

© М.О.Самойлов, А.В.Чурилова, Т.С.Глущенко, 2015
УДК 611.813.3:612.273.2:599.323.4

М.О.Самойлов, А.В.Чурилова, Т.С.Глущенко

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ ЭФФЕКТОВ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ, НАПРАВЛЕННЫХ НА КОРРЕКЦИЮ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М.О.Самойлов), Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург

На 5 группах крыс (по 6 животных в каждой) исследованы изменения нейронов полей СА1 и СА4 гиппокампа через 7 сут после тяжелой гипобарической гипоксии (180 мм рт.ст., 3 ч) при разных по кратности (1, 3 и 6 сеансов) режимах прекондиционирования (ПК) умеренной гипобарической гипоксией (360 мм рт.ст., 2 ч, за 24 ч до воздействия тяжелой гипоксией). Обнаружено, что 1-кратное ПК не предотвращает повреждений структуры нейронов и их гибели к 7-м суткам после тяжелой гипоксии. В то же время, 6-, и особенно, 3-кратные сеансы ПК индуцируют протективные механизмы предотвращения повреждений нейронов. При 6-кратном ПК, в отличие от 3-кратного, в нейронах гиппокампа обнаружен умеренный хроматоз, что может являться следствием пролонгированной гиперметаболической активности нейронов и свидетельствовать об их функциональной перегрузке.

Ключевые слова: гиппокамп, нейроны, гипобарическая гипоксия, прекондиционирование, нейропротекция

Гипобарическая (высотная) гипоксия широко распространена в природе (в частности, при подъеме в горы) и может служить в качестве удобной, создаваемой в барокамере, экспериментальной модели для раскрытия механизмов действия различной степени дефицита кислородного снабжения, сопряженного с пониженным атмосферным давлением, на молекулярно-клеточном, органном и организменном уровнях. Установлено, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГГ) при подъеме в барокамере на высоту 6500–10 000 м вызывает многочисленные функциональные нарушения поведения и когнитивных процессов (памяти, обучения), а также тяжелые структурные повреждения нейронов наиболее уязвимых областей мозга (неокортекса, гиппокампа) [10, 15, 18].

В последнее десятилетие появились доказательства, свидетельствующие о том, что умеренная гипобарическая гипоксия в режимах пре- и посткондиционирования способна подавлять запускаемую ТГГ молекулярную программу нейрональной клеточной гибели и существенно предотвращать развитие структурных и функциональных повреждений мозга [4, 14, 15]. В этих исследованиях протективный эффект обнаружен при 3-кратном прекондиционировании (ПК). Вместе с тем, большой теоретический и практический интерес представляет экспериментальный срав-

нительный анализ действия и других, различающихся по кратности, режимов ПК. Ранее было показано, что одно- и многократные сеансы ПК оказывают неодинаковое влияние на коррекцию структурных повреждений нейронов гиппокампа крыс, индуцируемых ТГГ к 3-м суткам после ее воздействия (т.е. в ранний период) [8]. Цель настоящей работы — анализ изменений нейронов гиппокампа в отдаленный срок после ТГГ, когда более отчетливо проявляются морфологические последствия этого воздействия у непрекондиционированных крыс и при различных по кратности режимах ПК.

Материал и методы. Исследования выполнены на взрослых крысах-самцах массой 200–250 г линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (89/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П.Павлова РАН.

ТГГ создавали в барокамере проточного типа при атмосферном давлении 180 мм рт.ст. в течение 3 ч. В режиме ПК крысы были подвергнуты умеренной гипобарической гипоксии (давление в барокамере составляло 360 мм рт.ст.) в течение 2 ч за 24 ч до воздействия тяжелой гипоксией. Эксперименты проведены на 5 группах крыс (по 6 животных в каждой). Животные 1-й группы служили в качестве контроля, их помещали на 2 ч в барокамеру, но без изменения атмо-

Сведения об авторах:

