

На правах рукописи

ЕВДОКИМОВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И МНЕСТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ У КРЫС ПРИ
ДЕЙСТВИИ ОЗОНИРОВАННОГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА**

03.03.01 – физиология

03.01.04 - биохимия

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Нижний Новгород - 2010

Работа выполнена в Центральной научно-исследовательской лаборатории
НИИ Прикладной и Фундаментальной медицины ГОУ ВПО
«Нижегородская государственная медицинская академия»

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор

Мухина Ирина Васильевна

доктор медицинских наук

Мирошин Сергей Иванович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Конторщикова
Клавдия Николаевна

доктор медицинских наук,
профессор

Перетягин
Сергей Петрович

Ведущая организация:

Российский государственный
медицинский университет
г. Москва

Защита состоится « 25 » ноября 2010 г. в « ____ » часов на заседании
Диссертационного совета Д 212.166.15 при ГОУ ВПО «Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (603950, Нижний
Новгород, пр. Гагарина, 23)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО
«Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
(603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23)

Автореферат разослан « _____ » октября 2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Копылова
Светлана Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Регуляция кислородного гомеостаза мозга является важной проблемой нейрофизиологии (Лукьянова Л.Д., 2004). Кислород, с одной стороны, является необходимым компонентом процессов генерации энергии, с другой стороны, осуществляет передачу сигналов из внешней и внутренней среды организма через регуляторные свободнорадикальные механизмы (Дубинина Е.Е., 2001; Сазонтова Т.Г., 2004; Сороко С.И., 2004; Дубинина Е.Е., 2006).

Изучение кислородзависимых и свободнорадикальных процессов нервной ткани является актуальной задачей фундаментальной и прикладной биологии и медицины.

В медицине разработаны и успешно применяются методы окислительной терапии, обладающие комплексным воздействием на организм. В настоящее время озон-кислородные смеси используются во многих странах мира, в том числе в России, для лечения широкого спектра заболеваний (Sartori Н.Е., 1994; Перетягин С.П., 2000). Биологическая активность озона, а отсюда и основные принципы его применения в медицине – это результат изменения свободнорадикального статуса организма в ответ на дозированный внешний источник активной формы кислорода (АФК), каковым и является озон-кислородная смесь (Бояринов Г.А., 1992; Перетягин С.П., 1992; Конторщикова К.Н., 1995). Выделяют две основные функции свободнорадикального окисления в организме. Во-первых, в физиологических условиях образующиеся в процессе метаболизма и клеточного дыхания АФК выступают в качестве сигнальных молекул в реакциях адаптации организма, играют важнейшую роль, участвуя в ключевых регуляторных механизмах живой клетки (Сазонтова Т.Г., 2004; Дубинина Е.Е., 2001). Во-вторых, при интенсификации свободнорадикального окисления АФК могут играть роль повреждающего фактора, приводящего к нарушению функции и гибели клеток. Иногда именно эта функция АФК используется в медицине с терапевтическими целями при лечении гнойных и антибиотикорезистентных заболеваниях. При этом используются высокие концентрации АФК, например, при озонотерапии критических состояний, которые могут параллельно бактериостатическому и бактерицидному действию оказывать токсическое действие на многие органы и ткани организма, в частности мозг.

Несмотря на более чем столетний опыт применения озона в биологии и медицине, работ, посвященных изучению механизмов прямого и опосредованного его действия на функциональное состояние нервной системы,

очень мало (Перетягин С.П., 1995; Custodio-Ramirez V., Paz C., 1997; Rivas-Arancibia S., 1998; Бояринов Г.А., Соколов В.В., 1999). Отмечаются следующие эффекты действия озонированных сред на мозг: анальгетический (Farmy, 1988), метаболическое действие (Moraleda, 1995), активация опиоидной системы мозга (Лапшин Р.Д., 2001). Имеются данные об использовании озонированного физиологического раствора (ОФР) при ишемии (Мухина И.В., 2000), для лечения дисциркуляторной энцефалопатии (Потехина Ю.П., 1997), черепно-мозговой травмы (Пилипенко Т.П., 2004), гипертонической болезни (Драпова Д.П., 2006).

Таким образом, в литературе в основном описывается влияние медицинского озона на уже патологически измененные ткани, и отсутствуют данные об исследовании нейротропного действия озонированных сред в условиях физиологической нормы. В качестве интегральной оценки нейротропного действия дозированного окислительного воздействия были выбраны поведенческие тесты, характеризующие безусловную и условную рефлекторную деятельность мозга, морфологические и биохимические параметры изменения функционирования нейронов.

Цель исследования – изучить влияние парентерального применения озонированного физиологического раствора с различными концентрациями растворенного озона на поведенческие и мнестические функции у крыс.

Задачи исследования:

1. Изучить дозозависимое влияние курсового применения озонированного физиологического раствора на двигательную активность и эмоциональное состояние экспериментальных животных в раннем и отдаленном периодах.
2. Оценить дозозависимое действие курсового применения озонированного физиологического раствора на сохранение и воспроизведение долговременной памяти у крыс.
3. Исследовать отдаленное действие курсового применения дозированного окислительного стресса на структуру моторной зоны коры головного мозга и показатели окислительного метаболизма в тканях мозга крыс.

Научная новизна

В диссертации впервые проведено комплексное исследование влияния озонированного физиологического раствора с различными концентрациями растворенного озона на морфофункциональное состояние головного мозга крыс в раннем и отдаленном периодах после воздействия. Выявлен дозозависимый эффект озонированного физиологического раствора на некоторые показатели морфофункционального состояния головного мозга крыс.

Впервые показано, что введение ОФР с концентрацией растворенного озона 0,7 мкг/мл вызывает нарушение воспроизведения долговременной памяти на фоне обратимых изменений в структуре моторной зоны коры головного мозга крыс и незначительном кратковременном повышении активности свободнорадикальных процессов в ткани мозга.

Установлено, что минимальное влияние на показатели поведенческой активности и мнестических функций ЦНС крыс оказало курсовое применение ОФР со средней концентрацией озона 1,7 мкг/мл.

Впервые выявлено, что внутрибрюшинное введение ОФР с концентрацией озона 2,5 мкг/мл оказывало угнетающее действие на показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс, вызывало нарушение ответных реакций на новизну обстановки, значительные необратимые изменения структуры большей части нейронов коры головного мозга в отдаленном периоде.

Введение озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона вызывает обратимое дозозависимое увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов в мозге крыс без изменения протекания аэробного окислительного метаболизма. В то же время, показано напряжение ферментных систем антиоксидантной защиты, проявляющееся в снижении активности супероксиддисмутазы (СОД) в первые сутки после окончания введения озонированного физиологического раствора и повышении активности каталазы в отдаленном периоде на 30-е сутки, в ответ на дозированное окислительное воздействие при введении озонированного физиологического раствора с концентрациями растворенного озона 1,7 и 2,5 мкг/мл.

Практическая и теоретическая значимость работы.

Полученные в работе данные о действии озонированного физиологического раствора с широким диапазоном концентраций на структурно-функциональное состояние коры головного мозга и высшие интегративные функции центральной нервной системы крыс расширяют теоретические представления о роли свободнорадикальных процессов в функционировании мозга.

Так как нервная регуляция играет важнейшую роль во многих процессах жизнедеятельности организма, полученные теоретические положения помогут определиться в использовании озонированного физиологического раствора для коррекции ряда заболеваний ЦНС (патент № 2009115283/14(020879)).

Положения, выносимые на защиту.

1. Курсовое внутривнутрибрюшинное введение озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона оказывает нейротропное действие, вызывая дозозависимое изменение двигательной активности и воспроизведения долговременных следов памяти на фоне сохранения эмоционального статуса крыс.
2. Курсовое применение озонированного физиологического раствора вызывает дозозависимые функциональные изменения структуры моторной зоны коры головного мозга крыс, обратимое увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов и повышение напряжения антиоксидантной системы в отдаленном периоде.

Апробация работы.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на VI Всероссийской конференции с международным участием «Озон в биологии и медицине» (Н Новгород, 2005); XX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва, 2007); X Всероссийской конференции молодых исследователей (Санкт-Петербург, 2007); VII Всероссийской конференции с международным участием «Озон в биологии и медицине». (Н.Новгород, 2007); PENS Partially supported School 2008 “Models in neuroscience: turning experiments into knowledge”(Санкт-Петербург, 2008); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Озон, активные формы кислорода и методы интенсивной терапии в медицине» (Н.Новгород, 2007); 14-ой Международной Пущинской школа-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2010).

