

М.Г. Воробьёв, Е.А. Рыбникова и М.О. Самойлов

ИЗМЕНЕНИЕ ВЫРАЖЕННОСТИ ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОЗГА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

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

Цель работы состояла в оценке нейропротективного действия посткондиционирования (ПостК) умеренной гипобарической гипоксией (360 мм рт. ст., 2 ч) в модели тяжёлого гипоксического повреждения мозга (180 мм рт. ст., 3 ч). ПостК осуществляли путем трёх сеансов умеренной гипоксии, проводимых с интервалами в 24 ч по двум схемам — ПостК начинали через 3 ч (раннее ПостК) либо через 24 ч после тяжелой гипоксии (отсроченное ПостК). С использованием гистологических методов и автоматизированного анализа изображений оценивали объем нейрональных повреждений гиппокампа и неокортекса через 7 сут после тяжелой гипоксии. Тяжелая гипоксия вызывала гибель 24% нейронов слоя V неокортекса, 26% нейронов поля СА1 и 22% нейронов поля СА4. Раннее ПостК предотвращало гибель нейронов поля СА1 и значительно снижало число погибших клеток поля СА4 гиппокампа (до 10%) и неокортекса (до 13%). Отсроченное ПостК полностью нивелировало нейрональные повреждения поля СА4 гиппокампа и неокортекса и в значительной степени, но не полностью, поля СА1 (погибало 12% нейронов). Результаты свидетельствуют о том, что ПостК умеренной гипобарической гипоксией оказывает нейропротективное действие, снижая объем повреждений уязвимых образований мозга (гиппокампа и неокортекса), при этом эффективность нейропротекции зависит от сроков первого сеанса ПостК.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия, посткондиционирование, повреждение мозга, нейропротекция, гиппокамп, неокортекс

Хорошо известно, что различные неблагоприятные воздействия оказывают повреждающее действие на мозг, являясь ведущими факторами патогенеза неврологических заболеваний. По данным ВОЗ, наиболее распространенные из них — постинсультные/постгипоксические состояния, поэтому создание методов структурно-функциональной реабилитации мозга после повреждающих воздействий является актуальной задачей современной нейронауки и медицины. Недавно обнаружен феномен ишемического посткондиционирования (ПостК), способного значительно снижать степень ишемических повреждений и улучшать реабилитацию после перенесенного инсульта [10]. Протективное воздействие ПостК на сердце впервые описано в 2003 г. Было установлено, что краткие эпизоды ишемии на ранних стадиях реперфузии значительно снижают размеры зоны повреждения после перенесенного инфаркта и улучшают выживаемость кардиомиоцитов [10]. В настоящее время кардиопротективный эффект ишемического ПостК активно исследуется, показано его значительное терапевтическое влияние не только на сердце, но и на легкие, эпителии, а также при ишемии сетчатки. В 2009 г. явление ишемического ПостК было впервые описано на модели церебральной ишемии у мышей и первичных нейрональных культурах [4]. Таким образом, несмотря на очевидную перспективность и актуальность подобных работ, в

настоящее время исследование феномена ПостК на мозгу находится лишь в начальной стадии.

Выдвинута рабочая гипотеза о том, что применение гипоксического ПостК у особей, переживших тяжелое (повреждающее) гипоксическое воздействие, может давать существенный нейропротективный эффект, способствуя восстановлению мозга. Экспериментальная проверка этой гипотезы явилась целью данного исследования.

Материал и методы. Работа проведена на 38 взрослых самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г. Животные были выращены в стандартных условиях вивария Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Для создания условий тяжелой гипоксии (ТГ) животных помещали в барокамеру проточного типа при давлении 160–180 мм рт. ст., что соответствует подъёму на высоту 11 000 м на 3 ч. Подъём на соответствующую высоту производили, начиная с 760 мм рт. ст. и далее ступенчато понижая давление на 100 мм рт. ст. каждую 1 мин до достижения отметки в 180 мм рт. ст. В условиях ТГ погибали около 50% животных.

ПостК осуществляли путём трёхкратного воздействия умеренной гипобарической гипоксией, длительностью 2 ч, с интервалами 24 ч между сеансами. При этом давление в барокамере составляло 360 мм рт. ст., что соответствует подъёму на высоту 5000 м. Ранее данные параметры умеренной гипобарической гипоксии успешно применялись в режи-

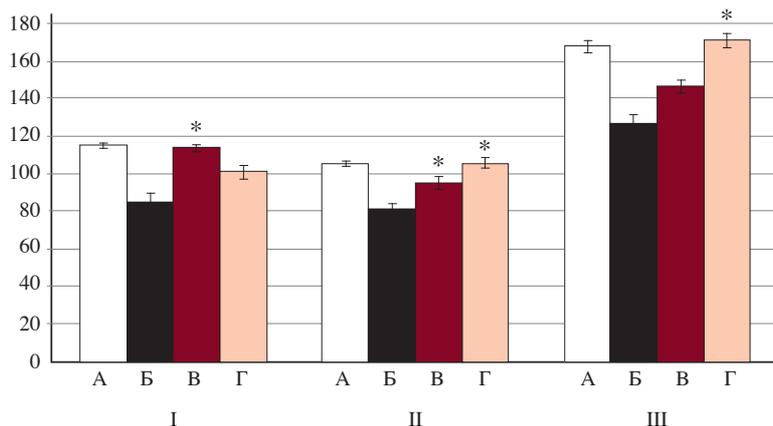


Рис. 1. Количество нейронов, выживших после тяжелой гипоксии в гиппокампе и неокортексе крыс.

По горизонтальной оси: I — CA1; II — CAIV; III — неокортекс; А — контроль; Б — тяжелая гипоксия (ТГ); В — ТГ с ранним посткондиционированием (ПостК) через 3 ч; Г — ТГ с отсроченным ПостК — через 24 ч; по оси ординат — количество нейронов; звездочки — различия по сравнению с показателями при ТГ значимы при $P < 0,05$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

ме прекодиционирования для повышения неспецифической толерантности мозга и индукции базисных нейропротективных механизмов [1, 2, 6–8]. Для определения оптимальных режимов ПостК сравнивали 2 схемы его использования. Согласно 1-й схеме, ПостК начинали через 3 ч после ТГ (раннее ПостК), тогда как согласно 2-й — через 24 ч (отсроченное ПостК). Таким образом, экспериментальные животные были разделены на 4 группы: 1-я — крысы, подвергнутые только ТГ; 2-я — крысы, подвергнутые ТГ и трёхкратному ПостК, 1-й сеанс спустя 3 ч; 3-я — крысы, подвергнутые ТГ и трёхкратному ПостК, 1-й сеанс спустя 24 ч; 4-я — контрольная группа (интактные животные).

На 7-е сутки после ТГ крыс декапитировали, после чего производили изъятие и гистологическую обработку тканей мозга. Полученные образцы выдерживали в молекулярном фиксаторе FineFIX (Milestone, Италия) в течение 24 ч, затем отмывали в проточной водопроводной воде в течение 2 ч, обезвоживали в этаноле возрастающих концентраций (по 1 ч в каждом), после чего проводили через 2 смены 95% бутанола (1 и 24 ч) и 3 смены ксилола (первые 2 смены по 15 мин, последняя — до достижения просветления). Дегидратированные и обезжиренные ткани мозга проводили через 3 смены парафина (по 45 мин) при 50 °С, и изготавливали в парафиновые блоки. Серии срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне $-2,80$ от брегмы [5] монтировали на предметные стёкла, покрытые адгезивом.

Срезы депарафинировали и окрашивали в 0,1% растворе крезилового фиолетового при нагревании над пламенем спиртовки до появления пара. Далее срезы отмывали в дистиллированной воде и дифференцировали окраску в 3 сменах 96% этанола (по 5 мин). После отмывки не связавшегося красителя срезы просветляли в двух сменах ксилола (по 5 мин) и заключали в канадский бальзам.

Полученные срезы исследовали на морфометрической установке, состоящей из светового микроскопа Jeneval (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (разработка ООО Видео Тест, Россия). Подсчитывали число выживших

пирамидных нейронов в зонах гиппокампа CA1 и CA4 длиной 460 мкм, с учётом их изгиба (ув. 40), в области V слоя неокортекса, число выживших нейронов подсчитывали в поле зрения площадью 460×340 мкм (ув. 40).

Для расчётов использовали данные, полученные только в том полушарии мозга, которое оказывалось сильнее повреждено гипоксией (наиболее уязвимом полушарии). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel. Различия считали значимыми (по критерию Манна — Уитни) при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования.

Тяжёлая гипобарическая гипоксия приводит к отчетливо выраженным повреждениям гиппокампа и неокортекса, о чем свидетельствует значимое снижение количества пирамидных нейронов в этих образованиях мозга (рис. 1), а также морфологические изменения (рис. 2). После ТГ обнаруживается большое число нейронов, поврежденных

по «светлому» (ранняя степень хроматолиза, вакуолизация цитоплазмы, клетки-тени) и «темному» (гиперхроматоз, сморщивание, глиальные узелки на месте погибших клеток) типам. В исследованных областях выявляется значительное число гиперхромных пикнотических клеток (см. рис. 2). Нередко наблюдается перичеллюлярный отек. Гипоксическое ПостК, начатое спустя 3 ч после ТГ, полностью предотвращает гибель нейронов гиппокампа, но не неокортекса (см. рис. 1), однако как в гиппокампе, так и в неокортексе существенно улучшается структура нейронов, в частности, снижается выраженность гиперхроматоза (см. рис. 2, в).

ПостК через 24 ч после ТГ способствует выживанию 100% нейронов в слое V неокортекса и в поле гиппокампа CA4, однако в поле CA1 число нейронов ниже контрольных значений (см. рис. 1).

Анализ препаратов мозга ПостК животных (см. рис. 2, в, г) показал, что обе схемы ПостК способствуют нормализации морфологической картины, нивелируя появление гиперхроматоза и других признаков нейрональных повреждений, чувствительных к гипоксии образований мозга у особей, переживших ТГ.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что тяжёлая гипобарическая гипоксия приводит к обширным повреждениям гиппокампа и неокортекса крыс, а ПостК умеренной трехкратной гипоксией дает значительный нейропротективный эффект. Обнаружены различия в эффективности двух

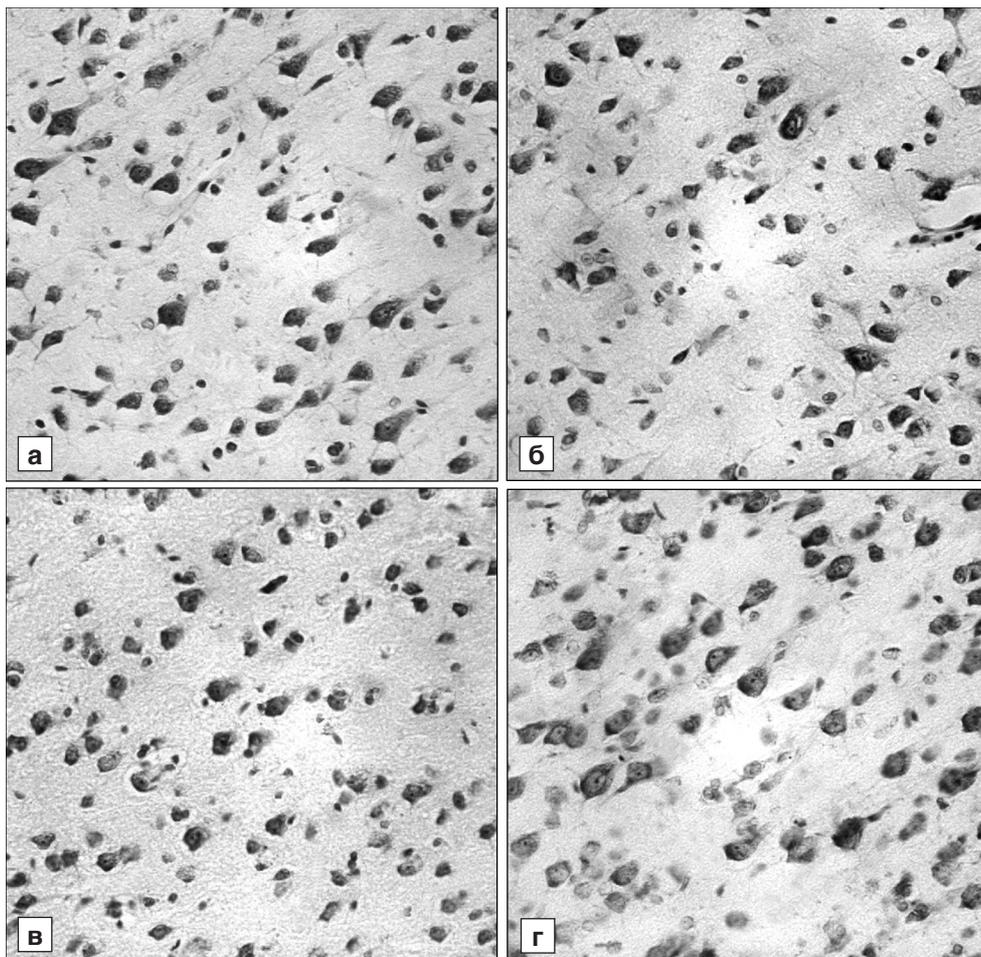


Рис. 2. V слой неокортекса крысы.

а — контроль; б — после тяжелой гипоксии (ТГ); в — после ТГ с ранним посткондиционированием (ПостК) (через 3 ч); г — после ТГ с отсроченным ПостК (через 24 ч). Окраска кризильным фиолетовым по Нислю. Об. 40, ок. 10.

режимов гипоксического ПостК. Раннее ПостК способствует выживанию 100% нейронов поля СА1, однако, при этом не предотвращает гибель нейронов неокортекса, которая, очевидно, происходит за счет других механизмов. ПостК в более поздние сроки в целом оказывается более эффективным, однако, тем не менее, в данном случае не все нейроны поля СА1 гиппокампа выживают.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при воздействии ТГ на мозг, очевидно, наблюдаются две волны запуска про-дегенеративных процессов — ранняя и отсроченная, и их механизмы, вероятно, различны. Ранняя гибель происходит, по всей видимости, за счет первой волны апоптоза или некроза [3] и наиболее выражена в СА1, о чем свидетельствуют данные экспериментов с ранним ПостК. Соответственно можно предположить, что основу механизма действия раннего ПостК составляет подавление именно процессов ранней гибели нейронов. Тем не менее, основной объем структурных повреждений гиппокампа и неокортекса после ТГ связан с

отсроченным запуском апоптоза, наблюдающимся через 1–3 сут [1]. Выживание почти 100% нейронов после ТГ в случае отсроченного ПостК (через 24 ч) говорит о том, что нейропротективный эффект этого режима ПостК основан на предотвращении запуска отсроченной волны апоптоза нейронов гиппокампа и неокортекса.

Результаты проведенного на мозгу исследования, свидетельствующие о том, что цитопротективный эффект ПостК преимущественно связан с предотвращением запуска волны отсроченного апоптоза, не согласуются с данными, полученными на других органах. В спинном мозгу, сердце, печени, почках, кишечнике и скелетных мышцах цитопротективный эффект ПостК основан на предотвращении запуска волны раннего апоптоза и гибели клеток по типу некроза. Очевидно, это отражает специфику механизмов гипоксических повреждений мозга по сравнению с другими тканями. Соответственно различием механизмов действия ПостК на разные органы и ткани может быть обусловлено столь резкое отличие сроков, в

которые терапия оказывается эффективной. Для ПостК головного мозга, произведенного, однако, в ишемической модели, максимальный терапевтический эффект ПостК также достигается при отсроченном ПостК [9], что согласуется с полученными нами сведениями.

Специфика механизмов гипоксического ПостК в нашем случае, возможно, связана с запуском нейрональных антиапоптотических процессов и модификациями гормональной регуляции адаптивных процессов. Действительно, известно, что трехкратная умеренная гипобарическая гипоксия, использованная нами в качестве посткондиционирующего воздействия, приводит к гиперэкспрессии антиапоптотических факторов семейства Bcl-2 (в частности, Bcl-2, Bcl-xL) в нейронах гиппокампа и неокортекса [8]. Сдвиг соотношения факторов регуляции апоптоза в сторону преобладания Bcl-2, как хорошо известно, не только препятствует запуску митохондрией-зависимого апоптоза, но и способен осуществлять торможение внутриклеточных апоптотических каскадов на различных стадиях, что, соответственно, может предотвращать апоптоз нейронов даже в тех случаях, когда он уже был запущен.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают рабочую гипотезу о том, что гипоксическое ПостК представляет собой эффективный способ коррекции нарушений, вызванных тяжелыми повреждающими воздействиями, в частности, в нашей модели — тяжелой гипобарической гипоксии. Предложенные режимы и модель ПостК трехкратной умеренной гипобарической гипоксией (экспозиция, начиная с 3 и с 24 ч) оказались эффективными для полного или частичного предотвращения постгипоксической дегенерации нейронов гиппокампа и неокортекса. Полученные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале предложенного способа, однако, необходимы дальнейшие исследования как нейропротективных эффектов гипоксического ПостК, так и эндогенных механизмов, обеспечивающих реализацию этих эффектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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 прекоондиционирования. *Морфология*, 2004, т. 125, вып. 2, с. 10–15.
2. 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 прекоондиционирующего воздействия. *Докл. РАН*, 2001, т. 81, № 1, с. 1–3.
3. Chapuisat G., Dronne M.A., Grenier E. et al. In silico study of the influence of intensity and duration of blood flow reduction on cell death through necrosis or apoptosis during acute ischemic stroke. *Acta Biotheor.*, 2010, v. 58, № 2–3, p. 171–190.
4. Leconte C., Tixier E., Freret T. et al. Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse. *Stroke*, 2009, v. 40, № 10, p. 3349–3355.
5. Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. San Diego, Acad. Press, 1986.
6. Rybnikova E.A., Gluschenko T., Tulkova E. et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappaB in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia. *J. Neurochem.*, 2008, v. 106, № 3, p. 1450–1458.
7. Rybnikova E.A., 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, № 1, p. 195–202.
8. Rybnikova E.A., 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, v. 160, № 1, p. 107–114.
9. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 2009, v. 29, № 5, p. 873–885.
10. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, v. 285, № 2, p. 579–588.

Поступила в редакцию 12.07.2011

CHANGES IN INTENSITY OF HYPOXIC BRAIN DAMAGE IN RATS INDUCED BY HYPOXIC POSTCONDITIONING

M.G. Vorobyov, Ye.A. Rybnikova and M.O. Samoilov

The present study has been aimed to estimate a neuroprotective effect of postconditioning (PostC) by using mild hypobaric hypoxia (360 mm Hg, 2 h) in a model of severe hypoxic brain injury (180 mm Hg, 3 h) in rats. PostC was performed by three trials of mild hypoxia with 24 h intervals, according to two different protocols — PostC was started 3 h (early PostC) or 24 h (delayed PostC) following severe hypoxia. Using histological methods and computer image analysis, loss of neurons in hippocampus and neocortex was analyzed 7 days after severe hypoxia. Severe hypoxia caused loss of 24% of neurons in layer V of the neocortex, 26% of neurons in CA1 region of hippocampus and 22% of neurons in CA4 region. Early PostC prevented loss of neurons in CA1 region of hippocampus and significantly reduced loss of neurons in neocortex (to 13%) and in CA4 region (to 10%). Delayed PostC fully prevented neuronal damage in CA4 region of hippocampus and neocortex and was to a large extent but not completely protective in CA1 region (12% of neurons were lost). The results show that PostC performed by hypobaric hypoxia has a pronounced neuroprotective effect, reducing the loss of neurons in vulnerable structures of brain (hippocampus and neocortex). The efficacy of neuroprotection depends upon the time of presentation of the first PostC session.

Key words: *hippocampus, neocortex, hypobaric hypoxia, postconditioning, brain damage, neuroprotection*

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