

В.А.Отеллин¹, Л.И.Хожай¹, Т.Т.Шишко¹, И.Н.Тюренков²

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И ИХ ВОЗМОЖНАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ: РЕАКЦИИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК И СИНАПСОВ НЕОКОРТЕКСА

¹ Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН проф. В.А.Отеллин), ФГБУ «Институт физиологии им. И.П.Павлова» РАН, Санкт-Петербург; ² кафедра фармакологии (зав. — чл.-кор. РАН проф. И.Н.Тюренков), БОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

В отдаленный период онтогенеза (80–90-е сутки) у 28 крыс линии Вистар изучены морфологические особенности нейронов и синаптических контактов в неокортексе после острой перинатальной гипоксии и последующего применения салифена. Контролем служили интактные животные того же возраста. Использованы методы световой и электронной микроскопии, иммуноцитохимический метод выявления синаптофизина и морфометрические методы исследования. Исследование показало, что воздействие гипоксии в перинатальный период приводит к структурным перестройкам в нейронах неокортекса взрослых животных. Обнаружены дегенерация части больших пирамидных нейронов слоя V, снижение плотности расположения синаптических контактов (почти в 2 раза) в глубоких слоях неокортекса. Выявленные нарушения, вероятно, являются результатом модификации программы развития структур и межнейронных связей. Полученные данные свидетельствуют о том, что отечественный препарат «Салифен» после воздействия гипоксии оказывает протективное действие на нейроны, их дифференцировку и синаптогенез. Это предполагает клиническую эффективность применения этого препарата и служит основанием для продолжения исследований в данном направлении.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, нейроны, синаптические контакты, неокортекс, салифен

Медицинская и социальная значимость проблем неонатологии обусловила широкие клинические и модельные исследования последствий воздействия перинатальной гипоксии на развивающийся мозг, поиск и разработку новых нейротропных препаратов, действующих на разные мишени и пригодные для фармакологической коррекции последствий повреждения. В настоящее время экспериментальные работы по причине методологических и этических ограничений проводятся только на животных с учетом особенностей их вида и возраста. Разработана клинически и физиологически обоснованная модель — энцефалопатии новорожденных, которая является следствием воздействия неблагоприятных факторов, в том числе гипоксии, в перинатальный период [3]. На этой модели были исследованы протективные свойства отечественного препарата «Салифена» на структуры гематоэнцефалического барьера головного мозга животных после перинатальной гипоксии. Было установлено, что этот препарат оказывает корректирующее действие на структу-

ры гематоэнцефалического барьера в постнатальные сроки, вплоть до препубертатного периода развития [4].

Для определения эффективности препарата необходимы исследования структурных и функциональных характеристик зрелого мозга. В связи с этим цель настоящей работы — изучение морфологических особенностей нейронов в неокортексе уже взрослых крыс после перенесенной острой перинатальной гипоксии и последующего применения салифена.

Материал и методы. Содержание животных и все экспериментальные процедуры проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Работа выполнена на крысах линии Вистар. Воздействие гипоксии на головной мозг новорожденных крысят осуществляли на 2-е сутки после рождения в течение 1 ч в барокамере с проточной газовой смесью, содержащей: кислорода — 7,6–7,8%; углекислого газа — 0,15–0,21% и азота — 91,8%, при температуре 21–23 °С и нормальном общем давлении. В работе были использованы 3 группы животных: 1-я — экспериментальная группа — крысята,

Сведения об авторах:

Отеллин Владимир Александрович (e-mail: v.otellin@mail.ru), Хожай Людмила Ивановна (e-mail: astarta0505@mail.ru), Шишко Тамара Тимофеевна (e-mail: sumpuria@mail.ru), лаборатория онтогенеза нервной системы, Институт физиологии им. И.П.Павлова, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Тюренков Иван Николаевич (e-mail: fibfuv@vstcom.ru), кафедра фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии, после которой в течение 14 сут им вводили терапевтическую дозу салифена (15 мг/кг подкожно); 2-я группа — животные, подвергавшиеся воздействию только гипоксии и 3-я — контрольная группа — интактные животные того же возраста. Каждая группа содержала по 8–10 крысят. Мозг изучали уже у взрослых животных на 80-е и 90-е сутки после рождения.

Для проведения гистологических исследований мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) в течение 24 ч, обезживали и заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали метиленовым синим (Sigma, США) по методу Ниссля и заключали в синтетическую среду Permaunt (Termo, США).