Объем и структура работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав собственных исследований; заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 112 страницах и иллюстрирована 26 рисунками и 10 таблицами. Список литературы включает 147 источников, в том числе 96 отечественных и 51 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 177 белых нелинейных крысах – самцах массой 200 – 250 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Все процедуры обращения с экспериментальными животными соответствовали Приказу Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил

лабораторной практики в Российской Федерации» и согласованы с правилами, установленными этическим комитетом при ГОУ ВПО НижГМА Росздрава.

Введение физиологического раствора (ФР) и озонированного физиологического раствора (ОФР) осуществляли внутрибрюшинно в течение 12 суток через сутки в количестве 1 мл.

В первой серии (контроль) - внутрибрюшинно вводили 1 мл физиологического раствора; во второй серии вводили 1 мл ОФР с концентрацией растворенного озона 0,7 мкг/мл; в третьей серии - с концентрацией растворенного озона 1,7 мкг/мл; в четвертой серии - с концентрацией растворенного озона 2,5 мкг/мл (табл. 1).

Влияние ОФР на структуру коры больших полушарий головного мозга крыс и оценка двигательных и ориентировочно-исследовательских показателей проводилась после 1, 14, 30, 60 суток после введения.

Влияние ОФР на коэффициент сохранения памяти и интенсивность свободнорадикальных процессов оценивались через 1, 14 и 30 суток после введения.

Методы исследования структуры коры головного мозга крыс, поведенческой активности, интегративных функций ЦНС и окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс представлены в таблице 1.

Таблица 1

Методы исследования

Метод оценки поведенческих реакций	Тест «открытое поле» (Буреш Я. и др., 1991)
Метод исследования долговременной памяти	Водный лабиринт Морриса (Morris R. J., 1984)
Оценка структуры моторной зоны неокортекса	Световая микроскопия Окраски: гематоксилином и эозином, по Нисслю
Состояние свободнорадикального окисления и направленность аэробных/анаэробных процессов в ткани мозга	1. Индуцированная хемилюминесценция (I max, S) (Кузьмина Е.И. и др., 1983); 2. Супероксиддисмутаза (Nishirimi M, 1972); 3. Каталаза (Aebi H, 1970) 4. Количество лактата и пирувата в ткани мозга животных (Асатиани В.С., 1965, Кочетов П.А., 1980)

Полученные данные были обработаны с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Статистическую оценку достоверности межгрупповых отличий проводили по критериям непараметрической статистики, используя: критерий Манна - Уитни и к Вилкоксона. Выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p < 0,05$ (Гланц С., 1998; Реброва О.Ю., 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Влияние озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона на показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс

В тесте «открытое поле» регистрировали следующие показатели поведенческой активности крыс: горизонтальная двигательная активность (число пересеченных квадратов), вертикальная двигательная активность (число стоек-подъемов на задние лапы), время замирания животных, число актов груминга, дефекации, мочеиспускания, а также количество реакций принюхивания, верчения, пачения и уровень тревожности крыс.

При оценке влияния курсового применения ОФР на изменение двигательной активности крыс было установлено достоверное снижение горизонтальной двигательной активности (рис.1) только в группе с введением ОФР в концентрации 2,5 мкг/мл на первые и четырнадцатые сутки по сравнению с показателями в других группах, что отражает пассивно-оборонительную тактику поведения крыс в ответ на дозированный окислительный стресс, которым и является введение озонированного физиологического раствора (V. Vossì, 1996).

Это, вероятно, объясняется физиологическим действием образующихся при озонлизе свободных радикалов, которое реализуется через стимуляцию эндогенной опиоидной системы (ЭОС). Известно, что активация опиоидной рецепции сопровождается повышением K^+ - проводимости мембраны и/или снижением Ca^{2+} -проводимости мембраны, что ведет к принципиально общему конечному результату – уменьшению входа Ca^{2+} в пресинаптические окончания во время прохождения потенциала действия и к снижению количества высвобождаемого нейромедиатора (пресинаптическая модуляция) или гиперполяризации постсинаптической мембраны (постсинаптическая модуляция) и, как следствие, преобладание процессов торможения над

процессами возбуждения в ЦНС (И.П. Ашмарин, 1996). Также под активацией ЭОС, в настоящее время принято понимать, в первую очередь, увеличение синтеза, прицельного протеолиза и высвобождения эндогенных опиоидных пептидов – эндорфинов, энкефалинов и др. Имеется большое количество данных о влиянии ЭОП на обучение и память. β -эндорфин в малых дозах ингибирует процесс обучения, активирует эмоциональные реакции, а при использовании высоких доз наблюдается противоположный эффект.

В отдаленном периоде спустя 14 суток после окончания курсового введения ОФР уровень ориентировочно-исследовательской активности по сравнению с контролем также достоверно ниже только в группе с введением высоких концентраций озона (рис.2, 3).

Последствия перенесенного окислительного стресса сказываются на протяжении длительного периода, что отражается в значительных изменениях значений горизонтальной и вертикальной двигательной активности (ГДА и ВДА), признаваемых важными поведенческими показателями (Саркисова К.Ю., 1996). Сложный характер изменения показателей двигательной активности, характеризующих возбуждательные процессы нервной системы, отражает, вероятно, сложную динамику восстановительных процессов в нейронных сетях мозга (Ведяев Ф.П., Чернобай Л.В., 1981).

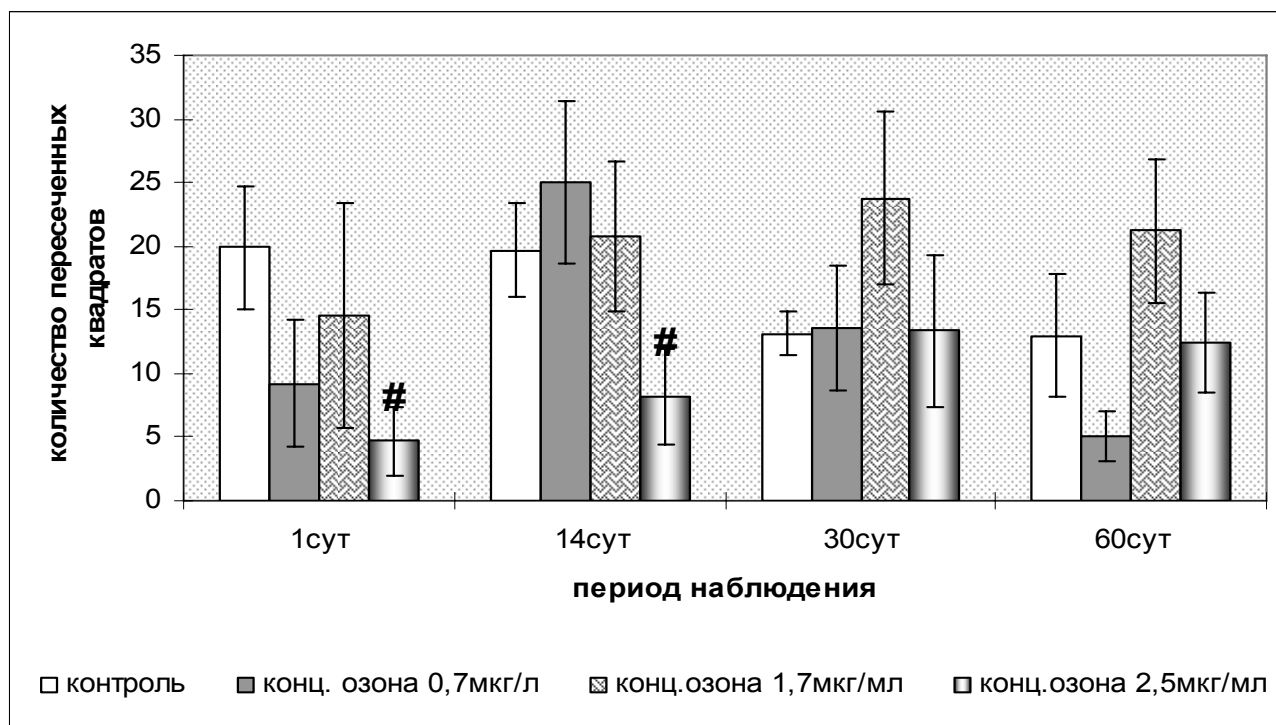


Рис.1. Влияние озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона на изменение горизонтальной двигательной активности крыс:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