Самойлов Михаил Олегович (e-mail: samoilov@pavlov.infran.ru), Чурилова Анна Викторовна (e-mail: annch05@mail.ru), Глущенко Татьяна Сергеевна (e-mail: tsgluschenko@mail.ru), лаборатория регуляции функций нейронов мозга, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

ферного давления, крыс 2-й группы — подвергали тяжелой гипоксии, на животных 3-, 4-й и 5-й групп перед тяжелой гипоксией оказывали 1-, 3- и 6-кратное ПК-воздействие. Интервал между сеансами у крыс 4-й и 5-й групп составлял 24 ч. Через 7 сут после ТГГ крыс декапитировали и извлекали головной мозг, который фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 24 ч, и заливали в парафин по стандартному протоколу. Изготавливали серии фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм на уровне –2,8 мм от брегмы, монтировали их на предметные стекла и окрашивали в 0,1% растворе толуидинового синего по методу Ниссля. Полученные срезы исследовали с использованием морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Olympus CX31 (Olympus, Япония), цифровой камеры Progres CT1 (Jenoptic, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением «ВидеоТест Мастер Морфология» 5.2 (разработка ООО «Видео Тест», Санкт-Петербург, Россия). С помощью компьютерной программы «Видеотест Мастер Морфология 5.2» в полях CA1 и CA4 гиппокампа у крыс всех групп на протяжении примерно 450 мкм подсчитывали нейроны, оптическая плотность которых попадала в интервал от 0,15 до 0,45 усл. ед. яркости относительно показателя яркости фона соответствующего препарата.

Результаты исследования. Через 7 сут после ТГГ были выявлены существенные различия в строении нейронов у непрекондиционированных, а также у 1-, 3- и 6-кратно ПК-крыс как в дорсальном (CA1), так и в вентральном (CA4) отде-

лах гиппокампа. ТГГ индуцировала экстенсивные морфологические повреждения в полях CA1, CA4 и вызывала селективную гибель нейронов (до 30–40% от контроля) (рис. 1 а, б; 2). У 1-кратно ПК-крыс в ответ на ТГГ происходили схожие изменения (см. рис. 2). В отличие от этого 3- и 6-кратное ПК предотвращало потерю нейронов в полях CA1 и CA4 вслед за ТГГ (см. рис. 1, в; 2).

ТГГ вызывала отчетливо выраженные структурные повреждения нейронов гиппокампа, что проявлялось появлением значительного количества гиперхромных пикнотизированных клеток, перичеселлюлярным отеком. Наряду с этим, во многих нейронах наблюдались глобальный хроматоллиз, вакуолизация цитоплазмы, разрушение ядра и ядрышка (рис. 3, а, б). При 1-кратном ПК вслед за ТГГ обнаруживалась схожая картина структурных повреждений нейронов в полях CA1 и CA4 (см. рис. 3, в). В отличие от этого, у 3-кратно ПК-крыс после ТГГ строение нейронов было близко к таковому у контрольных животных (см. рис. 3, г). В то же время, у 6-кратно ПК-крыс вслед за ТГГ в большинстве нейронов полей CA1 и CA4 выявлялся умеренный хроматоллиз, проявлявшийся разрушением больших глыбок хроматофильного вещества (рибонуклеопро-