Иммуноцитохимическую реакцию на синаптофизин (СФ) проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к СФ (интегральному мембранному гликопротеиду) — маркеру пресинаптических пузырьков (DakoCytomation, Дания) в разведении 1:1. Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор реагентов LSAB+2 (Dako, Дания). Визуализацию продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (Dako, Дания). Процедуру иммуноцитохимической реакции стандартизировали и осуществляли одновременное окрашивание гистологических срезов мозга, полученного как от контрольных животных, так и подопытных. После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джилла и заключали в Permaunt (Termo, США).

Морфологические исследования осуществляли при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия). Изображения получали с применением цифровой видеокамеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Оптическую плотность продукта реакции в слоях неокортекса оценивали на изображениях с применением компьютерного программного обеспечения ВидеоТест Мастер Морфология (ООО «Видео Тест», Санкт-Петербург). Для измерения площади тел нейронов на изображениях использовали программы ImageJ и ORIGIN5.0. Данные обрабатывали, вычисляя средние арифметические значения и их стандартные ошибки, статистическую обработку проводили средствами анализа ANOVA (Statistica 7.0, Statsoft Inc., США). Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Для ультраструктурного исследования неокортекса (фронтальной, сенсомоторной и слуховой областей) фрагменты коры фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7.4) с добавлением сахарозы, дополнительно фиксировали 2% раствором тетроксидом осмия и заключали в эпон. Ультратонкие срезы получали с помощью ультратома LKB-III (Bromma, Швеция), которые на сетках контрастировали 1,5% раствором уранилацетата и цитратом свинца и просматривали под электронным микроскопом Тесна G2 Spirit (FEI, Германия) при ускоряющем напряжении 70 кВ.

Результаты исследования. Результаты гистологического исследования показали, что у животных, перенесших перинатальную гипоксию, на 80–90-е сутки после рождения во всех слоях исследуемых областей неокортекса присутствовали нейроны с признаками хроматолиза (3–5 клеток в поле зрения при ув. 100). Встречались клетки-тени. Во всех слоях были места выпадения нейронов. Наибольшие повреждения были обна-

ружены в слое V, где в результате гибели больших пирамидных нейронов их число значительно сокращается.

У животных, перенесших гипоксию и получавших салифен, гибель клеток была выражена значительно слабее. Во всех слоях коры мозга встречались нейроны с признаками хроматолиза, чаще они локализовались в слое V, в слоях II–III и VI они были единичны, имелись места выпадения нейронов. Выявлено, что в верхних слоях (II–III) соматосенсорной коры большого мозга у животных, подвергавшихся перинатальной гипоксии, площадь тел нейронов практически не отличалась от таковой в контроле (4240 ± 244 и 4057 ± 179 мкм² соответственно). У животных после воздействия гипоксии и последующего введения салифена площадь тел нейронов также соответствовала контрольным значениям (5197 ± 153 мкм²). Наиболее чувствительными к воздействию гипоксии оказались большие пирамидные нейроны слоя V, размеры которых становились практически в 2 раза меньше, чем у животных в контроле, площадь тел которых составляла 16534 ± 330 мкм². У крыс, подвергавшихся только гипоксии, а также у животных, получавших салифен, площадь тел нейронов составляла 9056 ± 134 и 8755 ± 204 мкм² соответственно. Размеры нейронов слоя VI у животных всех трех групп: контрольных, переживших перинатальную гипоксию и впоследствии получавших салифен практически не различались (5149 ± 221 , 4906 ± 123 и 5237 ± 128 мкм² соответственно).

Результаты электронно-микроскопического исследования показали, что на 80-е и 90-е сутки у животных, перенесших перинатальную гипоксию, в отличие от интактных животных того же возраста, в неокортексе присутствовали нейроны, в цитоплазме которых эндоплазматическая сеть была представлена преимущественно короткими каналами с малым количеством рибосом. Между каналами были неравномерно рассеяны немногочисленные отдельные рибосомы и полисомы. Комплекс Гольджи имел умеренно развитые цистерны (рис. 1, а, б). В верхних слоях неокортекса участки нейропила с большим содержанием синаптических контактов, в отличие от контроля, были развиты слабо. Сформировавшиеся синаптические контакты преобладали на дендритах крупного и среднего размера. Аксошипиговые синапсы, широко представленные в нейропиле у контрольных животных, у крыс, переживших воздействие гипоксии, были единичны (рис. 2, а).