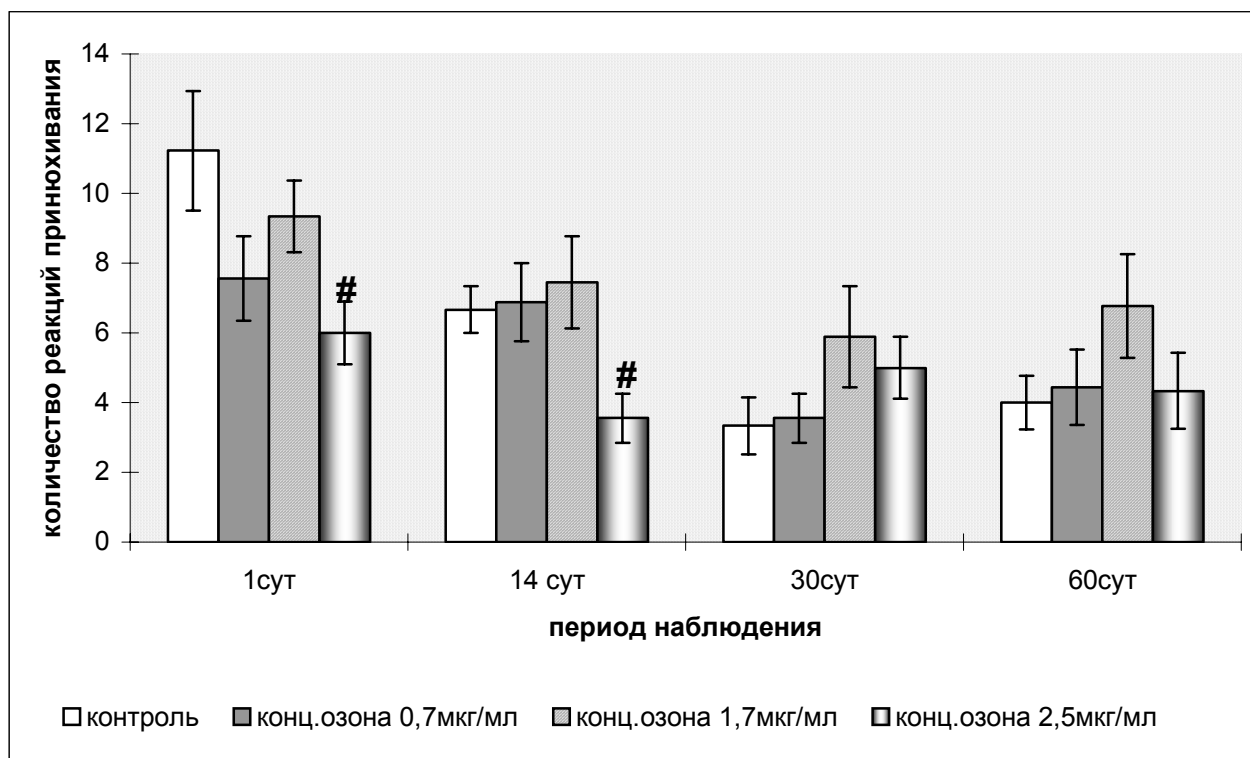


Рис.2. Влияние озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона на изменение количества реакций приноживания:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

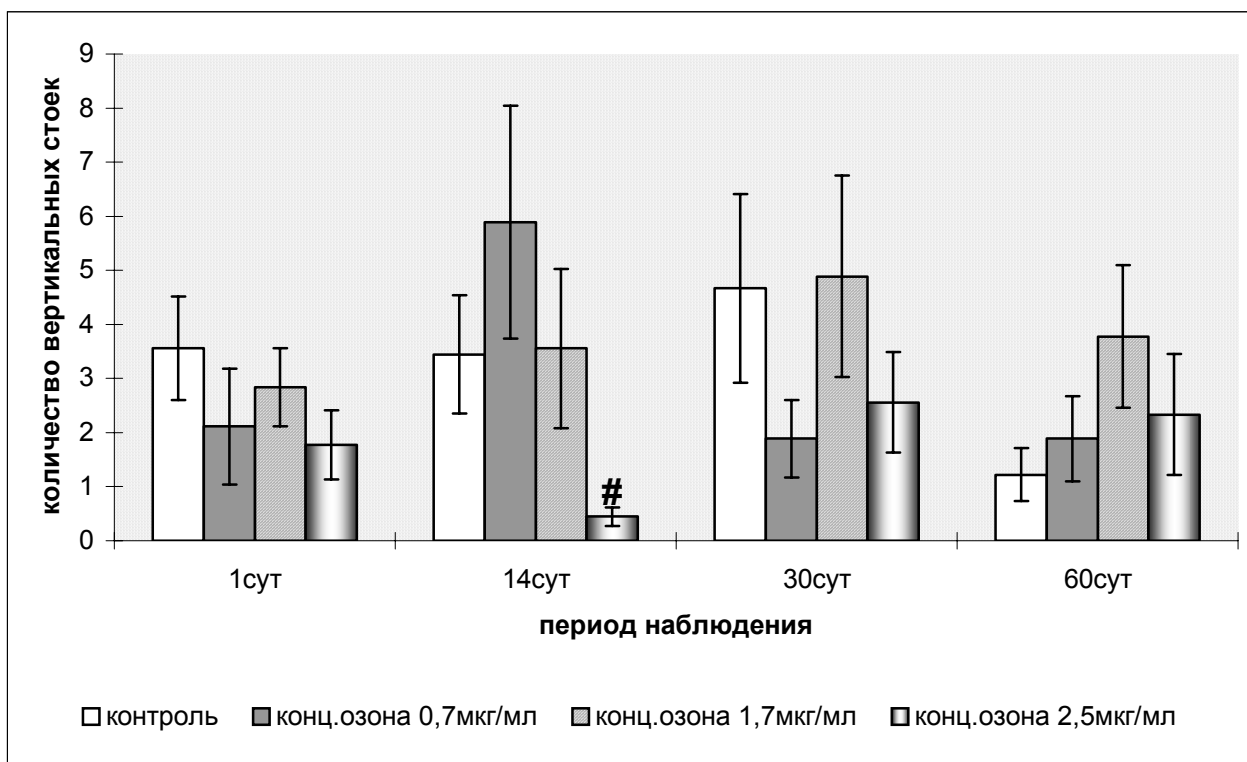


Рис.3. Влияние озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона на изменение количества вертикальных стоек:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

При оценке влияния ОФР с различными концентрациями озона на время замирания животных на первые сутки после окончания курсового введения, было установлено достоверное повышение данного показателя в группе с максимальной концентрацией озона по сравнению с контрольной группой. Спустя 14 суток после окончания курсового введения ОФР в группе с введением ОФР с концентрацией озона 2,5 мкг/мл также наблюдается увеличение времени замирания животных по сравнению с контрольной группой. На 30 и 60 суток после окончания курсового введения ОФР в опытных группах достоверных различий с контролем по данному показателю не выявлено (рис.4).