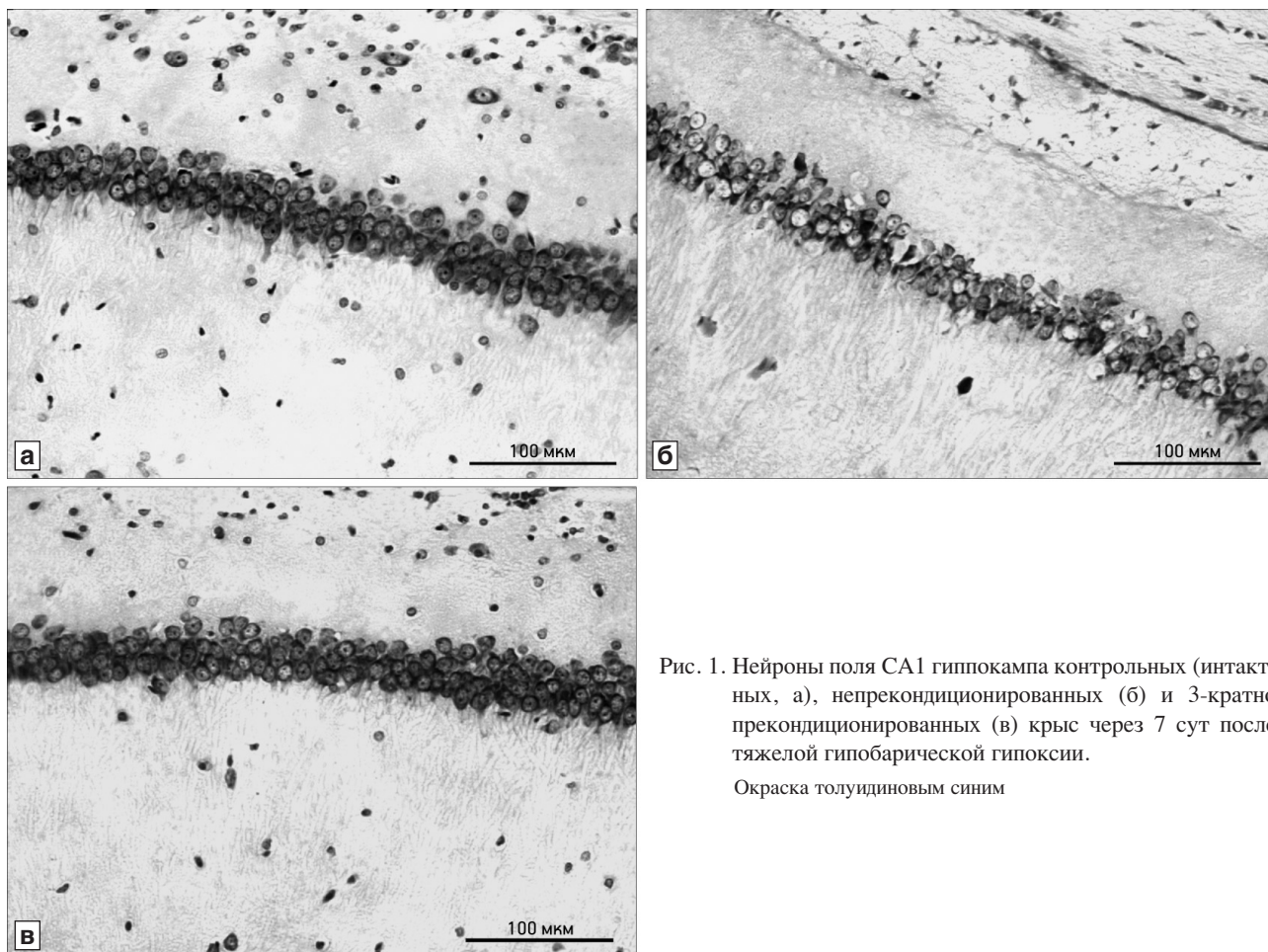


Рис. 1. Нейроны поля CA1 гиппокампа контрольных (интактных, а), непрекондиционированных (б) и 3-кратно преко́ндиционированных (в) крыс через 7 сут после тяжелой гипобарической гипоксии.

