

© В. А. Отеллин, Л. И. Хожай, И. Н. Тюренков, 2015  
УДК 611.813.1:612.273.2:612.65:599.323.4

*В. А. Отеллин<sup>1</sup>, Л. И. Хожай<sup>1</sup>, И. Н. Тюренков<sup>2</sup>*

## ВОЗДЕЙСТВИЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА СТРУКТУРЫ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ САЛИФЕНА

<sup>1</sup> Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН В. А. Отеллин), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup> кафедра фармакологии (зав. — чл.-кор. РАН И. Н. Тюренков), Волгоградский государственный медицинский университет

Работа выполнена на крысах линии Вистар, которые были разделены на 3 группы: 1-я подопытная — крысы, подвергавшиеся гипоксии и получавшие салифен (в течение 14 сут в дозе 15 мг/кг), 2-я — контрольная — крысы только после гипоксии без лечения и 3-я — интактные животные (по 8–10 особей в каждой группе). Методом световой и электронной микроскопии изучено влияние салифена на структурные характеристики элементов гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) неокортекса у крыс после воздействия гипоксии в ранний постнатальный период — на 2-е сутки жизни (модель недоношенной беременности человека). Результаты показали, что салифен оказывает положительное действие на состояние микроциркуляторного русла после перинатальной гипоксии, в частности, на состояние эндотелиоцитов. Отмечены его активное участие в компенсаторно-приспособительных реакциях ГЭБ в ответ на воздействие гипоксии и перспективность дальнейших исследований протективных свойств салифена.

**Ключевые слова:** перинатальная гипоксия, неокортекс, эндотелиоциты, гематоэнцефалический барьер, салифен

В клинических и экспериментальных исследованиях последних лет все большее внимание уделяется изучению механизмов гипоксически-ишемических поражений головного мозга у новорожденных. Перинатальная гипоксия является одной из ведущих причин младенческой смертности и инвалидности [3]. Перинатальные поражения нервной системы у детей ведут к инвалидизации почти в 40% случаев: по мере взросления у них могут развиваться детский церебральный паралич, симптоматическая эпилепсия, задержка умственного развития, 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. Активно проводящиеся в данном направлении работы базируются на данных о механизмах и мишенях гипоксических воздействий в головном мозгу [3, 8, 9, 11, 12]. При изучении влияний воздействия гипоксии в ранний постнатальный период были обнаружены нарушения структур и функций головного мозга [4–6]. Сопоставление полученных морфологических и физиологических фактов с данными клиницистов позволили полагать, что наши эксперименты моделируют

одну из форм энцефалопатии у новорожденных [4]. Эта отработанная в лаборатории модель пригодна для изучения нейропротективных эффектов разных препаратов. После консультаций с фармакологами Волгоградского медицинского университета, специализирующихся на разработке и изучении нейропротекторов, было решено вначале использовать отечественный препарат «Салифен», который представляет собой композицию фенибута с салициловой кислотой и оказывает нейро-, гравидо- [2] и эндотелиопротекторное действие, очевидно обусловленное его ГАМК-А- и ГАМК-Б-миметическим свойством [10]. Этот препарат обладает также антигипоксическими, антиоксидантными, антиагрегантными, антикоагулянтными, антистрессорными свойствами, что позволило предположить, что он может оказаться эффективным нейропротектором при моделировании энцефалопатий у новорожденных, вызванных воздействием гипоксии в ранний постнатальный период.

Цель настоящей работы — изучение структурных характеристик элементов гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) головного мозга животных после перинатальной гипоксии и введения салифена.

### Сведения об авторах:

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

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

**Материал и методы.** Воздействие гипоксии на головной мозг крысят осуществляли на 2-е сутки постнатального развития в барокамере в течение 1 ч при содержании в дыхательной смеси: кислорода — 7,6–7,8%; углекислого газа — 0,15–0,21%; азота — 91,8%, при температуре — 21,3–23 °C и нормальном общем давлении. В работе были использованы 3 группы животных: 1-я — экспериментальная группа — крысята, подвергавшиеся воздействию гипоксии и получавшие салифен через 1 сут после ее воздействия (в течение 14 сут, в дозе 15 мг/кг); 2-я — контрольная группа — животные, подвергавшиеся воздействию только гипоксии и 3-я — контрольная группа — интактные животные того же возраста. Каждая группа содержала по 8–10 крысят.