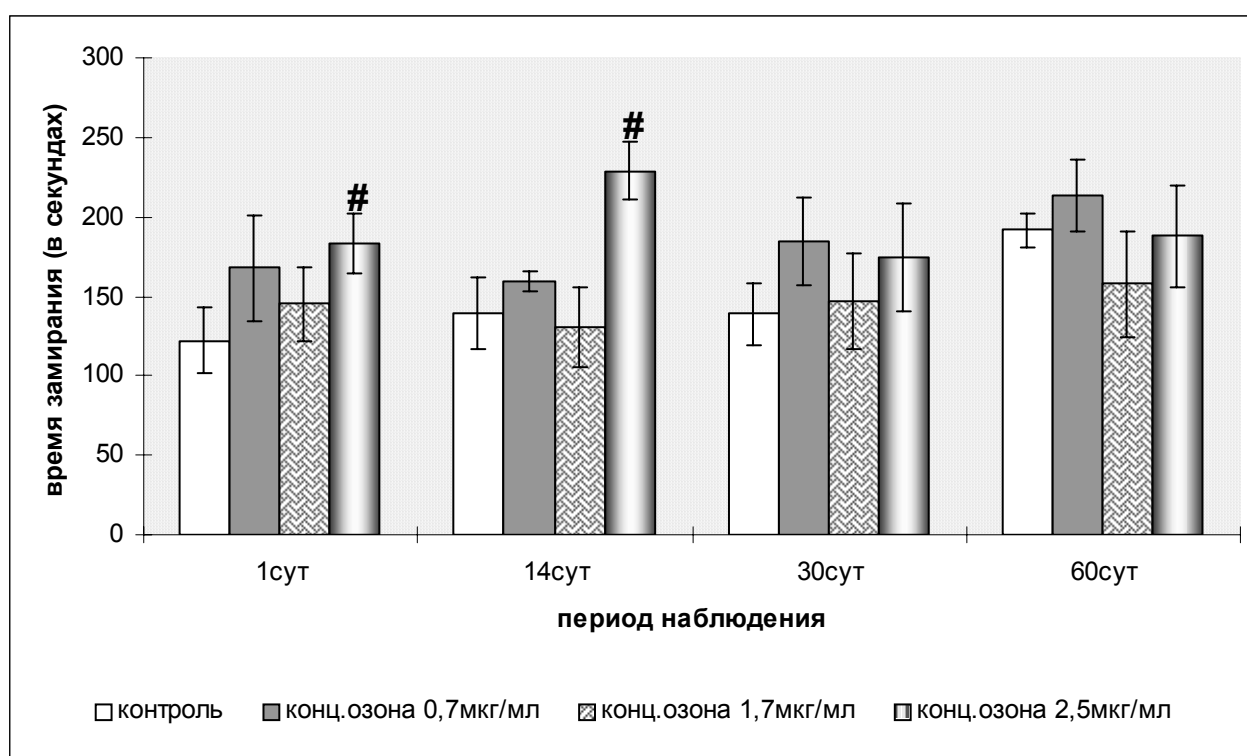


Рис.4. Влияние озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона на изменение времени замирания животных:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

Важно отметить, что курсовое применение озонированного физиологического раствора со всеми исследуемыми концентрациями не оказывало влияния на уровень тревожности животных в течение всего эксперимента. В отдаленном периоде наблюдается восстановление поведенческих процессов, особенно быстро оно происходит у групп крыс с концентрацией озона в ОФР 1,7 и 0,7 мкг/мл.

2. Влияние озонированного физиологического раствора различных концентраций на сохранение долговременной памяти у крыс

В начале эксперимента животных обучали решению вероятностной задачи при консолидации долговременной памяти при постоянном положении цели в водном лабиринте. После окончания обучения животным внутрибрюшинно многократно вводили ОФР. Сохранение долговременной памяти у животных оценивали с помощью отсроченного коэффициента сохранения (оКс) (табл.2). Отсроченный коэффициент сохранения – доля времени пребывания крысы в квадранте, где находилась платформа, по отношению к общему времени пребывания крысы в водном лабиринте Морриса. При этом считается нормой, если животное провело в квадранте, где находилась платформа, около 25% общего времени пребывания в лабиринте (D'Hooge & De Deyn, 2001). Изменение стратегии поиска платформы оценивали по изменению траектории животных при отсроченном тестировании при помощи графиков значимости секторов лабиринта Морриса.

Таблица 2

Значение отсроченного коэффициента сохранения долговременной памяти у крыс после курсового применения ОФР, усл.ед.

Период исследования/ группы животных	1 сутки	14 сутки	30 сутки
контроль	24,3±1,0	23,3±0,9	22,3±1,3
0,7 мкг/мл	22,7±2,2	22,0±2,4	14,8±2,0#
1,7 мкг/мл	23,7±1,7	26,5±2,1	24,6±1,5
2,5 мкг/мл	20,2±0,8#	18,4±1,6#	17,6±2,1#

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

При оценке влияния ОФР на сохранение долговременной памяти животных на первые сутки после окончания курсового введения, было установлено достоверное снижение отсроченного коэффициента сохранения в группе с высокой концентрацией озона. Значения отсроченного коэффициента сохранения в группе с минимальной и средней концентрациями озона не отличаются от показателей контрольной серии.

На 14 сутки после окончания курсового введения ОФР с различными концентрациями озона наблюдается снижение отсроченного коэффициента сохранения в группе с высокой концентрацией озона. Значения оКс в группе с минимальной и средней концентрацией озона не отличаются от показателей контрольной группы.

В отдаленном периоде через 30 суток после курсового введения ОФР отмечается достоверное снижение значения отсроченного коэффициента сохранения в группах с минимальной и максимальной концентрациями озона по сравнению с контрольной серией. Показатели оКс в группе со средней концентрацией озона не отличаются от данного значения в контрольной группе.

Так как при проведении отсроченного теста в водном лабиринте Морриса животные могли бы достигнуть цели, если бы платформа находилась в водном лабиринте, было изучено изменение стратегии поиска платформы с течением времени и введением озонированного физиологического раствора различных концентраций (рис. 5, 6).

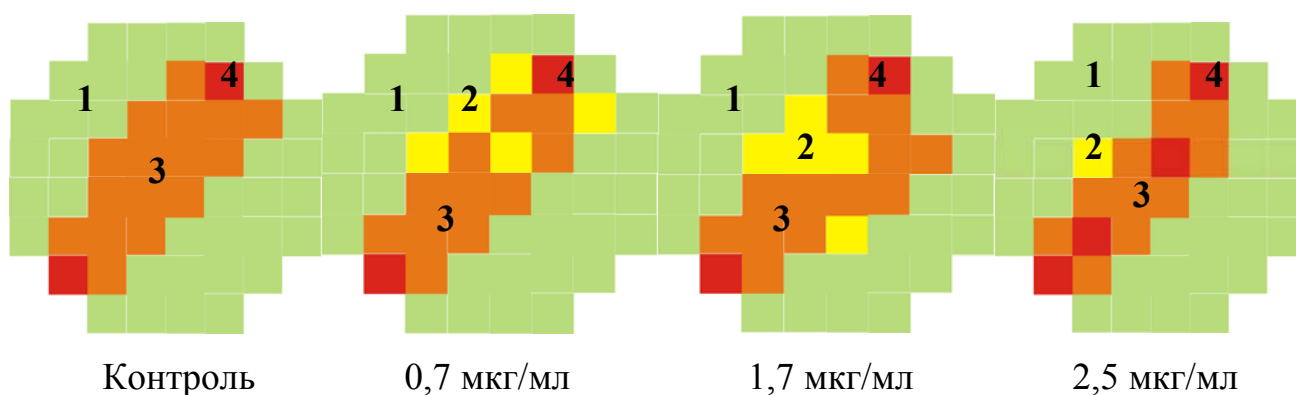


Рис.5. Влияние озонированного физиологического раствора на сохранение научения у крыс спустя 1 сутки после окончания курсового введения ОФР. 1 – сектор не посещался или посещался 1 раз; 2 – сектор посещался 2 раза; 3 – сектор посещался 3 раза; 4 - сектор посещался не менее 4-х раз.

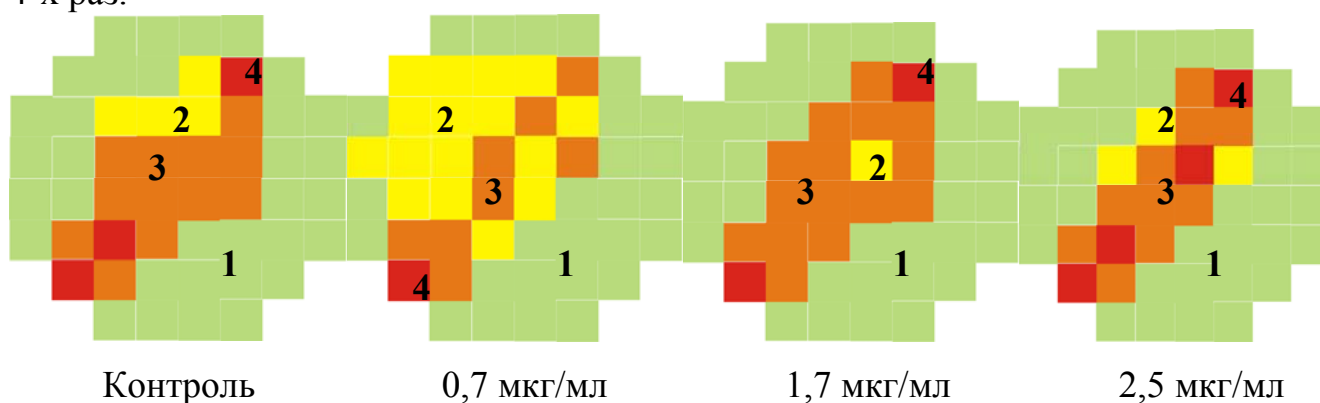


Рис.6. Влияние озонированного физиологического раствора на сохранение научения у крыс через 14 суток после окончания курсового введения ОФР. 1 – сектор не посещался или посещался 1 раз; 2 – сектор посещался 2 раза; 3 – сектор посещался 3 раза; 4 - сектор посещался не менее 4-х раз.

При изучении влияния озонированного физиологического раствора на сохранение долговременной памяти при применении концентрации растворенного озона 0,7 мкг/мл выявлено значительное его влияние на воспроизведение долговременной памяти и, как следствие, на сформированную стратегию поиска цели в водном лабиринте. В отсроченных тестах на сохранение долговременной памяти животные данных групп вели себя наиболее неуверенно и тревожно, что выразилось в большем количестве пересечений секторов бассейна и отсутствии выраженной стратегии поиска цели.

Введение ОФР с концентрацией растворенного озона 1,7 мкг/мл оказало незначительное влияние, т.к. с течением времени значение оКс и выраженность стратегии поиска цели увеличились, то есть сохранение долговременной памяти осталось неизменным.

В результате исследования групп животных с введением ОФР с концентрацией растворенного озона 2,5 мкг/мл были получены низкие показатели оКс и одновременно фактически полное сохранение стратегии поиска цели по сравнению с контрольными животными. Но при этом явно выражены нарушения ответных реакций на новизну обстановки, вследствие которых животные, не найдя платформы, переходят на хаотический поиск без учета прошлого опыта.

Современные исследования мозга свидетельствуют, что актуализация следов памяти требует одновременной активации многих структур мозга, каждая из которых выполняет специфическую функцию по отношению к процессам памяти. Процессы памяти связывают с фронтальной, височной и париетальной корой, мозжечком, базальными ганглиями, миндалиной, гиппокампом, неспецифической системой мозга.

Процесс формирования следа памяти характеризуется перемещением локусов активности по структурам мозга. Вновь формируемая энграмма в отличие от старого следа памяти представлена в мозге более широкой зоной активации.

Актуализация следа памяти предполагает обязательное появление активации в префронтальной коре, которая в режиме рабочей памяти обеспечивает считывание информации из основного хранилища памяти – височной и теменной коры – и интеграцию ее на нейронах префронтальной коры. На пространственную локализацию активации влияет специфика информации, содержащейся в энграмме, которая выбирается в соответствии с решаемой задачей в системе целенаправленного поведения (Виноградова О.С., 1975).

Известно, что гиппокамп обладает целым рядом структурных и функциональных свойств, обеспечивающих записи и извлечения индивидуального опыта. Изменения структуры гиппокампа характеризуются неспособностью соотносить новую информацию с той, которая была получена ранее (Nicholls, Robert, 2003).

3. Влияние озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона на структуру моторной зоны коры больших полушарий головного мозга крыс

Воздействие ОФР на структуру нейронов и ткани мозга оценивали по степени выраженности периваскулярного, перинейронального и перинуклеарного отека, а также по расположению хроматина в ядре, наличию ядрышек. Исследования показали, что изменение структуры неокортекса имеет дозозависимый характер и наиболее выражены через 14 суток после введения ОФР.

При применении ОФР с концентрацией озона **0,7 мкг/мл** через 14 суток после введения наблюдался умеренный периваскулярный отек, появлялся отек вокруг отдельных нейронов, в половине клеток хроматин агрегирован к периферии ядра, встречался отек и инвагинация ядер, ядрышки иногда отсутствовали.

В отдаленном периоде к 30 суткам после окончания курсового введения ОФР нарушения структуры моторной зоны неокортекса менее выражены. Наблюдается уменьшение периваскулярного отека, хроматин в большинстве нейронов расположен равномерно, хотя сохраняется незначительный перинейрональный отек. К 60 суткам после окончания курсового введения ОФР с концентрацией растворенного озона 0,7 мкг/мл наблюдается восстановление нейрональных структур на фоне сохранения незначительного отека вокруг сосудов и нейронов (рис 7).

При применении ОФР с концентрацией озона **1,7 мкг/мл** через 14 суток выявлен выраженный периваскулярный и перинейрональный отек, во всех препаратах отмечен отек и инвагинация ядер, наблюдается агрегация хроматина к периферии ядра, ядрышки в половине клеток отсутствуют. В 60% случаев выявляется нарушение целостности ядерной оболочки нейронов.

К 60 суткам после окончания курсового введения ОФР отека серого вещества мозга не выявлено, все слои моторной зоны неокортекса четко определяются. Наблюдается выраженный отек вокруг крупных сосудов, умеренный перинейрональный отек. В ганглионарном слое в нейронах хроматин расположен равномерно, ядрышки иногда отсутствуют, отмечается выпадение нейронов с появлением клеток-«теней» (рис.8).

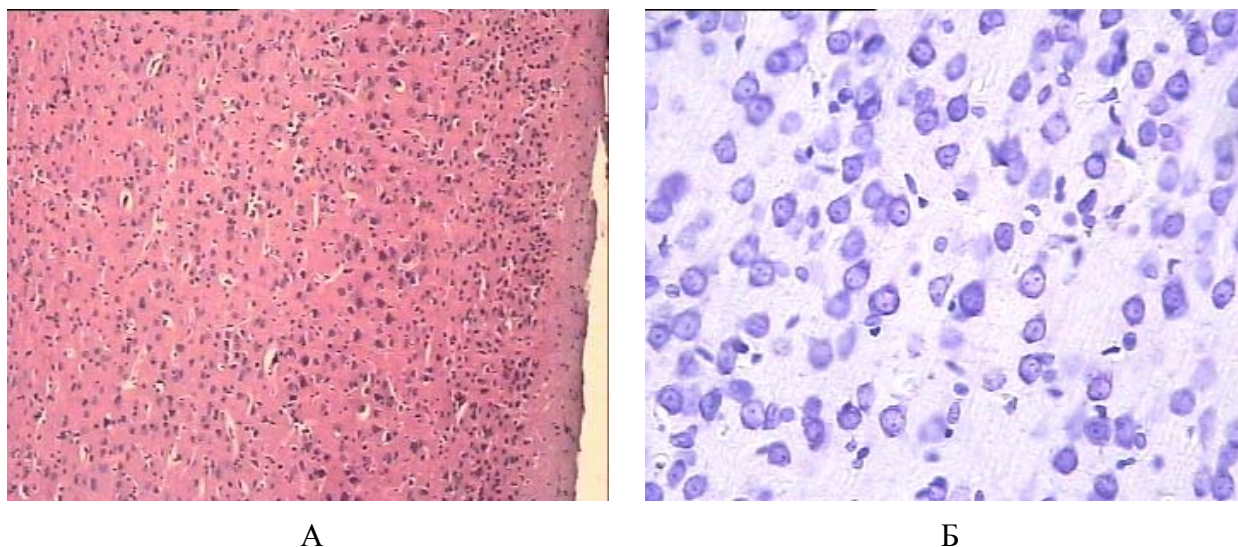


Рис.7. Структура моторной зоны коры больших полушарий головного мозга крыс через 60 суток после введения ОФР с концентрацией озона 0,7 мкг/мл. Окр.: гематоксилин-эозин (А), x100; по Нислю (Б). x400.

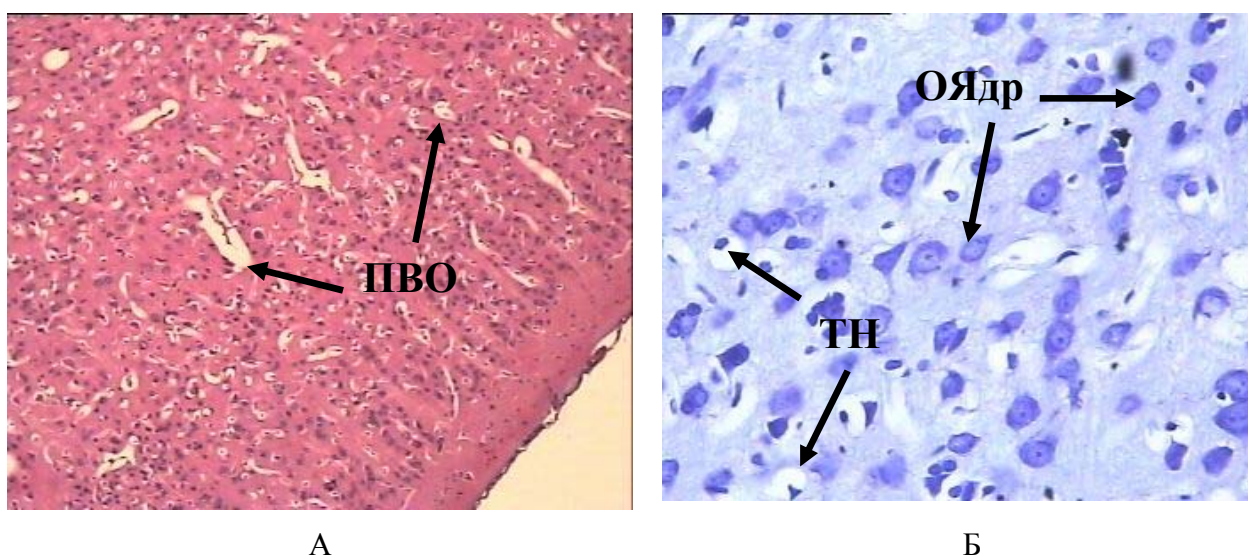


Рис.8. Структура моторной зоны коры больших полушарий головного мозга крыс через 60 суток после введения ОФР с концентрацией озона 1,7 мкг/мл. Окр.: гематоксилин-эозин (А), x100; по Нислю (Б), x400. ПВО – периваскулярный отек, ОЯдр – отсутствие ядрышка, ТН – «тени» нейронов.

При применении ОФР с концентрацией озона **2,5 мкг/мл** через 14 суток после введения наблюдался сильный периваскулярный и перинеурональный отеки, умеренный отек вокруг ядер. Агрегация хроматина по периферии и отсутствие ядрышек в половине клеток. Встречались инвагинация и разрушение ядерной оболочки. В 50% случаев выявлено появление «клеток – теней».

При световой микроскопии препаратов неокортекса в отдаленном периоде *через 60 суток* после окончания курсового введения ОФР отека серого вещества мозга не выявлено, слои моторной зоны коры хорошо определяются. Выявляется лишь сильный отек вокруг крупных сосудов и умеренный перинейрональный отек. В ганглионарном слое в нейронах ядра имеют округлую форму, наблюдается равномерное расположение хроматина в ядре, наличие ядрышек практически во всех клетках, однако продолжают встречаться участки с выпадением нейронов (рис.9).

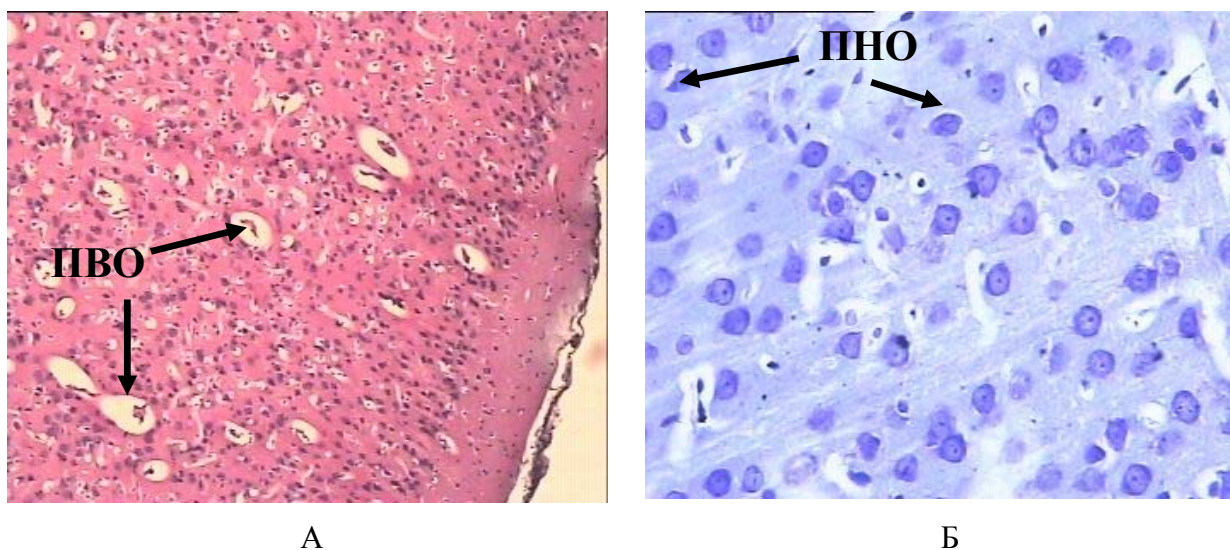


Рис.9. Структура ткани моторной зоны коры больших полушарий головного мозга крыс через 60 суток после введения ОФР с концентрацией озона 2,5 мкг/мл. ПВО – периваскулярный отек, ПНО – перинуклеарный отек Окр.: гематоксилин-эозин (А), ув. x100; по Ниссля (Б). ув.х400.

Таким образом, присутствие озона даже в малых концентрациях в озон-кислородной смеси, растворенной в физиологическом растворе, приводит к изменениям структуры моторной зоны неокортекса у крыс. Агрегация хроматина свидетельствует о снижении синтетической активности, структурных изменениях окисленных белков. Сморщивание и инвагинация ядер свидетельствует о снижении функциональной активности клеток. Распад ядрышек является признаком снижения синтеза РНК в клетках.

Проведенные гистологические исследования препаратов неокортекса выявили нарастание изменений структуры ткани мозга пропорционально концентрации растворенного озона в ОФР. В серии с введением ОФР с концентрацией растворенного озона 2,5 мкг/мл выявляются необратимые структурные нарушения, как в микроциркуляторном русле, так и в нейронах.

5. Влияние озонированного физиологического раствора на интенсивность свободнорадикальных процессов в ткани мозга

Исследование изменений свободнорадикальных процессов и антиоксидантной активности в ткани головного мозга крыс было проведено на 1, 14 и 30 сутки после окончания курсового внутрибрюшинного введения ОФР.

В результате исследования выявлено дозозависимое увеличение интенсивности свободнорадикальных процессов на 1 сутки после введения ОФР во всех экспериментальных группах (рис. 10). Также на 1 сутки характерно напряжение системы антиоксидантной защиты для всех исследуемых животных с введением ОФР.

Через сутки после введения ОФР выявлено снижение уровня СОД (рис.11) с последующим восстановлением на 30 сутки на фоне увеличения активности каталазы на 30 сутки (рис.12), что согласуется с данными литературы (Волховская Н.Б., 2008).

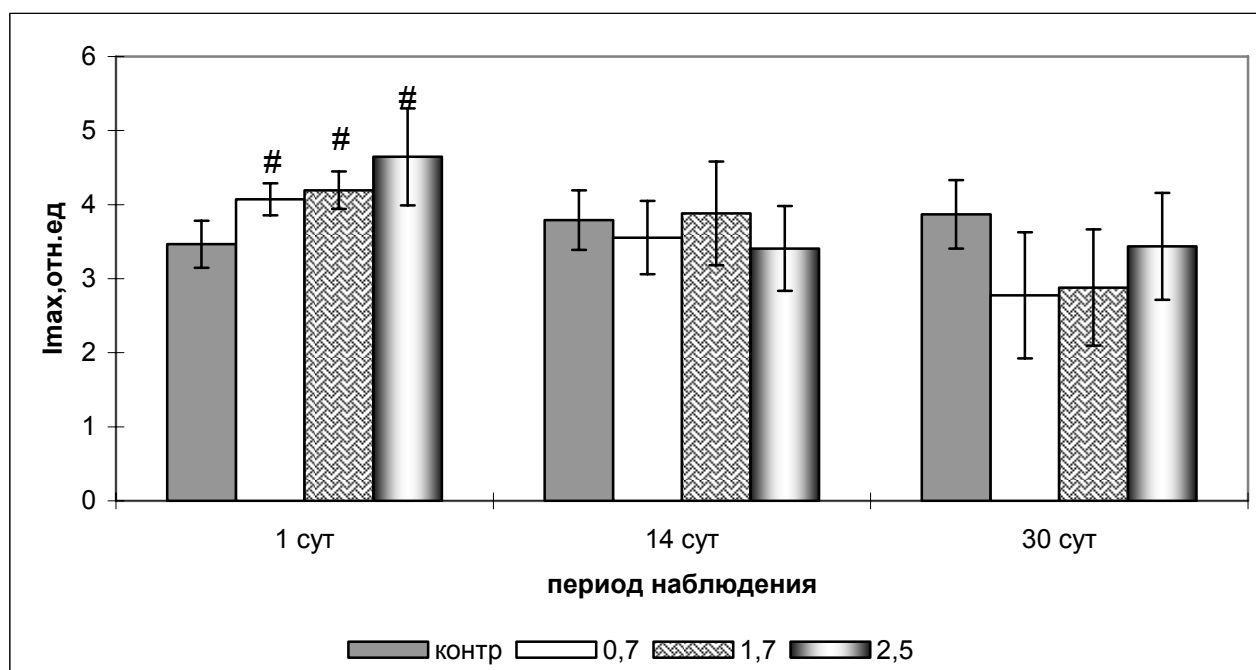


Рис.10. Влияние озонированного физиологического раствора на изменение максимальной интенсивности хемилюминесценции:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

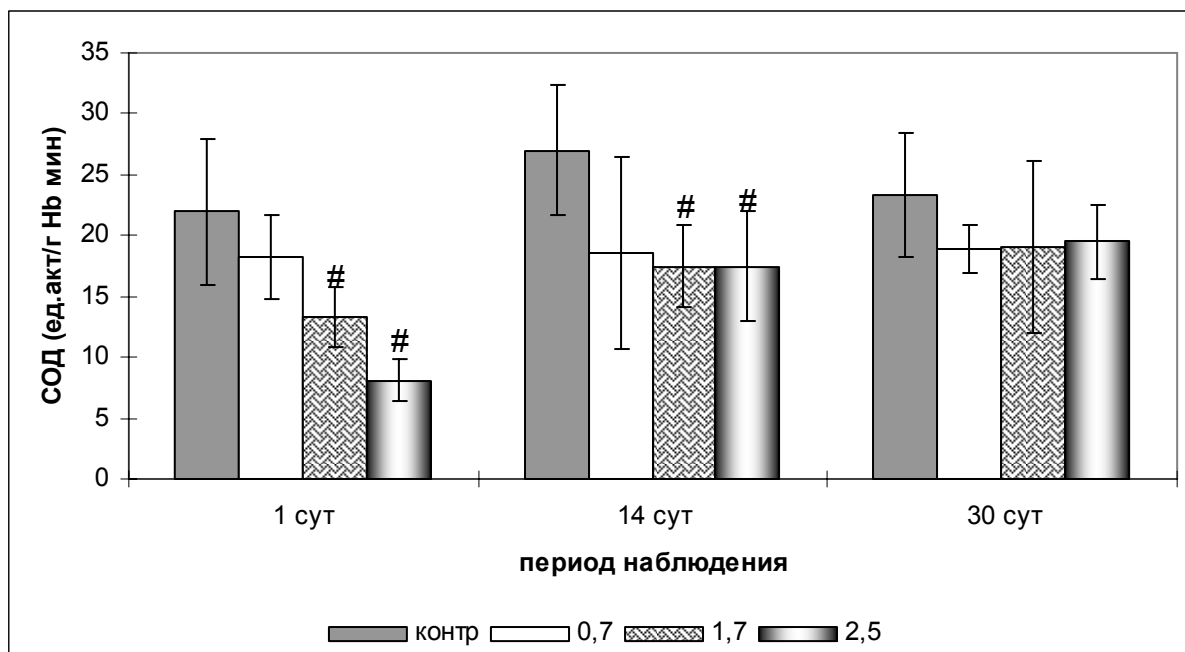


Рис. 11. Влияние озонированного физиологического раствора на изменение активности супероксиддисмутазы:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

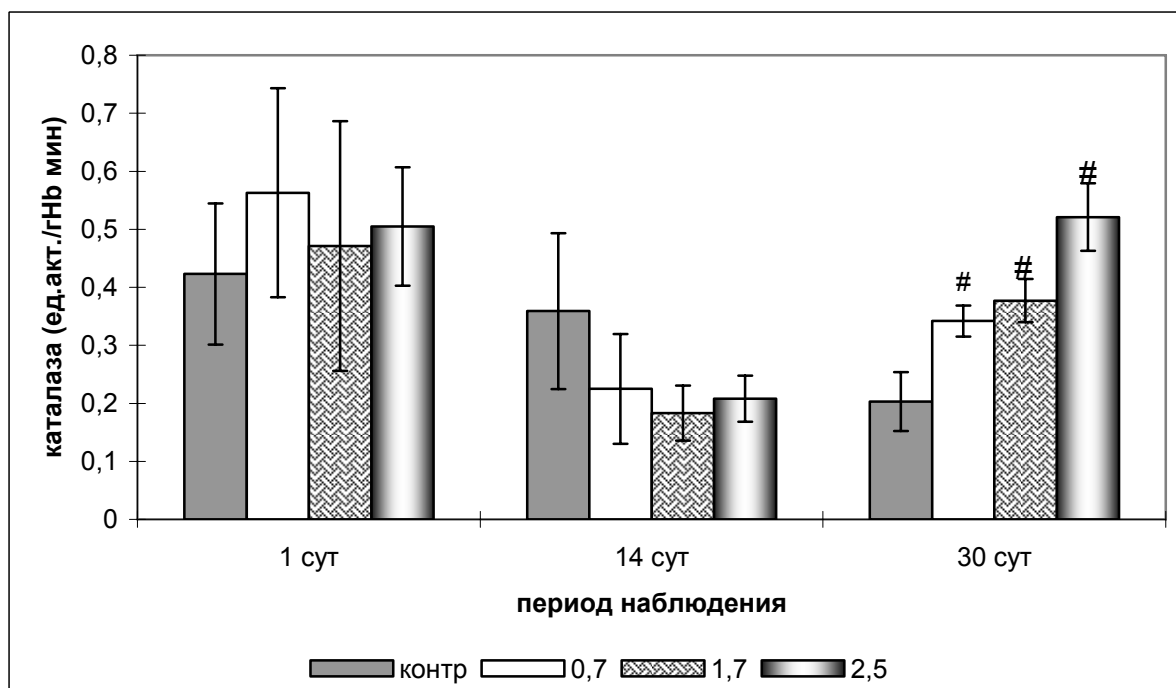


Рис.12. Влияние озонированного физиологического раствора на изменение активности каталазы:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

При изучении изменений уровня лактата и пирувата в ткани головного мозга крыс гипоксических изменений и усиления анаэробного метаболизма в

ткани мозга при курсовом введении озонированного физиологического раствора с различными концентрациями растворенного озона от 0,7 до 2,5 мкг/кг как раннем, так и отдаленном периоде после окончания курсового введения не выявлено (рис.13). Несмотря на выявленное достоверное снижение лактата на 30 сутки не наблюдается изменения соотношения лактат/пируват, являющегося показателем направленности окислительных метаболических процессов в тканях.

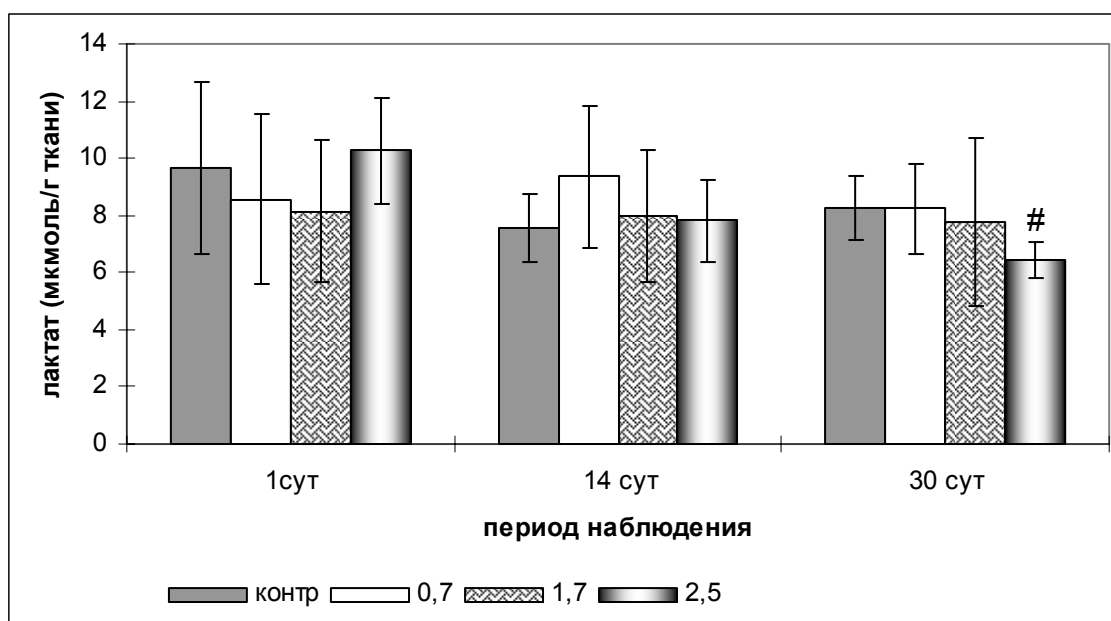


Рис.13. Влияние озонированного физиологического раствора на изменение уровня лактата:

- достоверность различий от показателей контрольной серии, $p < 0,05$

Таким образом, введение озонированного физиологического раствора с различными концентрациями озона оказывает дозированный оксидативный стресс, выражающийся в увеличении интенсивности свободнорадикальных процессов в мозге в раннем периоде после введения и напряжении антиоксидантной системы в отдаленном периоде.

ВЫВОДЫ

1. Применение озонированного физиологического раствора с концентрацией растворенного озона 0,7 и 1,7 мкг/мл не оказывало влияния на показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных. После курсового введения ОФР с концентрацией озона 2,5 мкг/кг наблюдалось снижение двигательной активности у крыс, что отражало

пассивно-оборонительную тактику поведения животных в ответ на дозированный окислительный стресс.

2. Курсовое введение озонированного физиологического раствора интактным крысам не оказывало влияния на эмоциональность и показатели тревожно-фобического состояния крыс.

3. Курсовое введение озонированного физиологического раствора с концентрацией растворенного озона 0,7 мкг/мл ухудшало воспроизведение долговременной памяти и, как следствие, сформированную стратегию поиска цели в водном лабиринте в отсроченных тестах на сохранение долговременной памяти. Многократное применение средних концентраций озона, растворенного в физиологическом растворе, не влияло на поведение крыс как в раннем, так и отдаленном периоде.

4. Курсовое введение озонированного физиологического раствора с концентрацией растворенного озона 2,5 мкг/мл вызывало нарушение ответных реакций на новизну обстановки и одновременно фактически полное сохранение стратегии поиска цели при тестировании в лабиринте Морриса.

5. Сравнение структуры моторной зоны коры больших полушарий головного мозга крыс в разные сроки после применения озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 0,7 – 1,7 мкг/мл выявило наиболее выраженные, но обратимые изменения в отдаленном периоде на 14 сутки, выражающиеся в повышении проницаемости сосудов, снижении синтетической активности нейронов, повреждении клеточных мембран. Применение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 2,5 мкг/мл приводило к необратимым структурным нарушениям, как в микроциркуляторном русле, так и в нейронах в отдаленном периоде.

6. Курсовое введение озонированного физиологического раствора интактным животным вызывало кратковременное дозозависимое повышение активности свободнорадикальных реакций в мозге крыс. В ответ на дозированное окислительное воздействие при введении озонированного физиологического раствора с концентрациями растворенного озона 1,7 и 2,5 мкг/мл наблюдалось напряжение ферментных систем антиоксидантной защиты, проявляющееся в снижении активности СОД в первые сутки после окончания введения озонированного физиологического раствора и повышении активности каталазы в отдаленном периоде на 30-е сутки.

7. Установлено отсутствие гипоксических изменений и усиления анаэробного метаболизма в ткани мозга при курсовом введении озонированного физиологического раствора с различными концентрациями

растворенного озона от 0,7 до 2,5 мкг/кг как раннем, так и отдаленном периоде после введения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Мухина И.В. Структура неокортекса крыс после парентерального применения озонированного физиологического раствора / Мухина И.В., **Евдокимова О.С.**, Жемарина Н.В.// Морфология. - 2006, №4. - с.89.
2. Мухина И.В. Структурно-функциональные изменения головного мозга крыс при парентеральном действии озонированного физиологического раствора/ Мухина И.В., **Евдокимова О.С.**, Жемарина Н.В., Миронов А.А. // Нижегородский медицинский журнал. №2, вып. 1, 2008. – с. 145.
3. **Евдокимова О.С.**, Миронов А.А., Жемарина Н.В. Влияние озонированного физиологического раствора на морфофункциональное состояние головного мозга и сохранение долговременной памяти у крыс // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород, 2010. - № 2 (часть 2), с. 354-357.
4. Медяник И.А. «Способ временного повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера»/ Мухина И.В., Яковлева Е.И., Рахчеева М.В., **Евдокимова О.С.** Положительное решение о выдаче патента на изобретение № 2009115283/14(020879) от 12.04.2010.
5. **Евдокимова О.С.**, Влияние озонированного физиологического раствора на структуру неокортекса крыс / **Евдокимова О.С.**, Жемарина Н.В. // Морфология. - 2010, №4. - с.71.

Статьи в региональных изданиях и материалах конференций

6. Мухина И.В. Влияние однократного применения озонированного физиологического раствора на структуру неокортекса интактных крыс / Мухина И.В., Жемарина Н.В., Яковлева Е.И., **Евдокимова О.С.**, Рахчеева М.В. // «Озон в биологии и медицине» Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием. – Нижний Новгород – 2005. – С. 23-25.
7. Mukhina I.V. The dose dependent effect of ozonated physiological solution on arterial vasodilatation. / Mukhina I.V., Dydina E.V., Yakovleva E.I., Zhemarina N.V., **Evdokimova O.S.**, Prodanecs N.N.// Materials of World congress IOA17. Strasburg, France, 2005, 22-26 aug.

8. Мухина И.В. Функциональное состояние головного мозга крыс при парентеральном применении озонированного физиологического раствора / Мухина И.В., **Евдокимова О.С.**, Жемарина Н.В., Миронов А.А. // Материалы XX съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова - Москва, 2007, 4-8 июня, с.345
9. Евдокимова О.С. Морфофункциональное состояние головного мозга крыс при парентеральном действии озона / **Евдокимова О.С.** // Материалы X Всероссийской конференции молодых исследователей - Санкт-Петербург, 2007, 20-21 апр., с.131.
10. Мухина И.В. Влияние озонированного физиологического раствора на морфофункциональное состояние головного мозга крыс / Мухина И.В., **Евдокимова О.С.**, Жемарина Н.В., Миронов А.А. // «Озон в биологии и медицине». Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием - Н.Новгород, 19-21 сент. 2007г - Казанский медицинский журнал (Приложение) 2007; 88(4): 9-10.
11. Мухина И.В. К вопросу о взаимодействии озона с водой и водными растворами хлорида натрия / Мухина И.В., Обухова Л.М., **Евдокимова О.С.**, Сибиркин А.А. // «Озон в биологии и медицине» Материалы IV Украинско-Русской конференции с международным участием - Украина, 8-10 мая 2008- Вестник физиотерапии и курортологии 2008; 5: 8-9.
12. Обухова Л.М. Разложение озона в водных растворах: кинетика и побочные продукты / Обухова Л.М., Конторщикова К.Н., Мухина И.В., Сибиркин А.А., Гусовский Д.И., **Евдокимова О.С.**, Чернова О.Ю. // «Озон, активные формы кислорода и методы интенсивной терапии в медицине» Материалы к VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Revista Ozonoterapia, Num.1, Vol.3 Suppl., September 2009, с. 49-51.
13. **Евдокимова О.С.** Влияние парентерального применения озонированного физиологического раствора на функциональное состояние головного мозга крыс / **Евдокимова О.С.**, Миронов А.А. // Материалы 14 Международной Пущинской школы-конференции «Биология – наука XXI века» - Пущино, 2010, 19-23 апр., Том 1, С. 127.
14. **Евдокимова О.С.** Функциональные изменения головного мозга крыс при парентеральном действии озонированного физиологического раствора // Материалы XXI съезда физиологического общества им. И.П.Павлова – Калуга, 2010, с. 199.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ВДА – вертикальная двигательная активность

ГДА – горизонтальная двигательная активность

оКс – отсроченный коэффициент сохранения

ОФР – озонированный физиологический раствор

СОД – супероксиддисмутаза

ЦНС – центральная нервная система

ЭОП – эндогенные опиоидные пептиды

ЭОС - эндогенная опиоидная система