изменения в поле СА3 дорзального гиппокампа крыс // Труды Первого Международного Междисциплинарного Конгресса

- «Достижения нейронауки для современной медицины и психологии». Судак. Крым, Украина. М.: МАКС Пресс. 2005. С. 107.
11. Курская О.В. Изменения структурно-метаболического состояния нейронов гиппокампа крыс под влиянием полидана // Вестник молодых ученых, приложение к серии «Науки о жизни»: материалы Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». СПб.: Изд-во СПбГУТД. 2005. С. 64.
  12. Лосева Е.В., Курская О.В., Каптарь В.С., Прагина Л.Л., Тушмалова Н.А. Влияние полидана на ультраструктурные изменения в нейронах мозга крыс // Научные труды I съезда физиологов СНГ. М.: Медицина-Здоровье. 2005. Т. 1. С. 55.
  13. Каптарь В.С., Курская О.В., Тушмалова Н.А., Прагина Л.Л., Лосева Е.В. Влияние полидана на ультраструктурные изменения в коре и гиппокампе мозга крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 8. С. 221-226.
  14. Курская О.В. Активация синтетических процессов в нейронах гиппокампа под влиянием полидана // Материалы XIII научной международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2006». Секция Биология. М: Макс-Пресс. 2006. С. 267-268.
  15. Курская О.В. Стимулятор гемопоза «Полидан» усиливает синтетические процессы в нейронах гиппокампа крыс // Труды Второго Международного Междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». Судак. Крым, Украина. М.:МАКС Пресс. 2006. С. 114-115.
  16. Курская О.В., Каптарь В.С., Тушмалова Н.А., Прагина Л.Л., Лосева Е.В. Полидан усиливает синтетические процессы в нейронах неокортекса и гиппокампа крыс // Материалы V международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения – 2006». Морфология. 2006. Т. 129. № 2. С. 51.
  17. Тушмалова Н.А., Курская О.В., Каптарь В.С., Прагина Л.Л., Лосева Е.В. Влияние полидана (дериват ДНК) на ультраструктурные метаболические показатели в нейронах старой и новой коры мозга крыс // Материалы IV международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». М.: 2006. – С. 73.
  18. Kurskaya O.V., Kaptar V.S., Tushmalova N.A., Loseva E.V. Stimulating effect of DNA derivative (polydan) on structural changes in neurons of the rat hippocampus // Abstracts of International Symposium “Hippocampus and memory” Puschino, Russia, 2006. P. 84.
  19. Курская О.В., Каптарь В.С., Тушмалова Н.А., Прагина Л.Л., Лосева Е.В. Структурно-метаболические изменения в нейронах гиппокампа и неокортекса мозга крыс под влиянием препарата «Полидан» // Морфология. 2007. (принята к печати 1 декабря 2006 г.).