Окраска толуидиновым синим

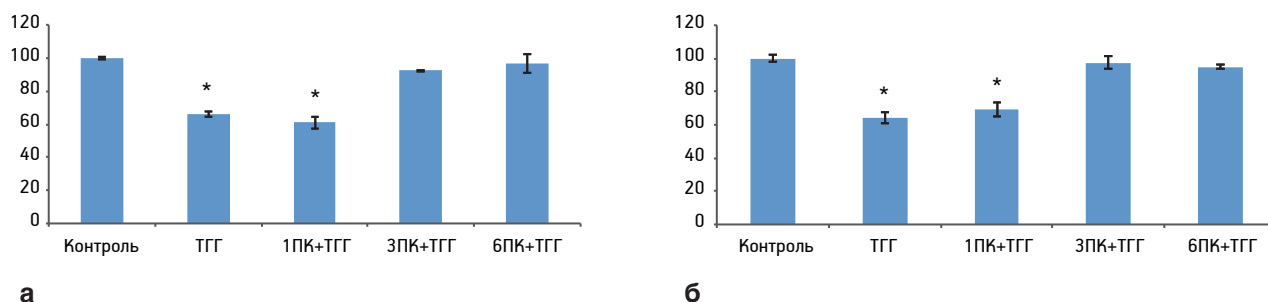


Рис. 2. Относительное содержание нейронов в полях CA1 (а) и CA4 (б) гиппокампа крыс через 7 сут после тяжелой гипобарической гипоксии.

По горизонтальной оси — ТГГ — тяжелая гипобарическая гипоксия; 1ПК+ТГГ, 3ПК+ТГГ, 6ПК+ТГГ — 1-, 3-, 6-кратно прекоординированная ТГГ соответственно; по оси ординат — изменения по сравнению с контролем, принятым за 100%. Звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при $P \leq 0,05$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

теиновых гранул), его распылением в цитоплазме, декомпозицией ядрышка (см. рис. 3, д).

Обсуждение полученных данных. В проведенном исследовании установлено, что к 7-м суткам вслед за ТГГ происходят существенные повреждения структур нейронов дорсального (CA1) и вентрального отделов (CA4) гиппокампа. Ранее нами [8] были выявлены отчетливо выраженные морфологические изменения нейронов этих областей к 3-м суткам после ТГГ, которые в более отдаленный период (7 сут) значительно усиливаются, вплоть до гибели 30–40% клеток. Во многих оставшихся нейронах отмечаются признаки апоптотического и некротического повреждения. При различных по кратности режимах ПК, предшествующих ТГГ, выявлена специфика их действия, направленного на предотвращение этих повреждений. Один сеанс ПК оказывается неэффективным в этом отношении. 6-, и особенно, 3-кратные сеансы ПК индуцируют протективные механизмы предотвращения повреждений нейронов.

Ранее было показано, что ТГГ индуцирует в гиппокампе экспрессию проапоптотических факторов Вах, с-Jun, JNK, а 3-кратное ПК вызывает их подавление и усиление экспрессии антиапоптотических факторов Bcl-2, Bcl-xL, ERK-MAP [4, 6, 14].

Большой интерес представляют выявленные различия эффектов 3- и 6-кратного ПК на структуру нейронов гиппокампа через 7 сут после ТГГ. При этом морфологическая картина при 3-кратном ПК близка к контролю. В то же время, в большинстве нейронов как CA1, так и CA4-полей гиппокампа у 6-кратно ПК-крыс отмечается умеренный хроматолиз. Этот процесс, очевидно, связан с функциональной нейрональной перегрузкой в результате чрезмерного количества ПК-воздействий, предшествующих ТГГ, что, вероятно, может приводить к пролонгированной гиперметаболической активности клеток. По