Материал исследовали на 20-е сутки после рождения. Все процедуры проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для проведения гистологических исследований мозг крысят фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали метиленовым синим (Sigma, США) по методу Ниссля и заключали в синтетическую среду Permaunt (Thermo, США). Исследования проводили под световым микроскопом Leica DME (Leica, Германия). Изображения получали при помощи цифровой видеокамеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Для компьютерной морфометрии использовали изображения, полученные с гистологических поперечных срезов конечного мозга на уровне Bregma –1,80 — –2,04 мм, на которых определяли площадь поперечных сечений капилляров. Измерения проводили на 10 серийных срезах мозга, взятого у 4 животных каждой исследованной группы. Статистическую обработку полученных показателей осуществляли при помощи пакета прикладных компьютерных программ Statistica 6.0, ImageScore Color и ORIGIN50. Значимость различий определяли по величине t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при  $P < 0,001$ .

Для электронно-микроскопического исследования фрагменты неокортекса (сенсомоторной области) обрабатывали по общепринятым схемам глутаросмиевой фиксации на соответствующих буферах, заливали в аралдит. Ультратонкие срезы после контрастирования уранилацетатом и ацетатом свинца просматривали в микроскопе Tescna G2 Spirit (FEI, Германия) при ускоряющем напряжении 70 кВ.

**Результаты исследования.** Исследование, проведенное на светооптическом уровне, показало, что салифен оказывает положительное влияние на сосуды микроциркуляторного русла в неокортексе крыс. На 20-е сутки постнатального развития у интактных крыс, а также у подвергавшихся перинатальной гипоксии, и у животных, получавших салифен, площадь поперечных срезов капилляров составила  $28670 \pm 64$ ,  $19981 \pm 48$  и  $27860 \pm 59$  мм<sup>2</sup> соответственно. Различия значений средних размеров капилляров у контрольных крыс и у получавших салифен оказались незначимыми в отличие от таковых у крыс, подвергавшихся перинатальной гипоксии.

Электронно-микроскопически были изучены структурные компоненты ГЭБ: эндотелиоциты капилляров и их специализированные контакты,

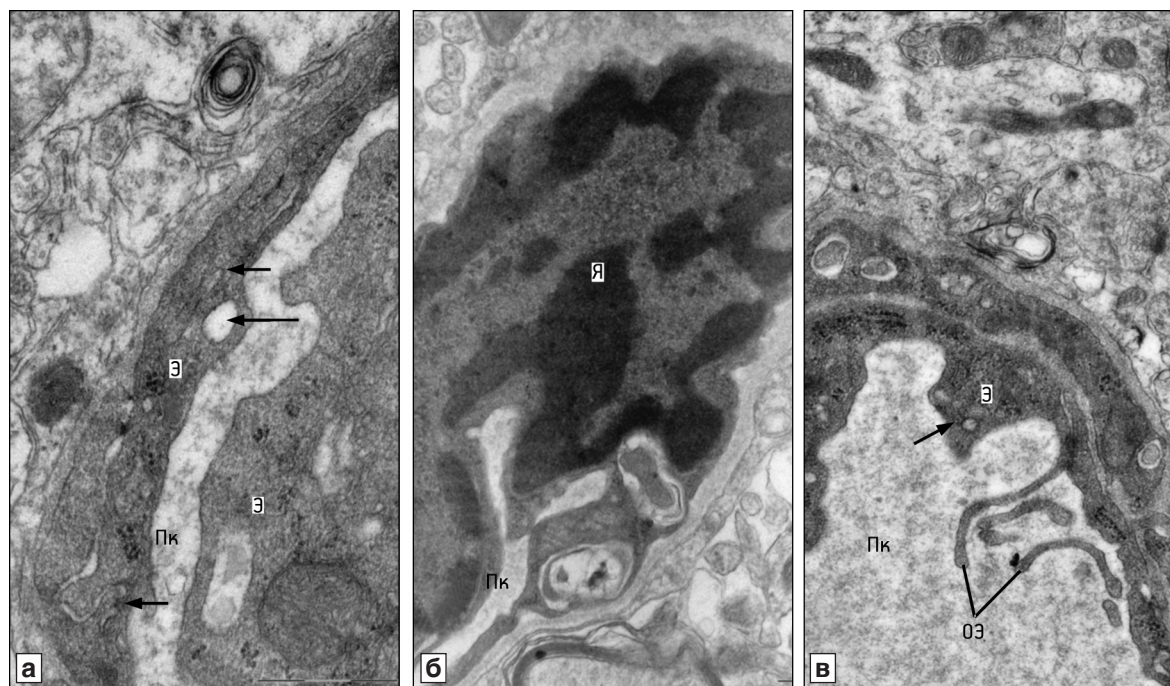
базальная мембрана, перициты вместе с окружающими астроцитами и их отростками.

