

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 547.461.4:616.831-002:612.013.1:599.323.4

Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М.

Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

В развитии возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний ключевая роль отводится устойчивой провоспалительной активации микроглии и опосредованным реактивной микроглией окислительному стрессу, нейровоспалению, астроглиальной дисфункции. Конститутивная экспрессия микроглиями сукцинатного рецептора SUCNR1/GPR91, формирование новых представлений о сукцинате как иммунометаболите (метабокин) и отсутствие исследований влияния сукцинатной сигнализации на морфофункциональное состояние резидентных иммунных клеток ЦНС предопределили проведение исследования. **Цель** работы – выявление морфофункциональных особенностей и количества астро- и микроглиями в стареющем мозге крыс при курсовом применении сукцинатсодержащего препарата мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат).

Методика. Исследование выполнено на самцах беспородных белых крыс 3, 6 и 18 мес. Мексидол вводили в/б в дозе 100 мг/кг ежедневно, в течение 3, 7 и 14 сут. Методом вестерн-блот-анализа в лизате коры головного мозга (КГМ) определяли содержание высокоспецифичных маркеров микроглиальной (Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1) и астроглиальной (GFAP, glial fibrillary acidic protein) активации, а также уровень синаптофизина (SYN, маркер синаптогенеза). Методом иммуногистохимического окрашивания Iba1 и GFAP на парафиновых срезах префронтальной коры (ПФК) и гиппокампа оценивали морфологические особенности и осуществляли подсчет астро- и микроглиями у молодых и старых крыс.

Результаты. У старых животных уровень GFAP и Iba1 увеличился на 30% и 20% соответственно, а содержание SYN снижилось на 25% в сравнении с молодыми животными, что свидетельствует об активации воспалительного процесса и снижении синаптогенного потенциала у старых животных. Морфологические признаки провоспалительной поляризации (короткие, слабоветвленные, малочисленные отростки) были характерны для микро- и астроглии ПФК старых крыс. Курс мексидола вызывал в КГМ старых крыс снижение содержания GFAP и Iba1, увеличение экспрессии SYN до уровня молодых животных, увеличение количества, длины, разветвленности отростков у GFAP- и Iba1-положительных клеток, что свидетельствует о сукцинат/SUCNR1-зависимой противовоспалительной трансформации микро- и астроглии в стареющем мозге.

Заключение. Исследование впервые раскрывает новые аспекты активности мексидола и сукцинатной сигнализации в мозге, что проявляется в ограничении воспалительной реакции и усилении синаптической пластичности. Сукцинатсодержащий препарат мексидол может быть использован в комплексной терапии различных неврологических патологий, ассоциированных с нейровоспалением и когнитивным дефицитом.

Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол); астроциты; микроглия; нейровоспаление; старение; крысы

Для цитирования: Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 4–16.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.4-16

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Кирова Ю.И.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка материала – Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: bioenerg@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.12.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M.

Morpho-functional features of astrocytes and microglia in the brain of ageing rat during the course of ethylmethylhydroxypyridine succinate treatmentInstitute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

In the development of age-associated neurodegenerative diseases, a key role is played by sustained pro-inflammatory activation of microglia and reactive microglia-mediated oxidative stress, neuroinflammation, and astroglial dysfunction. The constitutive expression of the succinate receptor SUCNR1/GPR91 by microglia, formation of new ideas about succinate as an immunometabolite (metabokine) and the lack of studies of the effect of succinate signaling on the morpho-functional state of CNS resident immune cells stimulated this study. **The aim** of the study was to assess the morpho-functional features and the number of astro- and microglia in the aging brain of intact rats and during the application of the succinate-containing drug, mexidol (ethylmethylhydroxypyridine succinate).

Methods. Experiments were performed on outbred white rats aged 3, 6, and 18 months. Mexidol was administered intraperitoneally at 100 mg/kg/day for 3, 7, and 14 days. The content of highly specific markers of microglial activation (Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1) and astroglial activation (GFAP, glial fibrillary acidic protein), and the content of synaptophysin (SYP, a marker of synaptogenesis) were determined in cerebral cortex (CC) lysate by Western blot analysis. Immunohistochemical staining of Iba1 and GFAP in paraffin-embedded sections of the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus was used to evaluate morphological features and to count astro- and microglia in young and aged rats.

Results. In aged rats, the contents of GFAP and Iba1 were increased by 30% and 20%, respectively, and the content of SYP was decreased by 25%, compared with that of young animals. These findings indicate activation of inflammation and a reduction of synaptogenic potential in aged animals. Morphological features of proinflammatory polarization, i.e., short, poorly branched, few processes, were observed for micro- and astroglia in PFC of aged rats. Mexidol caused a decrease of the GFAP and Iba1 content in CC of aged rats, an increase of SYP expression to its level in young animals, an increase in the number, length, branching of processes in GFAP- and Iba1-positive cells. These findings demonstrate succinate/SUCNR1-dependent anti-inflammatory transformation of micro- and astroglia in the aging brain.

Conclusion. The findings demonstrate, for the first time, new aspects of mexidol activity and succinate signaling in the brain that limit inflammatory responses and enhance synaptic plasticity. The succinate-containing drug mexidol can be used in the complex therapy of various neurological pathologies associated with neuroinflammation and cognitive deficit.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate (Mexidol); astrocytes; microglia; neuroinflammation; aging; rats

For citation: Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M. Morpho-functional features of astrocytes and microglia in the brain of ageing rat during the course of ethylmethylhydroxypyridine succinate treatment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 4–16. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.4-16

For correspondence: Yuliya I. Kirova, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: bioenerg@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Author's contribution: the concept and design of the study – Kirova Yu.I.; collection and processing of material, preparation of illustrative material, statistical processing of the material – Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M.; writing the text – Kirova Yu.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Information about the authors:Kirova Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-2436-3661>Terekhina O.L., <http://orcid.org/0000-0001-5128-1912>Shakova F.M., <https://orcid.org/0000-0002-0494-2500>

Received 20.12.2021.

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

В развитии возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний ключевая роль отводится устойчивой провоспалительной активации микроглии и опосредованным реактивной микроглией окислительному стрессу и нейровоспалению [1, 2]. Недавно

опубликованные исследования продемонстрировали дисфункцию астроцитов, снижение их синаптогенного и нейропротекторного потенциала, как ведущий фактор в формировании когнитивного дефицита при нормальном и патологическом старении [3, 4]. Согласно

новым данным, реактивная астроглия не только признак старения и заболеваний мозга, но и критически значимый патогенетический механизм, определяющий прогрессирование нейродегенеративных патологий [4].

Представления об астроцитах претерпели кардинальное переосмысление за минувшее десятилетие, в результате чего основополагающая механическая функция астроцитов как клеток, обеспечивающих структурную поддержку нейронов и формирование внеклеточного матрикса, была замещена функцией синаптической модуляции: отростки астроцитов составляют структурную часть синапса (трехчастный синапс), астроциты секретируют синаптогенные факторы и глиотрансмиттеры, осуществляют рециклинг нейромедиаторов, усиливают долговременную потенциацию [5–9]. Таким образом, астроциты являются центральными координаторами активности нейрональных сетей и, в конечном итоге, когнитивных функций [10]. Показано, что нейродегенеративные заболевания с прогрессирующим когнитивным дефицитом связаны с астроцитарной дисфункцией, а наиболее распространенная форма возраст-ассоциированной нейродегенерации Болезнь Альцгеймера получила новую трактовку как синаптическая патология [4].

Помимо модуляции синаптической передачи, структурной и метаболической поддержки нейронов, астроциты наряду с микроглией участвуют в развитии воспалительных и цитотоксических реакций в нервной системе [8]. Появляется все больше свидетельств, что астроциты и микроглия играют определяющую роль в потере нейронов при нормальном старении и нейродегенеративных патологиях, ассоциированных с пожилым возрастом [4]. Несмотря на детальную проработанность проблемы провоспалительной трансформации микроглии при старении, морфо-функциональные изменения стареющих астроцитов остаются практически неисследованными [11]. Наряду со свидетельствами провоспалительной поляризации астроцитов при старении [4, 10, 12] описаны дистрофические изменения астроцитов без существенных изменений в экспрессии провоспалительных генов [11, 13].

В настоящее время наиболее обсуждаемой является концепция, согласно которой реактивная стареющая микроглия, секретируя IL-1 α , TNF- α , C1q, вызывает провоспалительную трансформацию астроцитов (A1-нейротоксический фенотип) [14]. A1-астроциты демонстрируют снижение способности к формированию синапсов, стимуляции выживания и роста нейронов, а также цитотоксичность. Таким образом, активация астроцитов является микроглиально-зависимой и ее эффективная коррекция предполагает блокирование провоспалительной M1-активации микроглии [3].

В оценке про/противовоспалительного состояния астроцитов наиболее адекватным и надежным подходом является определение уровня экспрессии мРНК/белка GFAP (glial fibrillary acidic protein) и анализ морфологических особенностей иммуногистохимически окрашенных GFAP-положительных астроцитов [15, 16]. GFAP – белок промежуточных филаментов – широко признан высокоспецифичным маркером реактивной астроглии. Морфологически провоспалительный/цитотоксический фенотип астроцитов характеризуется короткими, широкими, малочисленными и слабо разветвленными отростками, увеличенным клеточным телом (астроцитарная гипертрофия). Гипертрофированные пролиферирующие астроциты наблюдают при травме, инфаркте, инфекции мозга (астроцитарный глиоз), а также при стрессе и старении. Тем не менее, есть немало исследований, выявляющих не гипертрофические, а дистрофические изменения астроцитов при старении (уменьшение количества астроцитов, уменьшение числа отростков и их длины, уменьшение размера клеточного тела) [17]. Таким образом, вопрос морфофункциональной поляризации астроглии при старении мозга остается нерешенным [8], также как подходы к ограничению воспалительной трансформации астроцитов и индукции нейропротективного фенотипа астроцитов (A2-фенотип).

Важно отметить, что применение неспецифической противовоспалительной терапии (нестероидные противовоспалительные препараты) снижает риск и облегчает течение нейродегенеративных процессов [18]. Одним из перспективных подходов к коррекции старческого церебрального воспаления может быть рецептор-опосредованная противовоспалительная трансформация микроглии. Известно, что главные типы иммунцитов (макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты) и резидентные иммунные клетки ЦНС (микроглия) конститутивно экспрессируют сукцинатный рецептор SUCNR1/GPR91, а янтарная кислота (сукцинат) оказывает сигнальное иммуномодулирующее действие как иммунометаболит (метабокин) [19].

В собственных исследованиях по изучению влияния сукцинатной сигнализации на провоспалительно поляризованную микроглию стареющего мозга [20] было впервые показано, что курсовое применение сукцинатсодержащего препарата мексидол (этилметилгидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат; 100 мг/кг, в/б, ежедневно, 14 дней) сопровождалось увеличением уровня экспрессии в КГМ старых крыс поверхностного маркера (CD206) противовоспалительного фенотипа микроглии, иммуносупрессорного цитокина TGF- β 1, нейротрофина BDNF, а также уменьшением содержа-

ния маркеров провоспалительного фенотипа микроглии (CD86, IL-1 β , TNF- α), что в целом свидетельствует об индукции противовоспалительной поляризации микроглии в стареющем мозге с явлениями умеренного хронического воспаления. Данные были получены методом иммуноблоттинга, так как иммуногистохимическая идентификация M1/M2 фенотипа микроглиальных клеток затруднительна в условиях *in vivo*, когда выявляются промежуточные/смешанные микроглиальные фенотипы [21]. В отношении астроцитов до настоящего времени отсутствуют множественные специфические маркеры (паттерны) их про-/противовоспалительной трансформации. Фактически единственным информативным подходом к идентификации фенотипа астроцитов является иммуногистохимическое окрашивание GFAP – маркера зрелых и провоспалительно поляризованных астроцитов и последующий анализ морфологии, количества и локализации GFAP-экспрессирующих астроцитов.

Поскольку астроциты, также как микроглиоциты, экспрессируют сукцинатный рецептор [22], а данные о влиянии сукцинат/SUCNR1 сигнализации на фенотип астроцитов в стареющем мозге с явлениями хронического воспаления отсутствуют в мировой литературе, была проведена представленная работа.

Цель исследования заключалась в оценке морфофункциональных особенностей и количества астро- и микроглиоцитов в стареющем мозге интактных крыс и при курсовом применении сукцинатсодержащего препарата мексидол (ЭМГП сукцинат).

Методика

Животные. Исследование было выполнено на самцах беспородных белых крыс в возрасте 3 (молодые), 6 (средневозрастные), 18 (старые) мес, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Протоколы экспериментов были утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП (протокол утверждения проекта № 1 от 20.02.2020; протокол окончательного утверждения № 5 от 16.12.2020).

Использованный препарат. Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) применяли в инъекционной форме (ООО «НПК «ФАРМАСО-

ФТ», 50 мг/мл) для внутрибрюшинного (в/б) введения в дозе 100 мг/кг, ежедневно, в течение 3-, 7-, 14-сут. Для каждого анализируемого периода курса (3-и, 7-е, 14-е сут) и для каждого возраста (3, 6, 18 мес) были сформированы группы контроля (курс ежедневных в/б инъекций изотонического раствора (NaCl 0,9%) в соответствии со схемой введения мексидола (9 групп, в каждой $n = 4$) и опытные группы (9 групп, в каждой $n = 6$). Забой животных осуществляли декапитацией под эфирным наркозом через 1 сут после заключительной инъекции.

Иммуноблоттинг использовали для выявления уровня экспрессии белков-маркеров активации микроглиоцитов (Iba1) и астроцитов (GFAP). Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) высокоспецифично продуцируется микроглией, локализован в цитоплазме, связан с актином, интенсивно экспрессируется при активации микроглии, необходим для миграционной активности [23]. GFAP (glial fibrillary acidic protein) является белком промежуточных филаментов, локализован в цитоплазме, служит маркером зрелых и активированных астроцитов, определяет морфологическую пластичность астроцитов, интенсивно экспрессируется при астроглиальной активации [16]. Синаптофизин определяли как маркер синаптогенеза и функциональной активности астроцитов – главных координаторов синаптической активности [11, 24].

Замороженные в жидком азоте образцы коры головного мозга (КГМ) растирали до порошкообразного состояния. Навески массой 100 мг лизировали на льду в течение 30 мин в охлажденном до 2 °C лизис-буфере (в соотношении 1V ткань: 6V буфер; 50 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1% тритон X-100, 10% глицерин, 1 mM дитиотреитол, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM AEBSF, 60 мкг/мл аprotинин, 10 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин А) [25]. После центрифугирования (30 мин, 14 000 g, 4 °C) супернатант, содержащий искомые белки, смешивали с загрузочным буфером (4× Laemmli Sample Buffer), инкубировали 5 мин при 95 °C и хранили при –80°C. Концентрацию общего белка в пробах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда. Белки лизата КГМ [25] разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроолюцией. Мембрану инкубировали с первичными моноклональными антителами (разведение 1:500; 14 ч; 4 °C; Santa Cruz Biotechnology, США) против Iba1 (sc-32725), GFAP (sc-71143), SYP (sc-136271); вторичными антителами (разведение 1:5000; 1 ч; 4 °C), конъюгированными с пероксидазой хрена (anti-mouse sc-516102). В качестве контроля использовали антитела к акти-

ну (sc-376421). Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомым белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Иммуногистохимия была использована для идентификации GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных микроглиоцитов в серийных срезах префронтальной коры (ПФК) головного мозга и гиппокампа. Образцы мозга фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде, обезвоживали, заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 7 мкм, которые выполняли в ПФК в интервале 4,2-4,7 от брегмы и на уровне гиппокампа в интервале от (-) 2,30 до (-) 2,8 мм от брегмы [26]. Срезы депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в спиртах нисходящей концентрации, производили демаскировку антигена кипячением срезов на водяной бане в 0,01М цитратном буфере pH 6,0 в течение 30 мин. Неспецифическое связывание антител блокировали инкубацией в 4% растворе БСА в PBS, содержащем 0,1% тритон X-100, 0,1% NaN₃ в течение 1 ч при 4 °С. После блокирования, срезы инкубировали в течение 14 ч при 4 °С с первичными антителами к GFAP (1:200; Abcam, UK; ab7260), Iba1 (1:200; Abcam, UK; ab178846). После инкубации срезы отмывали в PBS, инкубировали со вторыми антителами (1:500; Abcam, UK; ab150077) 2 ч в темноте при 4 °С. Негативный контроль получали обработкой срезов PBS вместо первичных антител. После инкубации со вторичными антителами, выполняли окрашивание клеточных ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом, после чего срезы высушивали и заключали под покровное стекло в флуоресцентную монтажную среду (Abcam, UK; ab104135). Для флуоресцентной микроскопии использовали микроскоп OLYMPUS BX51, фотодокументирование осуществляли с помощью камеры OLYMPUS XM10. Для количественного анализа иммуногистохимических препаратов использовали программу VideoTesT-Morphology 5.2 (LLC «VideoTesT», Россия).

Обзорное окрашивание срезов ПФК и гиппокампа гематоксилином и эозином выполняли по стандартной методике с целью оценить морфологическое состояние/количество нейронов и глиальных клеток.

Статистический анализ данных выполняли с помощью программных пакетов Statistica 10,0 (Stat soft Inc., США) с использованием непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Уилкоксона-Манна-Уит-

ни). Различия между сравниваемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Динамика экспрессии маркеров глиальной активации (GFAP, Iba1) и маркера синаптогенеза (SYP) в КГМ разновозрастных контрольных крыс и при курсовом применении ЭМГП сукцината. Определение уровня экспрессии цитоплазматических высокоспецифических маркеров активации астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba1) в лизатах КГМ 3-, 6-, 18-месячных крыс показало, что их содержание возрастзависимо увеличивается (**рис. 1**). У средневозрастных (6-месячных) крыс уровень GFAP увеличивался на 15%, у старых (18-месячных) крыс – на 30% в сравнении с молодыми (3-месячными). Содержание Iba1 также увеличивалось у 6-месячных крыс на 10%, а у 18-месячных крыс – на 20% (**рис. 1 А, В**).

Возрастзависимое увеличение экспрессии маркеров глиальной активации (астроглиальной – GFAP, микроглиальной – Iba1) свидетельствует о прогрессирующей провоспалительной поляризации астро- и микроглиоцитов при старении мозга и согласуется с данными других исследователей [8, 10, 27, 28].

Введение крысам разных возрастов ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, 14 сут, ежедневно) сопровождалось снижением уровня GFAP на 20% через 7 сут курса, а Iba1 – на 20% через 14 сут у крыс всех возрастных групп в сравнении с контролем (**рис. 1 А, В**). В литературе широко обсуждается концепция определяющего влияния микроглии в формировании фенотипа астроцитов [14], однако полученные в эксперименте данные о более раннем (на 7-е сут) снижении содержания GFAP в сравнении с Iba1 (на 14-е сут курса) может свидетельствовать о независимой от микроглии сукцинат-опосредованной противовоспалительной трансформации астроглии, экспрессирующей сукцинатный рецептор SUCNR1.

Для оценки функционального состояния астроглии, координирующей образование и поддержание синаптических контактов, при продолжительной стимуляции сукцинат/SUCNR1 сигнализации в мозге проводили определение уровня экспрессии синаптофизина (маркер синаптогенеза) [24].

Было показано, что базовый уровень экспрессии синаптофизина снижался у старых крыс на 25% в сравнении с молодыми и средневозрастными крысами (**рис. 2**). 14-суточное введение ЭМГП сукцината сопровождалось увеличением содержания синаптофизина в КГМ старых крыс до его уровня у 3- и 6-месячных крыс (**рис. 2**). Таким образом, 14-суточный курс ЭМГП сукцината индуцировал транс-

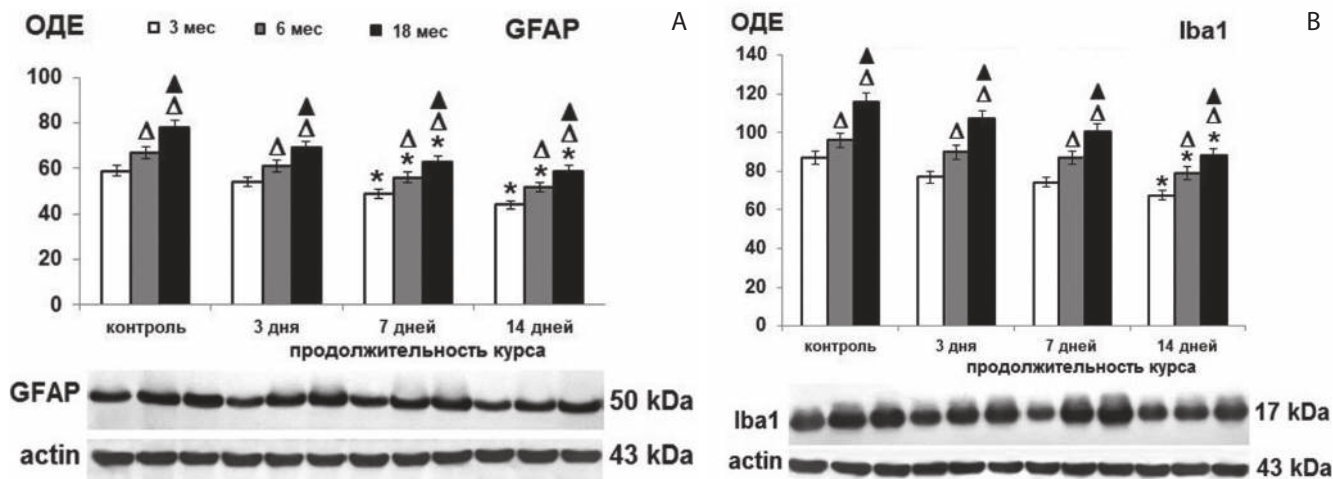


Рис. 1. Базовый уровень экспрессии GFAP (A) и Iba1 (B) и на протяжении курса мексидола (100 мг/кг, в/б, ежедневно) в коре головного мозга 3-, 6-, 18-месячных крыс. Показаны данные денситометрического анализа иммуноблотов. ОДЕ – относительные денситометрические единицы. GFAP – glial fibrillary acidic protein, Iba1 – ionized calcium-binding adapter molecule 1. ▲ – данные отличаются от группы молодых (3-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; ▲ – данные отличаются от группы средневозрастных (6-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; * – данные отличаются от контроля внутри возрастной группы ($p < 0,01$).

Fig. 1. GFAP (A) and Iba1 (B) expression at baseline and during the course of mexidol (100 mg/kg, i.p., daily) in the cerebral cortex of 3-, 6-, and 18-month-old rats. Data of densitometric analysis of immunoblots are shown. The bars show the mean relative densitometric values. GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1. ▲, data differ from the group of young (3-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; ▲, data differ from the group of middle-aged (6-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; *, data differ from controls within the age group ($p < 0.01$).

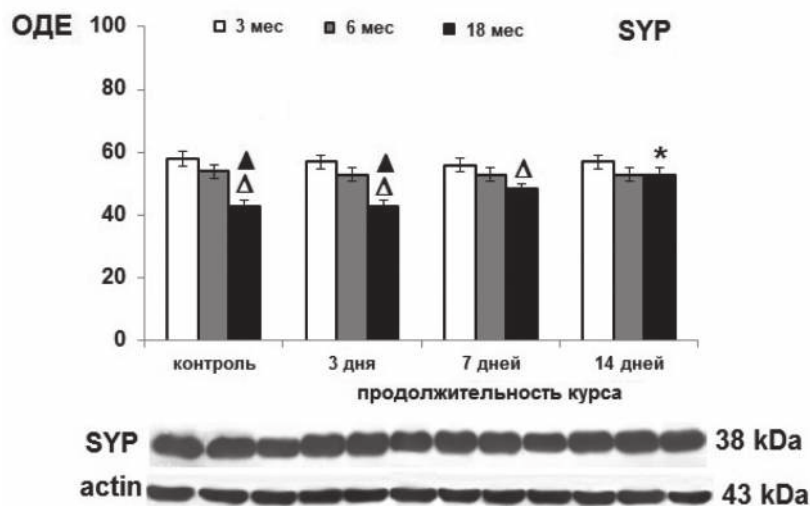


Рис. 2. Базовый уровень экспрессии синаптофизина (SYP) и на протяжении курса мексидола (100 мг/кг, в/б, ежедневно, 14 сут) в коре головного мозга 3-, 6-, 18-месячных крыс. Показаны данные денситометрического анализа иммуноблотов. ОДЕ – относительные денситометрические единицы. ▲ – данные отличаются от группы молодых (3-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; ▲ – данные отличаются от группы средневозрастных (6-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; * – данные отличаются от контроля внутри возрастной группы ($p < 0,01$).

Fig. 2. Synaptophysin (SYP) expression at baseline and during the course of mexidol (100 mg/kg, i.p., daily, 14 days) in the cerebral cortex of 3-, 6-, and 18-month-old rats. Data of densitometric analysis of immunoblots are shown. The bars show the mean relative densitometric values. ▲, data differ from the group of young (3-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; ▲, data differ from the group of middle-aged (6-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; *, data differ from controls within the age group ($p < 0.01$).

формацию стареющей астроглии от воспалительно-нейротоксического к регуляторному/нейропротекторному фенотипу.

Морфологические особенности астро- и микроглии в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе разновозрастных контрольных крыс и при курсовом применении ЭМГП сукцината. ПФК и гиппокамп – области мозга наиболее восприимчивые к старению. Известно, что стареющая астро- и микроглия ПФК и гиппокампа приобретает выраженные черты реактивного фенотипа в отличие от других областей мозга [4]. Иммуногистохимическое окрашивание маркеров глиальной активации (астроглиальной – GFAP, микроглиальной – Iba1) на фронтальных срезах ПФК и гиппокампа позволило выявить морфологические отличия астроцитов и микроглии у молодых и старых крыс (рис. 3, 4).

В ПФК морфологические признаки провоспалительной активации микроглии и астроцитов выявлялись уже у 3-месячных крыс, но в еще большей степени отмечались у 18-месячных особей (рис. 3). Наиболее типичными морфологическими особенностями астро- и микроглиоцитов были малочисленные, короткие, расширенные, слаборазветвленные отростки (рис. 3, табл. 1). В целом эти морфологические чер-

ты указывают на провоспалительную поляризацию астро- и микроглиоцитов, описаны у стареющих грызунов, приматов и человека [10, 11, 29–32]. В ПФК количество астроцитов не отличалось у молодых и старых крыс, но численность микроглиоцитов была выше у старых особей (табл. 1). Другими авторами также было показано, что общее количество астроцитов в ЦНС у грызунов, приматов и человека существенно не меняется с возрастом [30].

В гиппокампе астроциты и микроглиоциты имели принципиально другую морфологию (без признаков провоспалительной активации) в сравнении с ПФК: множественные, длинные, тонкие, разветвленные отростки, формирующие перекрывающиеся пространственные домены (рис. 4, табл. 2).