В экспериментах с применением салифена было обнаружено, что ультраструктурная организация нейронов не отличается от таковой в контроле. Существенно увеличилось количество

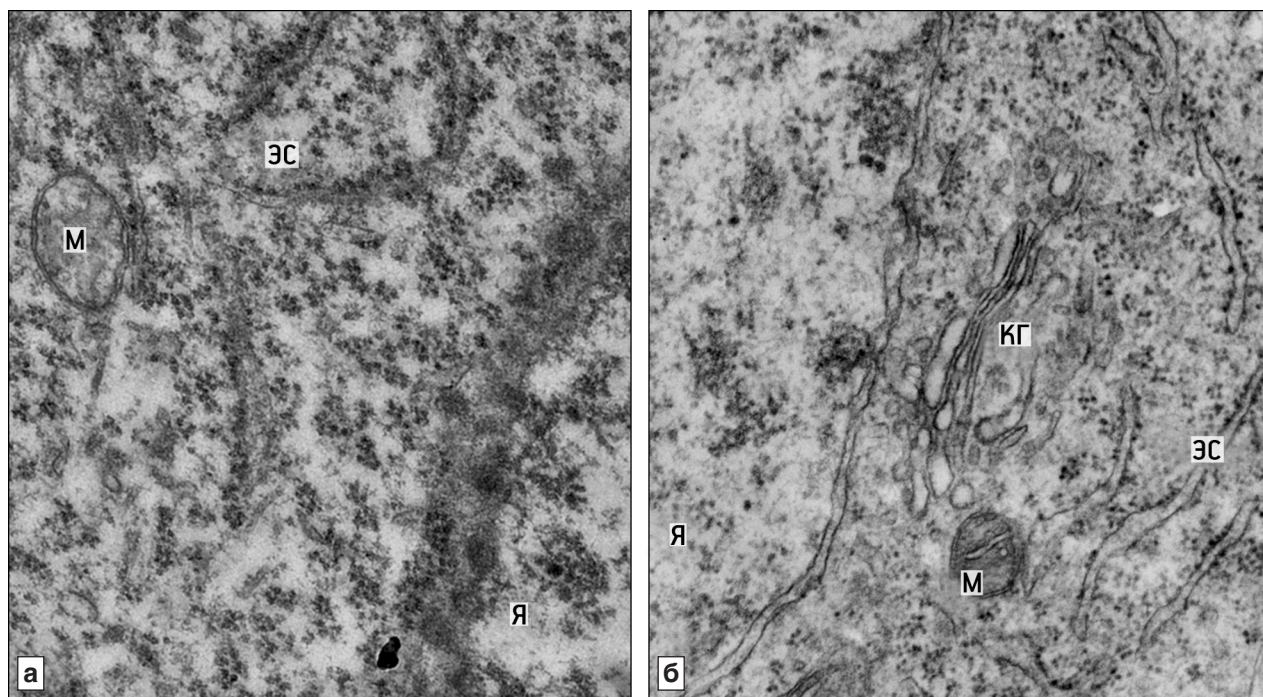


Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крысы на 90-е сутки после рождения в контроле (а) и после воздействия острой перинатальной гипоксии (б).

а — ядро (Я) с типичным расположением хроматина; гранулярная эндоплазматическая сеть (ЭС); митохондрии (М); б — иное распределение хроматина в Я нейрона; каналы ЭС с единичными рибосомами; комплекс Гольджи (КГ) — меньшее количество свободных полисом по сравнению с контролем. Ув. 40 000

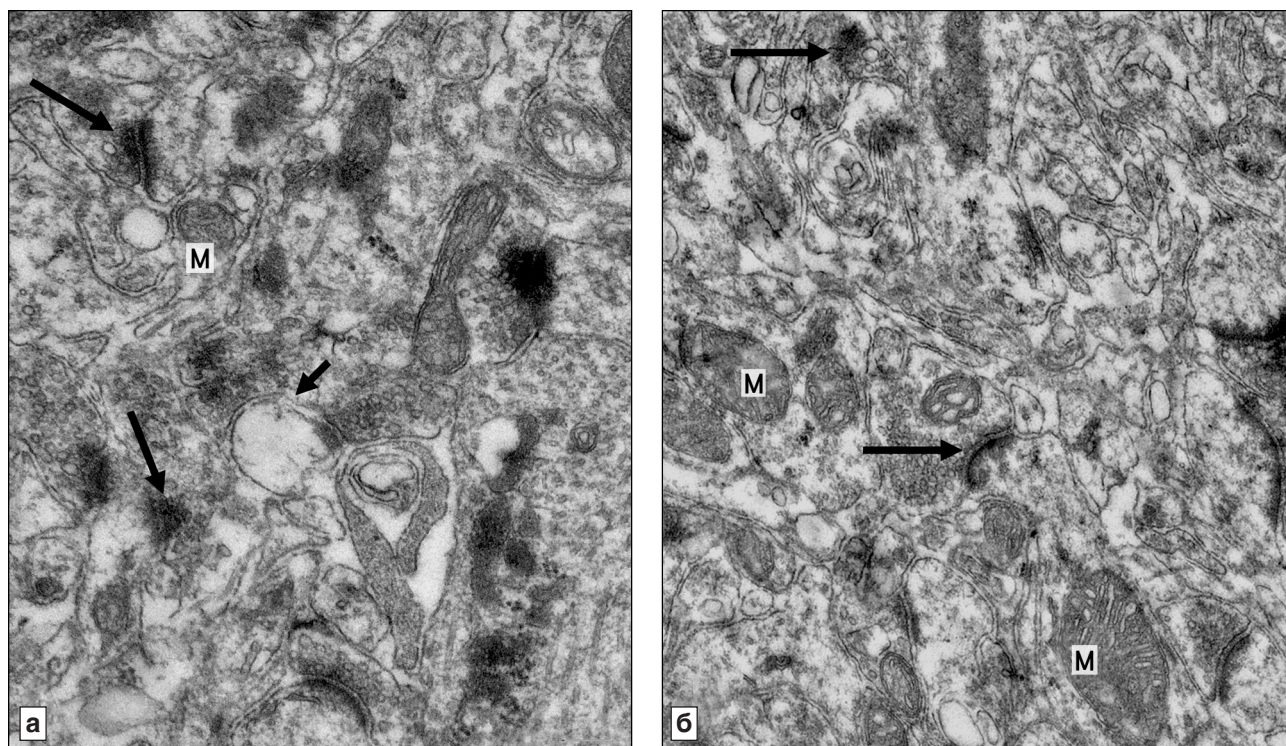


Рис. 2. Участки нейротрипы с высокой численностью синаптических контактов в соматосенсорной области неокортекса крысы на 90-е сутки после воздействия только острой перинатальной гипоксии (а) и с последующим применением салифана (б).

а — преобладание синапсов на дендритных отростках (длинные стрелки), немногочисленные формирующиеся контакты на шипиках дендритов; отдельные отежные отростки астроцитов (короткая стрелка); б — сформированные синапсы (стрелки); отсутствие отежных отростков астроцитов, обилие активных митохондрий (М). Ув. 40 000

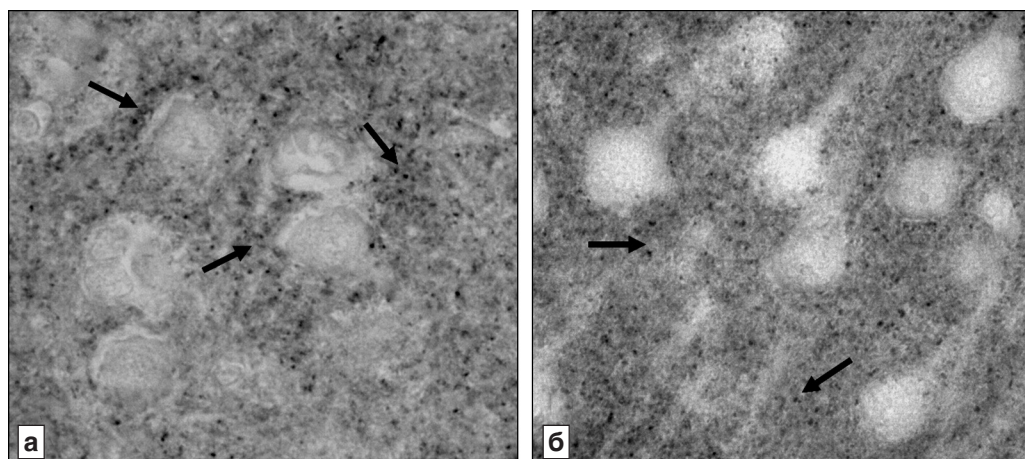


Рис. 3. Соматосенсорная область неокортекса интактной (а) крысы и на 90-е сутки после воздействия острой перинатальной гипоксии (б).

а — высокая плотность расположения синаптических структур (стрелки); б — сниженная плотность синаптических структур (стрелки). Иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин. Об. 100, ок. 10

терминальных отростков, в том числе шипиков с шипиковым аппаратом, а также синаптических контактов с аксональными терминалями. В верхних слоях неокортекса имелись участки нейропила с высокой численностью синаптических контактов (см. рис. 2, б), сходные с таковыми в контроле.

Иммуноцитохимическая реакция на СФ показала, что у животных, получавших салифен после перинатальной гипоксии, во всех слоях неокортекса плотность расположения синаптических структур была незначительно выше, чем у крыс, перенесших только гипоксию (рис. 3, а, б). Однако у животных в обеих этих группах оптическая плотность продукта реакции на СФ в глубоких слоях (V–VI) была значительно ниже (почти в 2 раза), чем в контроле (таблица).

Обсуждение полученных данных. Есть основание полагать, что выявленные структурные перестройки в нейронах неокортекса у взрослых крыс являются следствием воздействия острой гипоксии, перенесенной в перинатальный период. Обращает на себя внимание реакция пирамидных нейронов слоя V, которая в результате приводит к гибели значительного их

числа, а также нарушение синаптогенеза в глубоких слоях неокортекса.

Избирательная реакция нейронов в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды известна еще со времен Рамон-и-Кахаля. В данной работе выявлены преимущественная дегенерация больших пирамидных нейронов слоя V, уменьшение их размеров и численности. В связи с этим можно предположить, что возникает большая вероятность модификации многочисленных связей (таламусом, стриатумом, промежуточным мозгом, ядрами черепномозговых нервов) мощного эфферентного кортико-спинального тракта, образованного аксонами больших пирамидных нейронов.

Недавние исследования показали, что одной из причин изменения морфометрических параметров нейронов может быть нарушение регуляции внутриклеточных процессов (прежде всего, нарушение синтеза белков, экспрессии осмотических транспортеров, перегруппировки цитоскелета и т. д.), несомненно, изменяющих и функции этих нейронов [8–10].

На воздействие перинатальной гипоксии, помимо эфферентной части кортико-спинального

Оптическая плотность продукта иммуногистохимической реакции на синаптофизин в разных слоях неокортекса у крыс ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, усл. ед.)

Слои неокортекса	Группы крыс		
	Контрольная (интактные животные)	После перинатальной гипоксии	После гипоксии+салифен
II–III	0,1249±0,0020	0,1169±0,0010	0,126±0,010
IV	0,107±0,004	0,106±0,012	0,111±0,006
V	0,163±0,015	0,073±0,008	0,094±0,018
VI	0,1087±0,0020	0,042±0,003	0,065±0,004

тракта, реагирует также и его афферентная часть в виде задержки формирования синапсов в неокортексе. Эта задержка в большей мере характерна для синапсов, расположенных на терминальных отростках дендритов и особенно на их шипиках. Такой тип синапсов характерен для таламокортикальных и внутрикортикальных ассоциативных путей. Поэтому, вероятно, происходит изменение и афферентной части пирамидной системы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможном возникновении еще одного звена в патогенезе энцефалопатий у новорожденных в результате воздействия ишемии—гипоксии, связанного с кортикоспинальной системой. Клинические данные показали, что поражения нервной системы в перинатальный период у детей, как правило, с возрастом в большинстве случаев приводят к инвалидизации, при этом могут развиваться детский церебральный паралич, симптоматическая эпилепсия, задержка умственного развития, а также нарушения в когнитивной и эмоциональной сферах [1]. Эта медицинская и социальная проблема определяет актуальность проведения фундаментальных и клинических исследований, направленных на поиск и разработку новых нейропротективных средств. В настоящее время активно проводящиеся в данном направлении работы основываются на данных о механизмах и мишенях воздействия гипоксии в головном мозгу [6, 7, 11].

В данной работе при тех же экспериментальных условиях было проведено исследование протективных свойств одного из отечественных препаратов — «Салифена», синтезированного на основе гаммаамино-масляной кислоты и проходящего доклинические исследования. Ранее на модели преэклампсии было показано, что салифен обладает эндотелиопротекторными, антиоксидантными, антиагрегантными, антикоагулянтными, антистрессорными свойствами [1, 2, 5], однако, его не исследовали при гипоксии ЦНС.

Полученные данные показали, что применение салифена в терапевтической дозе после воздействия гипоксии оказывает корректирующее действие на процессы созревания неокортекса, особенно синаптогенеза.

Представленные в статье данные свидетельствуют о том, что гипоксия новорожденных вызывает умеренные повреждения всех элементов нервной ткани, которые укладываются в рамки (понятия) нозологической единицы — энцефалопатия, когда, с одной стороны, отсутствуют значительные очаговые изменения, а с другой — нарушается гомеостаз и модифицируется программа становления структур, межнейронных связей и

функций головного мозга, что приводит к формированию патологии в последующем онтогенезе. Полученные данные свидетельствуют и о том, что после повреждающего воздействия гипоксии салифен, вероятно, оказывает нейропротективное действие, корректируя процессы дифференцировки нейронов и формируя синаптические связи, что определяет его клиническую эффективность и служит основанием для продолжения исследований в этом направлении.

Авторы сердечно благодарят дирекцию Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН за предоставленную возможность работы на современном электронном микроскопе.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10272.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власюк В.В. Родовая травма и перинатальные нарушения мозгового кровообращения. СПб.: Нестор-История, 2009.
2. Иванова Л.Б., Карамышева В.И., Перфилова В.Н., Тюренков И.Н. Влияние производных ГАМК на функцию эндотелия крыс с экспериментальным гестозом // Пробл. репродукции. 2012. Т. 18, № 1. С. 28–30.
3. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем перинатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга // Журн. эволюц. биохим. 2012. Т. 48, № 5. С. 467–473.
4. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Тюренков И.Н. Воздействие перинатальной гипоксии на структуры гематоэнцефалического барьера у крыс при введении салифена // Морфология. 2015. Т. 148, вып. 6. С. 78–82.
5. Тюренков И.Н., Перфилова Т.А., Попова Л.Б. и др. Изменение оксидантного и антиоксидантного статуса у самок с экспериментальным гестозом под влиянием производных ГАМК // Бюл. exper. биол. 2013. Т. 155, № 3. С. 340–341.
6. Fan X., Kavalars F., Heijen C.J. et al. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury // Neuropharmacology. 2010. Vol. 8, № 4. P. 324–334.
7. Herrera-Marschitz M., Neira Pefia T., Rojas-Mancilla E. et al. Short- and long-term consequences of perinatal asphyxia: looking for neuroprotective strategies // Adv. Neurobiol. 2015. № 10. P. 169–198.
8. Hoffmann E.K., Pedersen S.F. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways // Acta Physiol (Oxf.). 2011. Vol. 202, № 3. P. 465–485.
9. Pedersen S.F., Hoffmann E.K., Novak I. Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer // Front Physiol. 2013. Vol. 4. P. 233–236.
10. Platonova A., Ponomarchuk O., Boudreault F. et al. Role of cytoskeleton network in anisomotic volume changes of intact and permeabilized A549 cells // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848. P. 2337–2343.
11. Yamashita T., Abe K. Therapeutic approaches to vascular protection in ischemic stroke // Acta Med. Okayama. 2011. Vol. 65, № 4. P. 219–223.

Поступила в редакцию 30.05.2016

REMOTE CONSEQUENCES OF PERINATAL HYPOXIA AND THEIR POSSIBLE PHARMACOLOGICAL CORRECTION: REACTIONS OF NEOCORTICAL NERVE CELLS AND SYNAPSES

V.A.Otellin¹, L.I.Khozha¹, T.T.Shishko¹, I.N.Tyurenkov²

Morphological features of neurons and synaptic contacts were studied in the remote period of ontogenesis (days 80–90) in the neocortex of 28 Wistar rats after acute perinatal hypoxia and subsequent saliphen application. Intact animals of the same age were used as control. Light and electron microscopy methods were used, as well as immunocytochemical method for synaptophysin demonstration and morphometric methods. It was shown that hypoxia in the perinatal period lead to structural

changes in the neocortical neurons in adult animals. Some big pyramidal neurons of layer V were degenerated, the density of synaptic contacts in deep layers of the neocortex was decreased (almost twice). The disturbances revealed may have been caused by the modification of the program of development of structures and interneuron connections that accounts for functional brain pathology formation. It was found that application of “Salifen” medication, developed in Russia, after hypoxia had a protective effect on neurons, their differentiation and synaptogenesis. This suggests the clinical efficacy of this drug and serves as a basis for further research in this direction.

Key words: *perinatal hypoxia, neurons, synaptic contacts, neocortex, salifen*

¹ Laboratory of Ontogenesis of Nervous System, RAS I.P.Pavlov Institute of Physiology; ² Department of Pharmacology, Volgograd State Medical University