У интактных животных во всех слоях неокортекса присутствовали капилляры на разных стадиях формирования и крупные сосуды. Ядра эндотелиоцитов капилляров были крупные, лопастеобразные и имели высокую электронную плотность, площадь цитоплазмы — невелика. В ней обнаруживались немногочисленные органеллы, преимущественно полисомы, единичные каналцы гладкой эндоплазматической сети и микروпиноцитозные пузырьки (рисунк, а).

Число специализированных контактов между эндотелиоцитами было небольшим. В просвете части сосудов можно было видеть отростки эндотелиоцитов. Базальная мембрана имела ровные контуры, но ее дифференцировка была неодинакова по всей окружности сосуда, встречались участки, практически не включающие в себя волокнистый внеклеточный материал, и изредка местами можно было наблюдать самые начальные этапы сгущения этих волокон. Перициты часто оказывались включенными в стенку капилляра. Снаружи базальной мембраны присутствовали отечные конечные ножки периваскулярных астроцитов.

У крыс после воздействия гипоксии размеры ядер и цитоплазмы эндотелиоцитов капилляров были больше, чем у интактных животных, что в ряде случаев приводило к сужению их просвета (см. рисунок, б). В цитоплазме наблюдались небольшое число органелл и слабо развитая эндоплазматическая сеть с немногочисленными каналцами, протяженность и ширина которых были значительно меньше, чем у интактных крыс. К мембранам эндоплазматической сети, как правило, были прикреплены только единичные рибосомы. В цитоплазме определялись свободные полисомы, но плотность их расположения была значительно ниже, чем у интактных крыс. Кроме этого, появились электронно-плотные гранулы, порой образующие скопления, и единичные тельца Вейбеля—Паладе. В цитоплазме эндотелиоцитов было больше микропиноцитозных пузырьков и вакуолей, чем у интактных животных и у крыс после гипоксии без введения салифена, что свидетельствует об усилении транспортных процессов через цитоплазму эндотелиоцитов. Электронная плотность базальной мембраны повышена. В нейрорпиле вокруг капилляров появились отечные отростки астроцитов, встречались дегенерирующие перициты.

У крыс после введения терапевтической дозы салифена не наблюдалось увеличения размеров эндотелиоцитов, отсутствовало сужение их про-



Структуры гематоэнцефалического барьера в сенсомоторной коре у intactных (а) 20-суточных крысят, подвергавшихся гипоксии на 2-е сутки постнатального развития (б) и после гипоксии, получавших салифен (в).

а — эндотелиоциты (Э) с единичными плотными контактами между ними, микропиноцитозными пузырьками (короткие стрелки) и отдельными вакуолями (длинная стрелка); просвет капилляра (Пк) свободен; б — эндотелиоцит, занимающий значительную часть просвета капилляра и суживающий его, цитоплазма бедна органеллами и содержит электронно-плотные гранулы и единичные дегенерирующие митохондрии; в — истонченный слой эндотелиоцитов (стрелка), просвет капилляра увеличен, пиноцитозная активность повышена. Я — ядро эндотелиоцита; Пк — просвет капилляра; ОЭ — отростки эндотелиоцита. Ув. 40 000

света (см. рисунок, в), базальная мембрана состояла из внеклеточного материала, который, однако, не формировал плотный слой. Периваскулярный отек сохранялся, при этом дифференцировка протоплазматических астроцитов была выше, чем во 2-й контрольной группе — у животных после гипоксии.

**Обсуждение полученных данных.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что салифен обнаруживает протективное действие на структуры ГЭБ у крысят, подвергшихся гипоксии. Воздействие терапевтической дозы салифена в течение 14 сут (т.е. всего периода новорожденности, вплоть до начала ювенильного периода) после воздействия острой перинатальной нормобарической гипоксии оказывает положительное действие на состояние компонентов сосудистой стенки. Сравнение этих результатов с данными, полученными нами в аналогичных экспериментах без использования салифена [5], позволяет предполагать стабилизирующее воздействие препарата на активно идущие в это время процессы ангиогенеза. При этом отмечена реакция ведущего звена ГЭБ — эндотелиоцитов. Под влиянием салифена постгипоксические их реакции смягчаются, что подтверждает данные фармакологов о том, что одной из мишеней данного

протектора являются эндотелиоциты. По мнению исследователей [2, 7], это вызывает снижение вазодилататорной функции сосудов микроциркуляторного русла, что может быть фактором, способствующим адаптации микроциркуляторного русла и регуляции проницаемости ГЭБ в новых условиях функционирования.

Проведенная нами работа свидетельствует об активном влиянии салифена на компенсаторно-приспособительные реакции ГЭБ в ответ на воздействие гипоксии и перспективности дальнейших исследований его протективных свойств.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00160.*

*Авторы глубоко признательны директору Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН акад. Н.П.Веселкину и ст. науч. сотр. Е.Селиверстовой за предоставленную возможность работы на современном электронном микроскопе.*

#### 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 // Проблемы репродукции. 2012. Т. 18, № 1. С. 28–30.



3. Моргун А.В., Кувачева Н.В., Таранушенко Т.Е. и др. Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции // Вестн. РАМН. 2013. Т. 12. С. 26–35.
4. 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. 46, № 5. С. 467–473.
5. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Шишко Т.Т. Реакции нервных элементов неокортекса на воздействие гипоксии в раннем периоде новорожденности // Журн. эволюц. биохим. 2014. Т. 50, № 2. С. 148–154.
6. Хожай Л.И., Отеллин В.А. Распределение ГАМК-эргических нейронов в неокортексе у крыс в постнатальном периоде после перинатальной гипоксии // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 4. С. 7–10.
7. Чехонин В.П., Баклаушев В.П., Юсубалиева Г.М. и др. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера // Вестн. РАМН. 2012. № 8. С. 66–78.
8. Fan X., Kavalaars F., Heijen C.J. et al. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury // Curr. Neuropharmacol. 2010. Vol. 8, № 4. P. 324–334.
9. Herrera-Marschitz M., Neira Pena T., Rojas-Mancilla E. et al. Short- and long-term consequences of perinatal asphyxia: looking for neuroprotective strategies // Adv. Neurobiol. 2015. Vol. 10. P. 169–198.
10. Lapin I.P. Phenibut ( $\beta$ -Phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug // CNS Drug. Rev. 2001. Vol. 7, № 4. P. 471–481.
11. Wu Y.W., Gonzalez F.F. Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? // Dev. Med. Child. Neurol. 2015. Vol. 57. Suppl. 3. P. 34–39.
12. 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 13.02.2015

## THE EFFECT OF PERINATAL HYPOXIA ON THE STRUCTURE OF BLOOD-BRAIN BARRIER IN RATS TREATED WITH SALIFEN

V.A. Otellin<sup>1</sup>, L.I. Khozhai<sup>1</sup>, I.N. Tyurenkov<sup>2</sup>

The work was performed on Wistar rats, which were divided into 3 groups: 1st group — experimental rats subjected to hypoxia and treated with salifen (15 mg/kg for 14 days), 2nd group — control rats exposed to hypoxia only without treatment, and 3rd group — intact animals (8–10 animals in each group). Using the methods of light and electron microscopy, the effect of salifen on the structural characteristics of the elements of the blood-brain barrier (BBB) in the neocortex was studied in rats after exposure to hypoxia in the early postnatal period — on postnatal Day 2 (model of human preterm pregnancy). The results showed that salifen had a positive effect on the state of the microvasculature after perinatal hypoxia, in particular, on the state of endothelial cells. Its active participation in the compensatory-adaptive reactions of the BBB in response to hypoxia exposure was detected, and the prospects of further studies of the protective properties of salifen are emphasized.

**Key words:** *perinatal hypoxia, neocortex, endothelial cells, blood-brain barrier, salifen*

<sup>1</sup> Laboratory of the Nervous System Ontogenesis, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg; <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Volgograd State Medical University