всей видимости, это явление может иметь негативные функциональные последствия. Как ранее было показано, при использовании теста водного лабиринта Мориса — экспериментальной модели изучения обучения и памяти, ТГГ вызывала нарушение памяти у крыс, а 3-кратное ПК практически полностью предотвращало это расстройство [1, 2]. Очевидно, это может быть обусловлено повышенным метаболизмом нейронов, связанным с умеренным хроматолизом. В многочисленных работах середины прошлого столетия было установлено, что умеренный хроматолиз связан с обеднением нервных клеток мозга рибонуклеопротеидами при их повышенной функциональной активности [3]. При длительной функциональной нагрузке, обусловленной продолжительной стимуляцией нейронов различными факторами, в том числе, очевидно, и чрезмерным количеством эпизодов гипоксического ПК, может развиваться так называемая «хромофобия утомления», которая приводит к функциональным расстройствам. Полученные нами данные следует учитывать при выборе наиболее эффективного нейропротективного режима ПК, каковым, в частности, является 3-кратное ПК-воздействие умеренной гипобарической гипоксии. Механизмы нейропротекции повреждений, вызываемых тяжелыми формами гипоксии/ишемии, интенсивно изучаются в последнее десятилетие [4, 11, 19]. Установлено, что важная роль в предотвращении структурных и функциональных повреждений клеток мозга при этом принадлежит активации проадаптивных генов и белков. Было продемонстрировано, что 3-кратное гипоксическое ПК вызывает в нейронах гиппокампа и неокортекса гиперэкспрессию проадаптивных ранних генов и их продуктов — транскрипционных факторов (NGFI-A, с-Fos, pCREB, NF-kB, GR, MR, Hif-1b), контролирующих процессы нейропластичности и выживания/гибели нервных клеток [4]. Важно отметить, что их экспрессия усиливалась как до, так и после

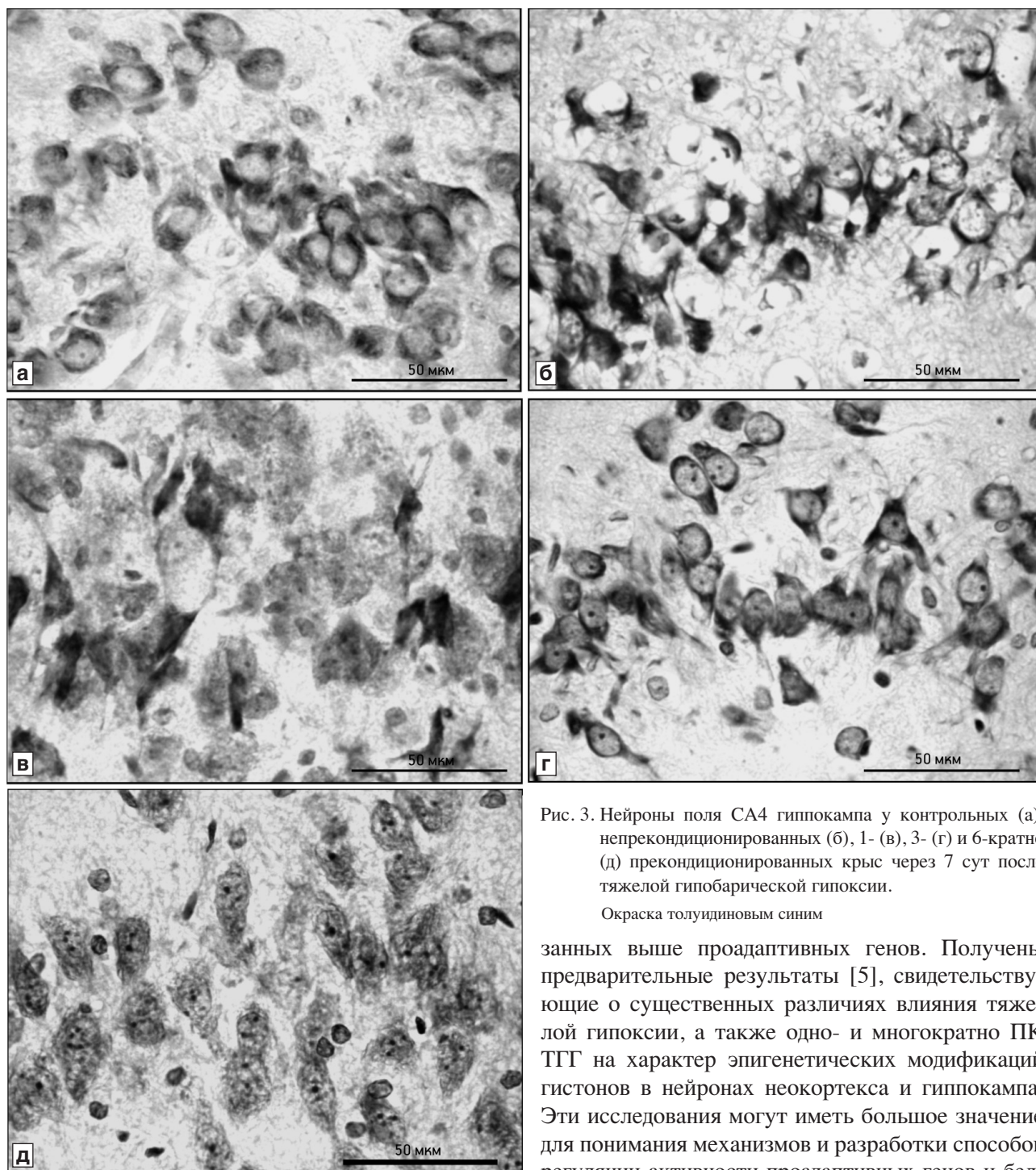


Рис. 3. Нейроны поля СА4 гиппокампа у контрольных (а), непрекondиционированных (б), 1- (в), 3- (г) и 6-кратно (д) прекондиционированных крыс через 7 сут после тяжелой гипобарической гипоксии.

Окраска толуидиновым синим

занных выше проадаптивных генов. Получены предварительные результаты [5], свидетельствующие о существенных различиях влияния тяжелой гипоксии, а также одно- и многократно ПК ТГГ на характер эпигенетических модификаций гистонов в нейронах неокортекса и гиппокампа. Эти исследования могут иметь большое значение для понимания механизмов и разработки способов регуляции активности проадаптивных генов и белков, участвующих в повышении резистентности мозга к тяжелым формам гипоксии/ишемии.

Таким образом, проведенное исследование выявило различия влияния разных режимов (1-, 3- и 6-кратных сеансов) ПК умеренной гипобарической гипоксии на строение нейронов полей СА1, СА4 гиппокампа у крыс в отдаленный период (7 сут) после тяжелой гипоксии. 1-кратное ПК не оказывало протективного действия на структурные повреждения нейронов, вызываемые ТГГ, тогда как многократные (3 и 6 сеансов) ПК-воздействия предотвращали их проявление.

ТГГ. Вместе с тем, обнаружено, что в отличие от этого, 1-кратное ПК не способно повышать экспрессию этих транскрипционных факторов, а также продуктов их генов-мишеней — нейротрофических белков BDNF и Bcl-2 [4, 7, 9, 13, 16].

В последние годы выдвинуто положение о важной роли эпигенетических механизмов, регулирующих экспрессию генов, в реакциях нейронов мозга на гипоксию/ишемию [12, 17, 20]. Эпигенетические модификации гистонов (ацетилирование, метилирование) вызывают активацию или репрессию транскрипции, в том числе и ука-

Однако при 6-кратном ПК, в отличие от 3-кратного, в нейронах дорсального (CA1) и вентрального (CA4) отделов гиппокампа выявлялся умеренный хроматолиз, свидетельствующий, очевидно, о клеточной пролонгированной гиперметаболической активности, связанной с функциональной перегрузкой, обусловленной большим количеством ПК-воздействий. Это может негативно отражаться на процессах обучения и памяти после ТГГ. Полученные данные следует учитывать при разработке эффективных немедикаментозных способов протекции клеток мозга при повреждающих воздействиях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00516.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушения выработки и воспроизведения условий реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс // Журн. высш. нервн. деят. 2004. Т. 54, № 6. С. 795–801.
2. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние тяжелой гипоксии на эмоциональное поведение крыс: корректирующий эффект preconditionирования // Докл. РАН. 2004. Т. 395. С. 109–111.
3. Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. М.: Медицина, 1965.
4. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2012. Т. 98, № 1. С. 108–126.
5. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Эпигенетические факторы в механизмах гипоксии мозга // Научные труды IV съезда физиологов СНГ. М.; Сочи: изд. Института иммунофизиологии, 2014. С. 30–31.
6. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Ситник Н.А. и др. Preconditionирование модифицирует активность митоген-активируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора c-jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелой гипобарической гипоксией // Нейрохимия. 2007. Т. 24, № 1. С. 219–226.
7. Сидорова М.В., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В., Самойлов М.О. Влияние различных режимов умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию hif-1α в неокортексе крыс // Украинск. физиол. журн. 2013. Т. 59, № 6. С. 111–115.
8. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменения нейронов гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 1. С. 7–11.
9. Чурилова А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О. Изменение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе у крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 5. С. 7–13.
10. Kadar T., Dachir S., Shukitt-Hale B., Levy A. Sub-regional hippocampal vulnerability in various animal models leading to cognitive dysfunction // J. Neural Transm. 1998. Vol. 105, № 8–9. P. 987–1004.
11. Obrenovitch T. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // Physiol. Rev. 2008. Vol. 88, № 1. P. 211–247.
12. Perez-Perri J.I., Acevedo J.M., Wappner P. Epigenetics: new questions on the response to hypoxia // Int. J. Mol. Sci. 2011. Vol. 12. P. 4705–4721.
13. Rybnikova E., Glushchenko T., Churilova A. et al. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning // Brain Res. 2011. Vol. 1381. P. 66–77.
14. Rybnikova E., Sitnik N., Glushchenko T. et al. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // Brain Res. 2006. Vol. 1089. P. 195–202.
15. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E. et al. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Beh. Brain Res. 2005. Vol. 160. P. 107–114.
16. Samoilov M., Churilova A., Glushchenko T., Rybnikova E. Neocortical pCREB and BDNF expression under different modes of hypobaric hypoxia: role in brain hypoxic tolerance in rats // Acta Histochem. 2014. Vol. 116, № 5. P. 949–957.
17. Schweizer S., Meisel A., Marschensz S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow. Metab. 2013. Vol. 38. P. 1335–1346.
18. Shukitt-Hale B., Kadar T., Marlowe B.E. et al. Morphological alterations in the hippocampus following hypobaric hypoxia // Hum. Exp. Toxicol. 1996. Vol. 15, № 4. P. 312–319.
19. Steiger H., Hangii D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications // Acta Neurochir. Wien. 2007. Vol. 149. P. 1–10.
20. Watson J.A., Watson C.J., McCann A., Baugh J. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response // Epigenetics. 2010. Vol. 5, № 4. P. 293–296.

Поступила в редакцию 05.05.2015

MORPHOLOGICAL DIFFERENCES BETWEEN THE EFFECTS OF VARIOUS MODES OF PRECONDITIONING AIMED AT CORRECTING THE DAMAGE TO THE HIPPOCAMPAL NEURONS BY SEVERE HYPOBARIC HYPOXIA

M.O. Samoilov, A.V. Churilova, T.S. Glushchenko

In 5 groups of rats (6 animals in each), the changes of neurons in hippocampal fields CA1 and CA4 were studied 7 days after severe hypobaric hypoxia (180 mm Hg, for 3 h) preceded by various numbers (1, 3 and 6) of sessions of preconditioning (PC) by mild hypobaric hypoxia (360 mm Hg, for 2 h, 24 h prior to severe hypoxia). It was found that a single session of PC did not prevent the damage to the structure of neurons and their death after exposure to severe hypoxia. Meanwhile, 6, and especially 3 sessions of PC induced protective mechanisms of neuronal damage prevention. In rats after 6 sessions of PC, unlike those exposed to 3 sessions, mild chromatolysis of hippocampal neurons was demonstrated. This could result from prolonged hypermetabolic activity of neurons and indicate their functional overloading.

Key words: *hippocampus, neurons, hypobaric hypoxia, preconditioning, neuroprotection*

Laboratory of Brain Neuron Function Regulation, RAS I. P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia