

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2011
УДК 612.273.2:611.813.018.8:599.323.4

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

ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА И НЕОКОРТЕКСА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М.О. Самойлов), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: annch05@mail.ru

Гипобарическая гипоксия может оказывать как повреждающее, так и адаптогенное воздействие на структурно-функциональные характеристики нейронов мозга. В работе на крысах ($n=30$) изучали морфологические изменения нейронов гиппокампа и неокортекса под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии. Установлено, что тяжелая гипоксия (давление в барокамере 180 мм рт. ст.) вызывает через 3 сут структурные повреждения нейронов фронтопариетального неокортекса, а также дорсального и вентрального отделов гиппокампа. Прекондиционирующие воздействия умеренной гипобарической гипоксией (давление в барокамере 360 мм рт. ст.) оказывает неоднозначное влияние на морфологические характеристики нейронов крыс, перенесших тяжелую гипоксию. Многократные (трех-, шестикратные) сеансы прекондиционирования предотвращают индуцируемые тяжелой гипоксией структурные повреждения нейронов. В отличие от этого однократное прекондиционирование не оказывает такого действия.

Ключевые слова: гиппокамп, неокортекс, гипобарическая гипоксия, прекондиционирование

Гипобарическая гипоксия (ГГ) — сочетанное воздействие на организм пониженных атмосферного давления и кислородного снабжения — в зависимости от режима может вызывать тяжелые функциональные нарушения деятельности мозга либо повышать адаптивные возможности организма [7, 9, 13–15]. Известно, что у крыс, помещенных на несколько суток в барокамеру при снижении атмосферного давления, имитирующего подъем на высоту более 6500 м, в дальнейшем развиваются тяжелые структурные повреждения (вплоть до гибели) нейронов наиболее уязвимых образований мозга (гиппокампа, неокортекса) [2, 9, 14]. Вместе с тем, установлено, что если тяжелой ГГ предшествует умеренная, так называемая прекондиционирующая гипоксия, то структурно-функциональные повреждения мозга существенно нивелируются [1, 2, 5, 13]. В этих работах в качестве прекондиционирующего воздействия были использованы трехкратные сеансы умеренной ГГ. Несомненный интерес как в теоретическом, так и в практическом отношении вызывает изучение эффектов различных режимов прекондиционирования. Цель настоящей работы — сравнительный анализ влияния одно- и многократных сеансов прекондиционирующей ГГ на строение нейронов гиппокампа и неокортекса крыс, подвергнутых тяжелой гипоксии.

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, сформу-

лированные 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.

Тяжелую ГГ создавали в барокамере проточного типа при атмосферном давлении 180 мм рт. ст. в течение 3 ч. В режиме прекондиционирования крыс подвергали умеренной ГГ (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). 1-я группа служила в качестве контроля (помещение в барокамеру без гипобарических воздействий). Животных 2-й группы подвергали тяжелой гипоксии. Крыс 3-, 4-й и 5-й групп перед тяжелой гипоксией подвергали одно-, трех- и шестикратному прекондиционирующему воздействию. Интервал между сеансами у крыс 4-й и 5-й групп составлял 24 ч. Через 3 сут после тяжелой ГГ крыс декапитировали и извлекали головной мозг, который фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 24 ч. Материал для гистологического исследования гиппокампа и неокортекса обрабатывали по стандартной методике. Изготавливали серии чередующихся парафиновых фронтальных срезов мозга толщиной 7 мкм на уровне –2,8 мм от брегмы, монтировали на предметные стекла и окрашивали метиленовым синим по Нисслю.

Результаты исследования. Через 3 сут после тяжелой непрекондиционированной гипоксии в дорсальном (области CA1/CA2) и вентральном (области CA3/CA4) гиппокампе, а также фронтопариетальном неокортексе обнаруживаются структурные повреждения нейронов. В этих областях мозга выявляется значительное число гиперхромных пикнотических клеток (рис. 1, б; 2, б; 3, б). Нередко наблюдается перичеселлюлярный

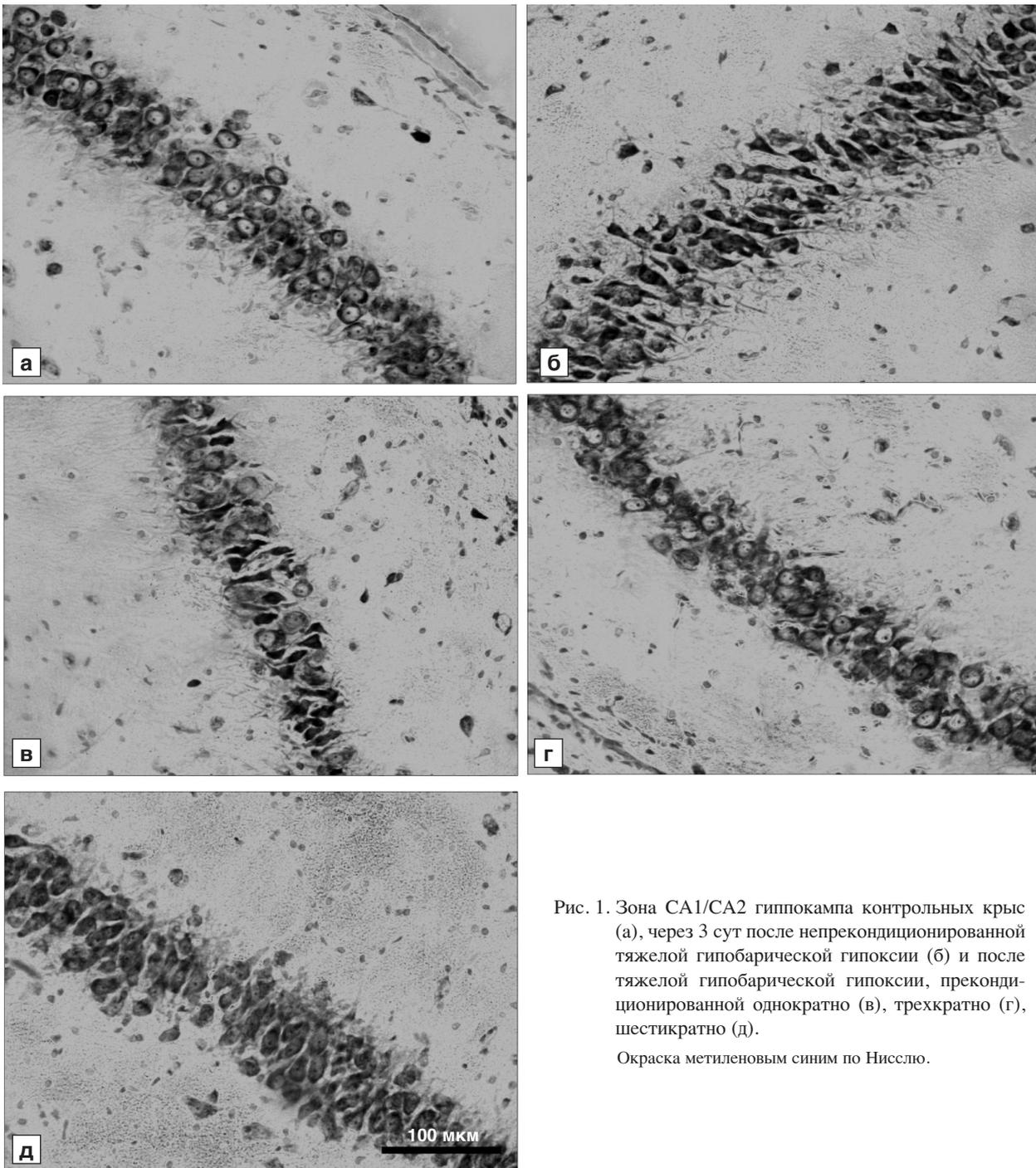


Рис. 1. Зона CA1/CA2 гиппокампа контрольных крыс (а), через 3 сут после непрекondиционированной тяжелой гипобарической гипоксии (б) и после тяжелой гипобарической гипоксии, прекоndиционированной однократно (в), трехкратно (г), шестикратно (д).

Окраска метиленовым синим по Нисслю.

отек, в отдельных нейронах — хроматолиз, вакуолизация цитоплазмы.

Однократное прекоndиционирующее воздействие не предотвращало структурных повреждений нейронов гиппокампа и неокортекса, вызываемых тяжелой гипоксией (см. рис. 1, в; 2, в; 3, в). В этой группе животных во фронтотемпоральной коре, областях CA1/CA2 и CA3/CA4 гиппокампа также выявляется большое количество нейронов, поврежденных по «темному» и «светлому» типам.

В отличие от этого многократные (трех- и шести-) прекоndиционирующие воздействия в зна-

чительной мере предотвращали индуцируемые тяжелой гипоксией структурные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса (см. рис. 1, г, д; 2, г, д; 3, г, д). В этих случаях морфологические изменения в большинстве нейронов были схожими с теми, которые выявлялись у контрольных животных (см. рис. 1, а; 2, а; 3, а). Следует отметить, что используемые режимы ГГ различно влияли на выживаемость животных: непрекondиционированная и однократно прекоndиционированная тяжелая гипоксия приводили к гибели 50–55 %, а

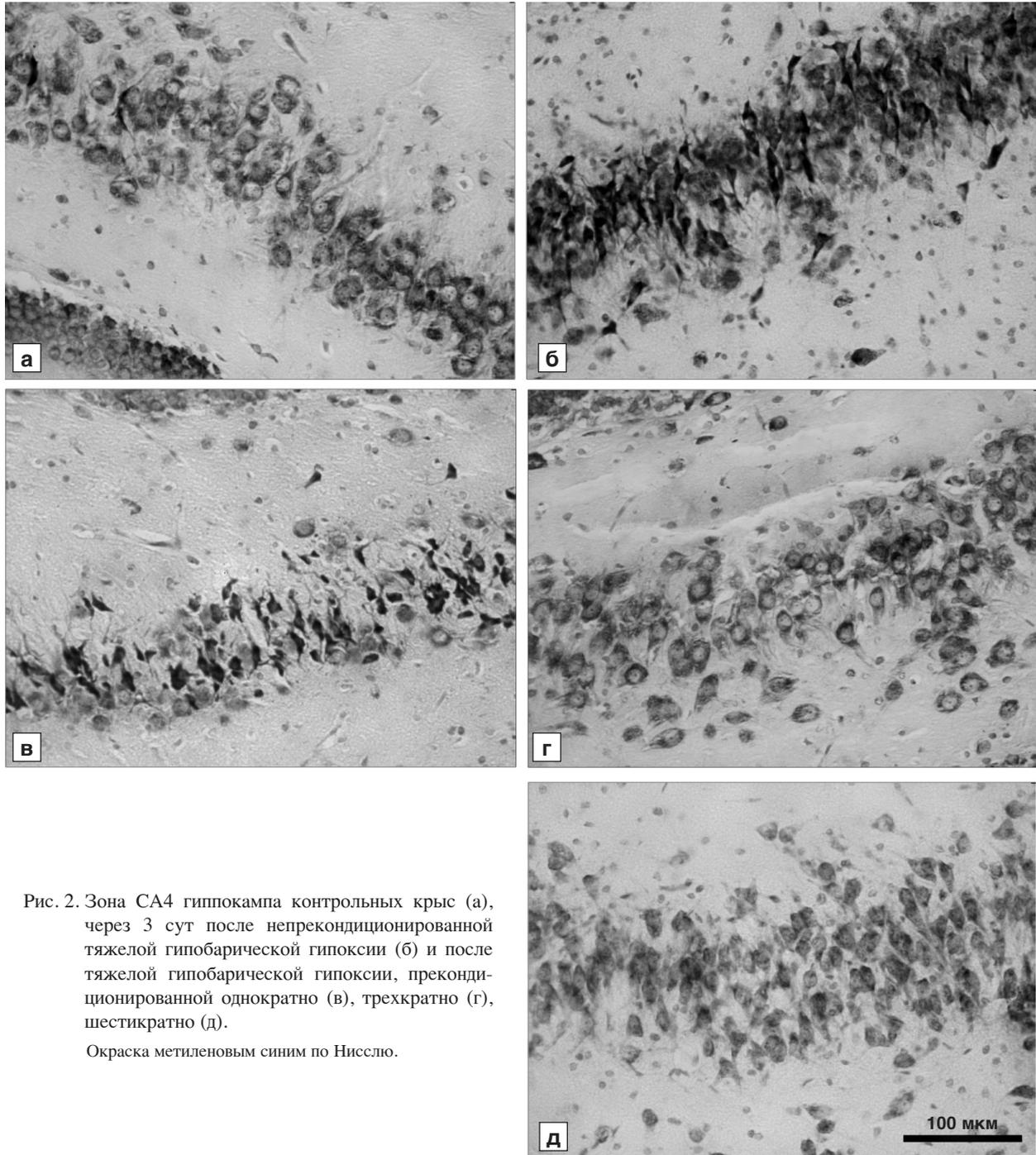


Рис. 2. Зона СА4 гиппокампа контрольных крыс (а), через 3 сут после непрекondиционированной тяжелой гипобарической гипоксии (б) и после тяжелой гипобарической гипоксии, прекоndиционированной однократно (в), трехкратно (г), шестикратно (д).

Окраска метиленовым синим по Нисслю.

множественно (3 и 6 сеансов) прекоndиционированная — лишь 15–18% крыс.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование выявило специфические особенности влияния различных режимов ГГ на строение нейронов гиппокампа и неокортекса крыс.

У животных, перенесших тяжелую ГГ (имитирующую «подъем» на высоту 11 000 м, 3 ч), через 3 сут вслед за этим воздействием проявляются глубокие структурные повреждения в наиболее уязвимых образованиях мозга (гиппокампе и неокортексе).

Похожая, хотя и менее выраженная морфологическая картина повреждения нейронов выявлена у крыс при длительном (в течение 4 сут) «подъеме» на высоту 6500 м — уровень гипобарии, при котором в условиях хронической экспозиции наблюдаются устойчивые неврологические расстройства [9, 14].

У прекоndиционированных умеренной ГГ («подъем» на 5000 м, 2 ч) животных последующая тяжелая гипоксия вызывает неодинаковые изменения нейронов гиппокампа и неокортекса в зависимости от режима прекоndиционирования.

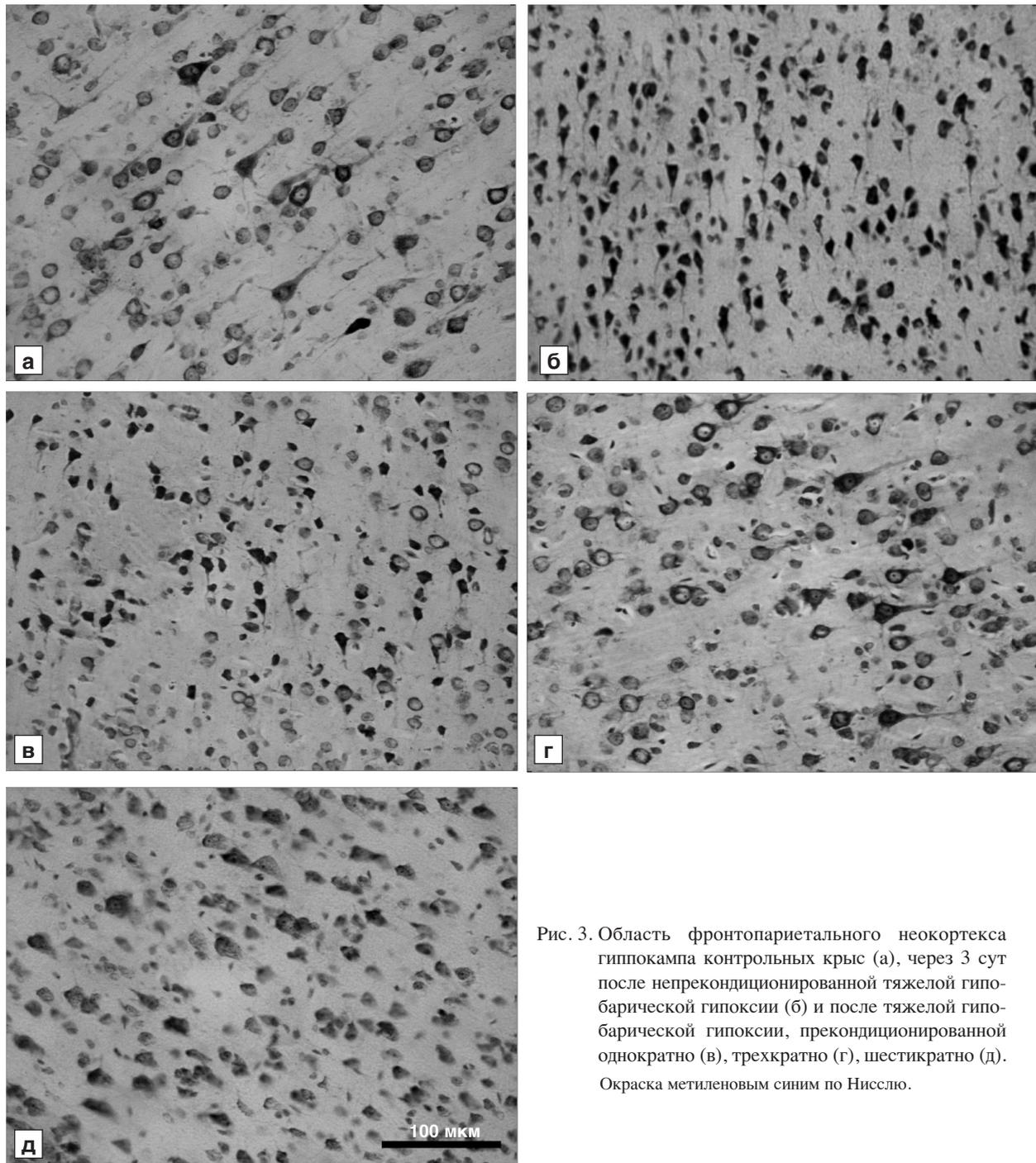


Рис. 3. Область фронтопариетального неокортекса гиппокампа контрольных крыс (а), через 3 сут после непрекondиционированной тяжелой гипобарической гипоксии (б) и после тяжелой гипобарической гипоксии, прекондиционированной однократно (в), трехкратно (г), шестикратно (д). Окраска метиленовым синим по Нислю.

Ранее было показано, что трехкратное прекондиционирующее воздействие (3 сеанса с интервалом в 24 ч) оказывает протективное воздействие на структурные и функциональные повреждения мозга, вызываемые тяжелой ГГ [1, 2, 5, 13]. Подобный эффект на структурном уровне в гиппокампе обнаружен также ранее при использовании в качестве прекондиционирования сублетальных ишемических воздействий [10, 11]. При этом несколько сеансов ишемического прекондиционирования через 1 сут оказывают значительно более выраженное протективное действие, чем 1 сеанс прекондиционирования [11]. В нашей рабо-

те с использованием другой экспериментальной модели получен схожий результат: однократное прекондиционирование умеренной ГГ в отличие от трех- и шестикратного воздействий практически не протектирует структурные повреждения нейронов гиппокампа и неокортекса, вызываемые тяжелой гипоксией.

Согласно предварительным данным, полученным в нашей лаборатории, многократные сеансы гипобарического прекондиционирования в отличие от однократного воздействия предотвращают индуцированные тяжелой гипоксией нарушения памяти и обучения. Через 3 сут вслед как за непре-

кондиционированной, так и однократно (но не многократно) прекодиционированной тяжелой ГГ в гиппокампе и неокортексе выявляется большое количество поврежденных нейронов, морфологические характеристики которых отражают, очевидно, развитие апоптоза [8].

Ранее было показано, что непрекодиционированная тяжелая ГГ индуцирует в гиппокампе и неокортексе крыс экспрессию проапоптотических факторов Вах, с-Jun, JNK, p38-МАРкиназу, а трехкратно прекодиционированная, напротив, вызывает экспрессию антиапоптотических факторов Bcl-2, Bcl-xL, ERK-МАР и подавляет увеличение содержания проапоптотических факторов [4, 6, 12]. Очевидно, судя по морфологическим характеристикам, однократное прекодиционирование не предотвращает индуцируемый тяжелой гипоксией апоптоз нейронов мозга.

Таким образом, полученные результаты подтверждают представление о том, что развитие полноценного протективного эффекта гипоксического прекодиционирования связано, в частности, с кратностью сеансов, длительностью и отсрочкой воздействия [3, 11]. Это обстоятельство следует учитывать при разработке немедикаментозного способа повышения толерантности мозга к повреждающим воздействиям с использованием умеренной ГГ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00677.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. и Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушения выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс. Журн. высш. нервн. деят., 2004, т. 54, № 6, с. 795–801.
2. Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И. и др. Влияние гипобарической гипоксии на экспрессию белков ранних генов и структурные изменения нейронов мозга: корректирующий эффект прекодиционирования. Морфология, 2004, т. 125, вып. 2, с. 10–15.
3. Самойлов М.О. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. СПб., Изд-во Ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1999.
4. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Ситник Н.А. и др. Прекодиционирование модифицирует активность митоген-активируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора с-jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелой гипобарической гипоксией. Нейрохимия, 2007, т. 24, № 1, с. 52–59.
5. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И. и др. Влияние гипобарической гипоксии на поведенческие реакции и экспрессию ранних генов в мозге крыс: корректирующий эффект прекодиционирующего воздействия. Докл. РАН, 2001, т. 381, № 1, с. 1–3.
6. Самойлов М.О., Ситник Н.А., Рыбникова Е.А. и др. Особенности экспрессии про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического прекодиционирования. Докл. РАН, 2005, т. 403, № 4, с. 1–3.
7. Строев С.А. и Самойлов М.О. Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. СПб., Изд-во Ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2006.
8. Charciaut-Marlangue C. and Ben-ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. Neuroreport, 1995, v. 7, № 1, p. 61–64.
9. Kadar T., Dachir S., Shukitt-Hale B. and Levy A. Sub-regional hippocampal vulnerability in various animal models leading to cognitive dysfunction. J. Neural Transm. Gen. Sect., 1998, v. 105, № 8–9, p. 987–1004.
10. Kirino T., Tsujita Y. and Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. J. Cereb. Blood Flow Metab., 1991, v. 11, № 2, p. 299–307.
11. Kitagawa K., Matsumoto M. and Tagaya M. «Ischemic tolerance» phenomenon found in the brain. Brain Res., 1990, v. 528, p. 21–24.
12. Rybnikova E., Sitnik N., Gluschenko 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, v. 1089, p. 195–202.
13. 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. Behav. Brain Res., 2005, v. 160, p. 107–114.
14. Shukitt-Hale B., Kadar T., Marlowe B.E. et al. Morphological alterations in the hippocampus following hypobaric hypoxia. Hum. Exp. Toxicol., 1996, v. 15, № 4, p. 312–319.
15. Simonova Z., Sterbova K., Brozek G. et al. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurons and microglia in cortex and hippocampus. Behav. Brain Res., 2003, v. 141, № 2, p. 195–205.

Поступила в редакцию 13.08.2011

CHANGES IN HIPPOCAMPAL AND NEOCORTICAL RAT NEURONS INDUCED BY DIFFERENT REGIMES OF HYPOBARIC HYPOXIA

A.V. Churilova, T.S. Gluschenko and M.O. Samoilo

Hypobaric hypoxia may have either detrimental or adaptive effect on structural and functional characteristics of brain neurons. In this study, the effect of different regimes of hypobaric hypoxia on the structural and functional characteristics of hippocampal and neocortical neurons was examined in rats (n=30). It was shown that severe hypoxia (induced by pressure in the pressure chamber equal to 180 Torr) caused structural neuronal damage both in the fronto-parietal neocortex and dorsal and ventral hippocampus 3 days after the exposure. The preconditioning using mild hypobaric hypoxia (pressure equal to 360 Torr) had varied effect on the morphological characteristics of brain neurons of rats, subjected to severe hypoxia. Multiple (three-trial or six-trial) preconditioning prevents structural damage of neurons induced by subsequent severe hypoxia. On the contrary, single preconditioning trial of mild hypoxia was ineffective in terms of neuroprotection.

Key words: *hippocampus, neocortex, hypobaric hypoxia, preconditioning*

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