Курс мексидола не влиял на количество астроцитов в исследуемых областях мозга у молодых и старых крыс, но вызывал уменьшение количества микроглиоцитов в ПФК и CA1 поле гиппокампа старых крыс до их численности у молодых особей (табл. 1, 2). Снижение пролиферативной активности микроглии является свидетельством ограничения провоспалительной поляризации, что подтверждается полученными ранее данными по увеличению уровня экспрессии противовоспалитель-

Таблица 1/ Table 1

Данные морфометрического анализа иммуногистохимически окрашенных GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных микроглиоцитов на срезах префронтальной коры головного мозга контрольных крыс 3-месячного и 18-месячного возраста и после 14-дневного курса ЭМГП сукцината, (M±m)

Morphometric data of immunohistochemically stained GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microgliaocytes on sections of the prefrontal cerebral cortex of control rats aged 3 and 18 mos and after a 14-day course of EMHP succinate

Показатели Indicators		Астроциты ПФК PFC astrocytes			Микроглиоциты ПФК PFC microgliaocytes		
		кол-во/мм ² number/mm ²	количество отростков number of processes	длина отростков, мкм length of processes, μm	кол-во/мм ² number/mm ²	количество отростков number of processes	длина отростков, мкм length of processes, μm
3 месяца 3 mos	контроль control	119±9,5	3,5±0,31	14±1,9	72±5,6	4,3±0,42	11±0,81
	14-суточный курс 14-day course	112±9,8	4,7±0,53*	19±2,1*	69±6,2	5,1±0,56*	23±2,1*
18 месяцев 18 mos	контроль control	122±9,6	3,8±0,34	10±1,4	90±7,2	3,2±0,26	9±1,3
	14-суточный курс 14-day course	116±10,1	5,2±0,62*	15±1,9*	72±5,8*	4,9±0,45*	19±2,1*

Примечание. Измеряли длину отростков первого порядка с высокой GFAP- и Iba1-иммунореактивностью. *p<0,01 – отличия от контроля в соответствующей возрастной группе. ПФК – префронтальная кора.

Note. The length of primary processes with high GFAP and Iba1 immunoreactivity was measured. *, data differ from the control in the corresponding age group (p<0.01). PFC – prefrontal cortex.

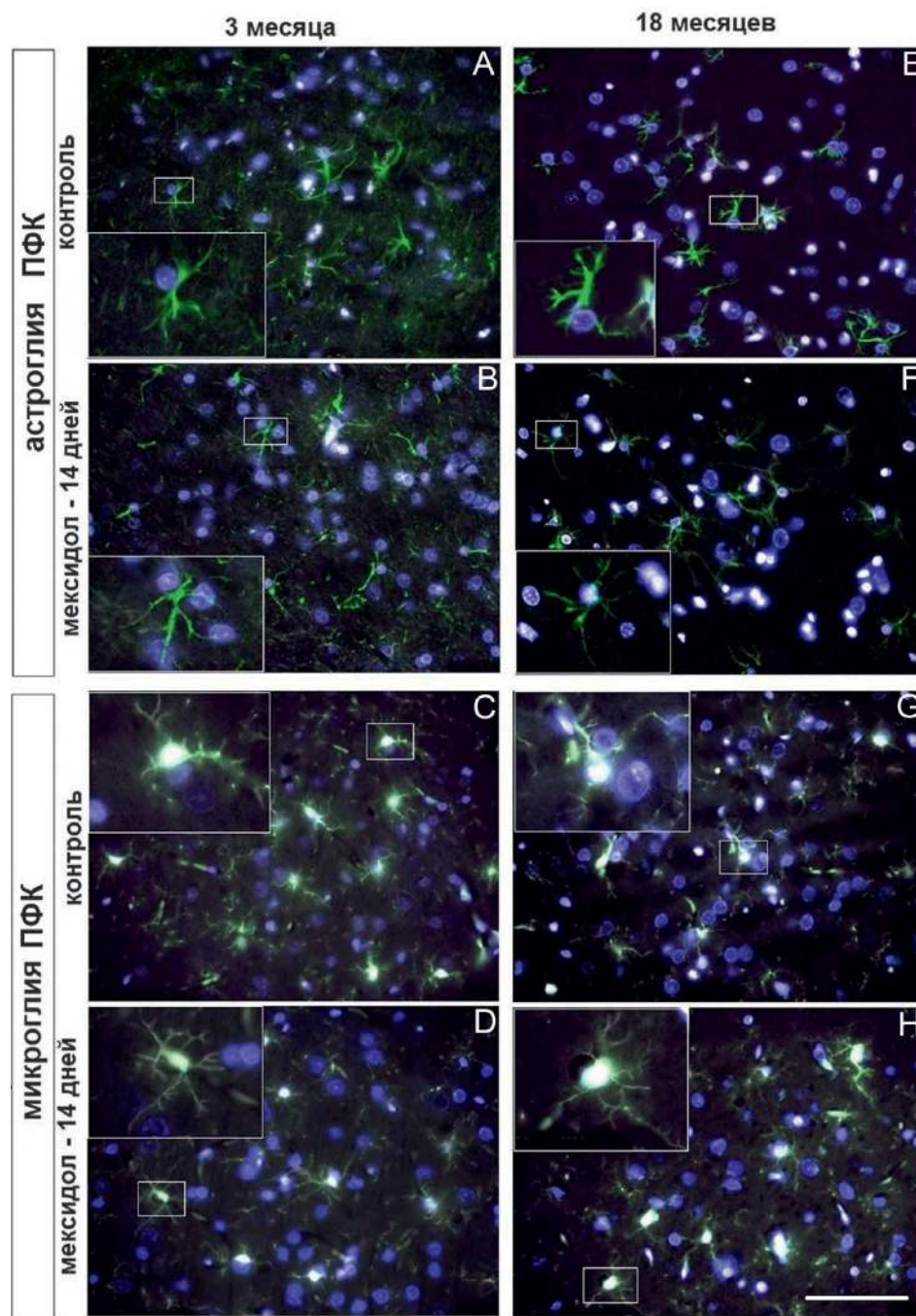


Рис. 3. Микрофотографии GFAP-экспрессирующих астроцитов (A, B, E, F) и Iba1-экспрессирующих микроглиоцитов (C, D, G, H) в ПФК молодых (A, B, C, D) и старых (E, F, G, H) крыс в контроле (A, C, E, G) и после 14-суточного курса ЭМГП сукцината (мексидол; 100 мг/кг, в/б, ежедневно) (B, D, F, H).

Изображения получены совмещением фотографий иммуногистохимически окрашенных GFAP- и Iba1-положительных клеток (астроциты и микроглиоциты, соответственно; зеленый цвет) и фотографий клеточных ядер, окрашенных диамидинофенилиндолом (синий цвет). Объектив $\times 40$. Масштаб 50 мкм.

Fig. 3. Micrographs of GFAP-expressing astrocytes (A, B, E, F) and Iba1-expressing microglia (C, D, G, H) in PFC of young (A, B, C, D) and old (E, F, G, H) control (A, C, E, G) rats and after a 14-day course of EMHP succinate (Mexidol, 100 mg/kg, ip, daily) (B, D, F, H).

The images were obtained by merging photographs of immunohistochemically stained GFAP- and Iba1-positive cells (astrocytes and microglia, respectively; green) and photographs of cell nuclei stained with diaminodiphenylindole (blue). Objective: $\times 40$. Scale bar: 50 μm .

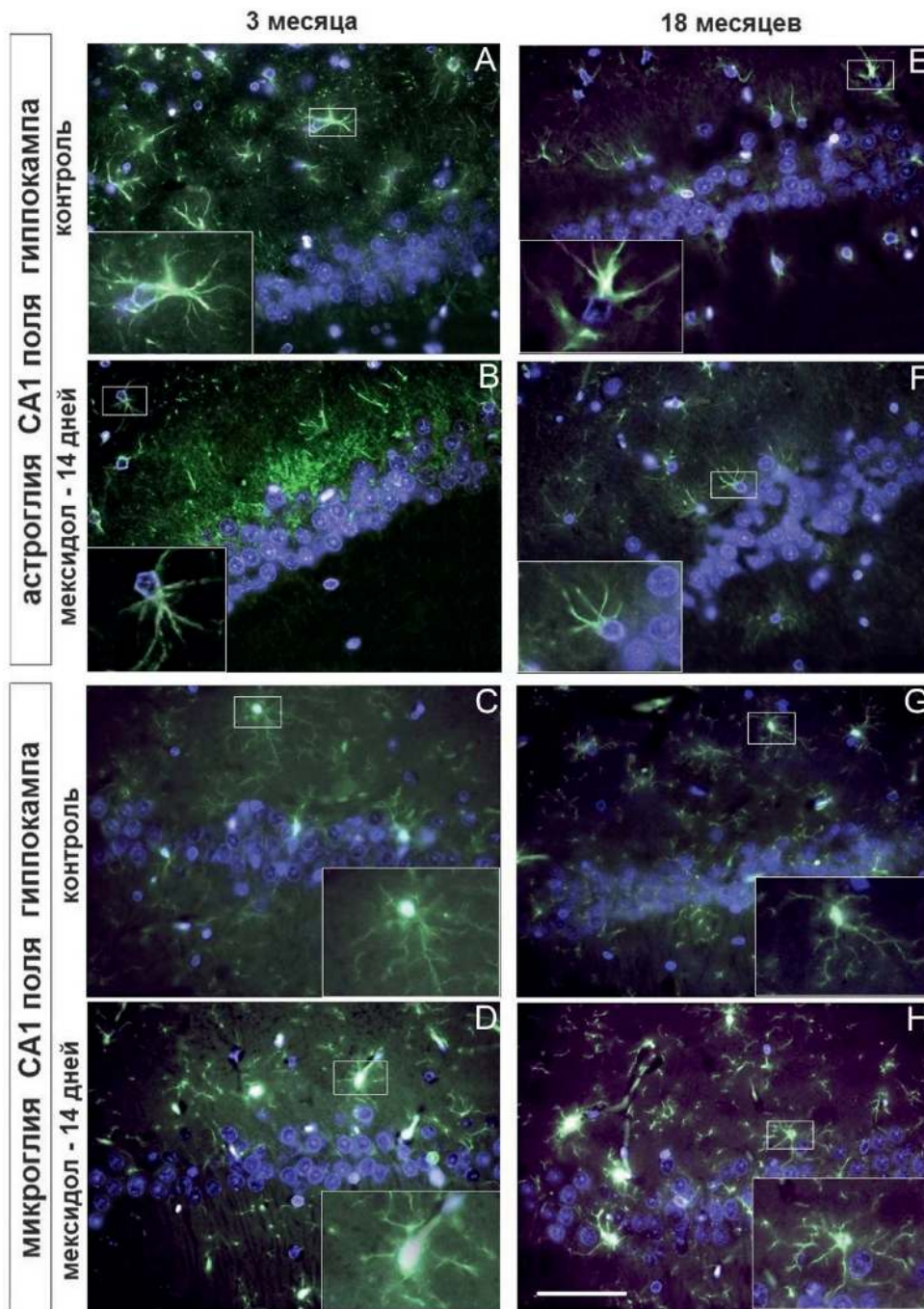


Рис. 4. Микрофотографии GFAP-экспрессирующих астроцитов (A, B, E, F) и Iba1-экспрессирующих микроглиоцитов (C, D, G, H) в гиппокампе (поле СА1) молодых (A, B, C, D) и старых (E, F, G, H) крыс в контроле (A, C, E, G) и после 14-суточного курса ЭМГП сукцината (мексидол; 100 мг/кг, в/б, ежедневно) (B, D, F, H). Изображения получены совмещением фотографий иммуногистохимически окрашенных GFAP- и Iba1-положительных клеток (астроциты и микроглиоциты, соответственно; зеленый цвет) и фотографий клеточных ядер, окрашенных диамидинофенилиндолом (синий цвет). Объектив $\times 40$. Масштаб 50 мкм.

Fig. 4. Micrographs of GFAP-expressing astrocytes (A, B, E, F) and Iba1-expressing microglia (C, D, G, H) in the hippocampus (field CA1) of young (A, B, C, D) and old (E, F, G, H) rats in control (A, C, E, G) and after a 14-day course of EMHP succinate (Mexidol; 100 mg/kg, ip, daily) (B, D, F, H).

The images were obtained by merging photographs of immunohistochemically stained GFAP- and Iba1-positive cells (astrocytes and microglia, respectively; green) and photographs of cell nuclei stained with diamidinophenylindole (blue). Objective: $\times 40$. Scale bar: 50 μm .

ных микроглиальных маркеров (CD206, TGF- β 1, BDNF) при курсовом применении ЭМГП сукцината [20].

Важно отметить, что в ПФК количество астроцитов превышало количество микроглиоцитов (отношение составило 1,7 у молодых и 1,4 у старых крыс), и, в еще большей степени, в СА1 поле гиппокампа (отношение составило 2,4 у молодых и 1,9 у старых крыс). По данным литературы снижение количества микроглиоцитов и полное истощение микроглии в мозге с помощью ингибитора рецептора колониестимулирующего фактора (CSFIR) улучшало морфологию астроцитов, синаптическую активность и когнитивные функции у старых животных [33]. Выявленное нами у молодых и старых крыс более высокое количество микроглиоцитов в ПФК в сравнении с гиппокампом может отчасти объяснить более выраженные морфологические черты провоспалительного фенотипа глиоцитов в ПФК.

Курс мексидола увеличил в ПФК и СА1 области гиппокампа количество и длину первичных отростков глиоцитов, а также их разветвленность (количество отростков второго и более высоких порядков) (рис. 3, 4; табл. 1, 2).

Выявленная индукция нейропротективного А2-фенотипа астроглии при продолжительной стимуляции сукцинат/SUCNR1 сигнализации (14-суточный курс мексидола, 100 мг/кг, в/б) позволяет предположить два

регуляторных механизма: опосредованный микроглией и независимый от микроглии.

По данным литературы микроглия оказывает определяющее влияние на морфофункциональное состояние астроцитов. Известно, что микроглиальные провоспалительные цитокины TNF- α , IL-1 β индуцируют нейротоксический А1-фенотип [4, 14, 34], а микроглиальная down-регуляция рецептора P2Y₁ астроцитов – нейропротективный А2-фенотип [35]. Поэтому, в качестве эффективного подхода в коррекции астроглиоза была предложена модуляция состояния микроглии [14, 36]. Собственные данные показали индукцию противовоспалительного М2-фенотипа микроглии в стареющем мозге при курсовом применении мексидола [20]. Таким образом, нейропротективная поляризация астроцитов при курсовом применении ЭМГП сукцината может быть опосредована микроглиальной регуляцией.

Астроциты экспрессируют сукцинатный рецептор, активация которого вызывает астроглиальные кальциевые колебания [37]. Известно, что кальциевая сигнализация связана с активацией протеинкиназы С, митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) и МАПК-зависимых процессов (клеточная миграция, пролиферация, спраутинг эндотелиальных клеток и аксонов). В настоящее время доказано стимулирующее влияние сукцинат/SUCNR1 сигнализации в цере-

Таблица 2/ Table 2

Данные морфометрического анализа иммуногистохимически окрашенных GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных микроглиоцитов на срезах гиппокампа (поле СА1) контрольных крыс 3-месячного и 18-месячного возраста и после 14-дневного курса ЭМГП сукцината, ($M \pm m$)

Morphometric data of immunohistochemically stained GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microglia on sections of the hippocampus (field CA1) of control rats aged 3 and 18 mos and after a 14-day course of EMHP succinate

Показатели Indicators		Астроциты гиппокампа (СА1 поле) Hippocampal astrocytes (CA1 field)			Микроглиоциты гиппокампа (СА1) Hippocampal microglia (CA1 field)		
		кол-во/мм ² number/mm ²	количество отростков number of processes	длина отростков, мкм length of processes, μ m	кол-во/мм ² number/mm ²	количество отростков number of processes	длина отростков, мкм length of processes, μ m
3 месяца 3 mos	контроль control	149 \pm 12	4,6 \pm 0,41	18 \pm 1,6	61 \pm 4,9	5,4 \pm 0,71	17 \pm 1,1
	14-суточн. курс 14-day course	156 \pm 11	5,4\pm0,48*	24\pm2,2*	54 \pm 4,7	7,6\pm0,76*	23\pm1,4*
18 месяцев 18 mos	контроль control	146 \pm 13	4,5 \pm 0,35	15 \pm 1,4	78 \pm 6,2	5,1 \pm 0,73	16 \pm 1,3
	14-суточн. курс 14-day course	142 \pm 10	5,3\pm3,92*	18\pm1,6*	63\pm5,1*	6,9\pm0,98*	21\pm1,6*

Примечание. Измеряли длину отростков первого порядка с высокой GFAP- и Iba1-иммунореактивностью. * – данные отличаются от контроля в соответствующей возрастной группе ($p < 0,01$).

Note. The length of primary processes with high GFAP and Iba1 immunoreactivity was measured. *, data differ from the control in the corresponding age group ($p < 0.01$).

бральном ангиогенезе и активации аксонального роста [19, 38]. Морфологическое сходство между процессами сукцинат/SUCNR1-зависимого роста аксонов, нейритов, отростков активированных эндотелиальных клеток может предполагать аналогичный механизм в основе разрастания отростков астро- и микроглиальных клеток в присутствии сукцината.

Данные обзорного окрашивания срезов префронтальной коры мозга и гиппокампа разновозрастных контрольных крыс и при курсовом применении ЭМГП сукцината. Обзорное окрашивание гематоксилин-эозином срезов ПФК и гиппокампа разновозрастных контрольных крыс и после 14-суточного курса мексидола позволило выполнить подсчет и морфологическую оценку состояния нейронов и глиальных клеток [39]. В ПФК и гиппокампе молодых и старых контрольных крыс и после 14-суточного курса мексидола были выявлены нормохромные нейроны. Явления нейрональной дегенерации (конденсированные ядра, эозинофильная цитоплазма) не были обнаружены. Количество нейронов снижалось в исследуемых областях мозга у старых особей ($272 \pm 21/\text{мм}^2$ ПФК, $396 \pm 35/1\text{мм}^2$ CA1) по сравнению с молодыми ($312 \pm 23/\text{мм}^2$ ПФК, $459 \pm 37/\text{мм}^2$ CA1), что широко описано в литературе и является типичной характеристикой стареющего мозга [40].

Признаки глиальной активации были выявлены в ПФК молодых и старых крыс в виде увеличения количества клеток с гиперхромным базофильным ядром и отчетливыми эозинофильными отростками.

Идентификация и подсчет клеток реактивной глиии были выполнены с помощью иммуногистохимического окрашивания (см. выше). Количество гиперхромных клеток реактивной глиии снижалось в ПФК после 14-суточного курса ЭМГП сукцината как у молодых, так и старых особей, что подтверждает формирование противовоспалительного/нейрорепаративного фенотипа астро- и микроглиоцитов.

Заключение

Исследование было направлено на изучение церебральных эффектов сукцинат/SUCNR1 сигнализации. Представления о сигнальной роли сукцината в мозге, сформированные после открытия сукцинатного рецептора SUCNR1 в 2004 г., ограничиваются данными о стимуляции ангиогенеза в условиях гипоксии/ишемии [22].

В наших более ранних исследованиях [41] было впервые показано, что продолжительная стимуляция сукцинатной сигнализации (8-, 14-, 20-дневные курсы этилметилгидроксипиридина сукцината, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) вызывает увеличение экспрессии

сукцинатного рецептора SUCNR1 и маркеров биогенеза митохондрий (PGC-1 α , NRF1, TFAM, NDUFB2, SDHA, сyt b, COX2, ATP5A), активацию митохондриогенеза в коре головного мозга у молодых, средневозрастных и старых крыс. Выявленный эффект мог быть опосредован регуляторным фенотипом микроглии, конститутивно экспрессирующей сукцинатный рецептор SUCNR1 и, таким образом, представляющей в ЦНС первичную мишень сукцинатной сигнализации.

Последующие исследования [20], выполненные методом иммуноблоттинга, показали, что у 18-месячных старых крыс с явлениями хронического умеренного церебрального воспаления курсовое 14-суточное введение ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, ежедневно) вызывало увеличение уровня экспрессии противовоспалительных маркеров регенераторного M2-фенотипа микроглии (CD206, BDNF, TGF- β 1) до их уровня у 6-месячных крыс, что свидетельствует о вовлечении сукцинатной сигнализации в механизмы противовоспалительной поляризации микроглии, экспрессирующей сукцинатный рецептор.

В представленной работе методом иммуногистохимического окрашивания маркеров глиальной активации (астроглиальной – GFAP, микроглиальной – Iba1) было показано, что у старых крыс в префронтальной коре головного мозга микроглиоциты и астроциты характеризуются чертами провоспалительного фенотипа (малочисленные, короткие, слаборазветвленные отростки). Курсовое введение ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, ежедневно, 14 дней) вызывало исчезновение морфологических признаков провоспалительного фенотипа астроцитов и микроглиоцитов в ПФК, а также формирование морфологических черт регуляторного/нейропротекторного глиального фенотипа. Данные иммуногистохимии были подтверждены вестерн-блот-анализом, показавшим, что уровни экспрессии GFAP и Iba1 уменьшались в коре головного мозга старых крыс на протяжении курса мексидола.

Данные работы согласуются с исследованиями влияния мексидола на процессы обучения и памяти, нарушенные у старых мышей. Показано, что ЭМГП сукцинат, улучшает как обучение, так и хранение и воспроизведение информации, увеличивает продолжительность жизни животных [42].

Полученные данные впервые продемонстрировали, что церебральная сукцинат/SUCNR1 сигнализация вовлечена в механизмы противовоспалительной поляризации астроцитов и микроглиоцитов – главных клеточных типов, опосредующих воспаление, окислительный стресс и нейродегенерацию при нормальном и патологическом старении мозга.

Литература

(п.п. 1-17; 19; 21–40 см. References)

18. Литвиненко И.В., Красаков И.В., Бисага Г.Н., Скулябин Д.И., Полтавский И.Д. Современная концепция патогенеза нейродегенеративных заболеваний и стратегия терапии. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017; 6(2): 3–10. DOI: 10.17116/jnevro2017117623-10
20. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Воронина Т.А. Этилметилгидроксипиридина сукцинат индуцирует противовоспалительную поляризацию микроглии в мозге стареющих крыс. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2022; 39(1): 44–53.
41. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(1): 62–9. DOI: 10.17116/jnevro202012001162
42. Воронина Т.А. Геропротективные эффекты этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментальном исследовании. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(4): 81–7. DOI: 10.17116/jnevro202012004181

References

1. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009; 29: 13435–44.
2. Amici S.A., Dong J., Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front. Immunol*. 2017; 8: 1520.
3. Arranz A.M., Strooper B.D. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2019; 18: 406–14.
4. Matias I., Morgado J., Gomes F.C.A. Astrocyte heterogeneity: impact to brain aging and disease. *Front. Aging Neurosci*. 2019; 11: 59.
5. Codeluppi S.A., Chatterjee D., Prevot T.D., Bansal Y., Misquitta K.A., Sibille E., Banasr M. Chronic stress alters astrocyte morphology in mouse prefrontal cortex. *Intern J Neuropsychopharm*. 2021; 24(10): 842–53.
6. Meldolesi J. Astrocytes: News about Brain Health and Diseases. *Bio-medicines*. 2020; 8: 394.
7. Peteri U.K., Niukkanen M., Castren M.L. Astrocytes in neuropathologies affecting the frontal cortex. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13: 44.
8. Salas I.H., Burgado J., Allen N.J. Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiology of Disease*. 2020; 143: 105008.
9. Siracusa R., Fusco R., Cuzzocrea S. Astrocytes: role and functions in brain pathologies. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 1114.
10. Palmer A.L., Ousman S.S. Astrocytes and aging. *Front. Aging Neurosci*. 2018; 10: 337.
11. Pan J., Ma N., Yu B., Zhang W., Wan J. Transcriptomic profiling of microglia and astrocytes throughout aging. *J Neuroinflamm*. 2020; 17: 97.
12. Clarke L.E., Liddelow S.A., Chakraborty C., Müncha A.E., Heimand M., Barres B.A. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *PNAS*. 2018; 115(8): E1896–E1905.
13. Verkhatsky A., Rodrigues J.J., Pivoriunas A., Zorec R., Semyanov A. Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv. Eur J Physiol*. 2019; 471(10): 1247–61.
14. Liddelow S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017; 541: 481–87.
15. Gomes F.C.A., Paulin D., Neto V.M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(5): 619–31.
16. Jurga A.M., Paleczna M., Kadluczka J., Kuter K.Z. Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain. *Biomolecules*. 2021; 11: 1361.
17. Messing A., Brenner M. GFAP at 50. *ASN Neuro*. 2020; 12: 1759091420949680.
18. Litvinenko I.V., Krasakov I.V., Bisaga G.N., Skulyabin D.I., Poltavsky I.D. Modern conception of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic strategy. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017; 6(2): 3–10. (in Russian). DOI: 10.17116/jnevro2017117623-10
19. Krzak G., Willis C.M., Smith J.A., Pluchino S., Peruzzotti-Jametti L. Succinate receptor 1: An emerging regulator of myeloid cell function in inflammation. *Trends Immunol*. 2021; 42(1): 45–58.
20. Kirova Y.I., Shakova F.M., Voronina T.A. Ethylmethylhydroxypyridine succinate induces anti-inflammatory polarization of microglia in the brain of aging rat. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. 2022; 39(1): 44–53. (in Russian)
21. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell Neurosci*. 2020; 14: 198.
22. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., et al. G-Protein-Coupled Receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34: 285–93.
23. Hovens I.B., Nyakas C., Schoemaker R.G. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2014; 1(2): 82–8.
24. Shan L., Zhang T., Fan K., Cai W., Liu H. Astrocyte-neuron signaling in synaptogenesis. *Front. Cell Dev. Biol*. 2021; 9: 680301.
25. Baghirova S., Hughes B.G., Hendzel M.J., Schulz R. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX*. 2015; 2: 440–5.
26. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego; Academic Press; 1998.
27. Brenner M., Messing A. Regulation of GFAP expression. *ASN Neuro*. 2021; 13: 1–32.
28. Jiang C.T., Wu W.F., Deng Y.H., Ge J.W. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Molecular Medicine Reports*. 2020; 21: 2006–18.
29. Angelova D.M., Brown D.R. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J. Neurochem*. 2019; 151: 676–88.
30. Popov A., Brazhe A., Denisov P., Sutyagina O., Li L., Lazareva N., et al. Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity. *Aging Cell*. 2021; 20: e13334.
31. Robillard K.N., Lee K.M., Chiu K.B., MacLean A.G. Glial cell morphological and density changes through the lifespan of rhesus macaques. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016; 55: 60–9.
32. Valles S.L., Iradi A., Aldasoro M., Vila J.M., Aldasoro C., Torre J., et al. Function of glia in aging and the brain diseases international. *J Med Sci*. 2019; 16(11): 1473–79.

33. Elmore M.R.P., Najafi A.R., Koike M.A., Dagher N.N., Spangenberg E.E., Rice R.A., et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 2014; 82: 380–97.
34. Rothhammer V., Borucki D.M., Tjon E.C., Takenaka M.C., Chao C.-C., Ardura-Fabregat A. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*. 2018; 557: 724–28.
35. Shinozaki Y., Shibata K., Yoshida K., Shigetomi E., Gachet C., Ikenaka K., et al. Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y1 receptor downregulation. *Cell Rep*. 2017; 19: 1151–64.
36. Song G.J., Suk K. Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci*. 2017; 9: 139.
37. Molnar T., Dobolyi A., Nyitrai G., Barabas P., Heja L., Emri Z., et al. Calcium signals in the nucleus accumbens: activation of astrocytes by ATP and succinate. *BMC Neuroscience*. 2011; 12: 96.
38. Cherif H., Duhamel F., Cecyre B., Boucharde A., Quintal A., Chemtob S., et al. Receptors of intermediates of carbohydrate metabolism, GPR91 and GPR99, mediate axon growth. *PLoS Biol*. 2018; 16(5): e2003619.
39. Garman R.H. Histology of the central nervous system. *Toxicologic Pathology*. 2011; 39: 22-35.
40. Smith D.E., Roberts J., Gage F.H., Tuszynski M.H. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 10893–8.
41. Kirova Y.I., Shakova F.M., Germanova E.L., Romanova G.A., Voronina T.A. The effect of mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. 2020; 120(1): 62-9. (in Russian). DOI: 10.17116/jnevro202012001162
42. Voronina T.A. Geroprotective effects of ethylmethylhydroxypyridine succinate in an experimental study. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii imeni S.S. Korsakova*. 2020; 120(4): 81-7. (in Russian). DOI: 10.17116/jnevro202012004181

Сведения об авторах:

Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: bioenerg@mail.ru;

Терехина Ольга Леонидовна, науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов;

Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы.