

ИНГИБИРОВАНИЕ АПОПТОЗА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПОВЫШЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ МОЗГА ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПЕРКАПНИИ И ГИПОКСИИ

П.П.Трегуб^{*,**}, Н.А.Малиновская^{***}, В.П.Куликов^{*,**}, А.Б.Салмина^{***},
М.Е.Нагибаева^{*}, А.С.Забродина^{*}, Г.Е.Герцог^{***}, С.К.Антонова^{***}

ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Барнаул; **ФГБНУ НИИ физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, РФ; *ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, Красноярск*

Проведена сравнительная оценка интенсивности апоптоза в клетках перинфарктной зоны головного мозга при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии, предшествующих фокальному ишемическому инсульту. Показано, что гиперкапния и гипоксия уменьшают количество TUNEL-позитивных клеток в перинфарктной зоне, причем их сочетание проявляет максимальную эффективность по сравнению с изолированным воздействием. Максимальный нейропротективный эффект при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии по сравнению с их изолированным воздействием обусловлен процессом ингибирования апоптоза в перинфарктной зоне.

Ключевые слова: гипоксия, гиперкапния, апоптоз, нейропротекция, инсульт

Подробно изучена эффективность гипоксических тренировок в аспекте повышения ишемической толерантности головного мозга [9, 12]. В последнее десятилетие были получены новые данные относительно применения пермиссивной гиперкапнии в качестве нейропротективного средства [10, 14].

Ранее нами было показано значительное увеличение толерантности головного мозга к ишемии/гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии, превышающее по своей эффективности их изолированное применение [1, 11]. Также мы продемонстрировали, что гиперкапнически-гипоксическое воздействие активирует пролиферативную и синтетическую активность нервных клеток при фокальном ишемическом повреждении головного мозга [2]. Однако механизмы нейропротективного эффекта сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии остаются малоизученными. Одним из таких механизмов

может быть ингибирование апоптоза в перинфарктной зоне инсульта, которое имеет большое значение в механизме гипоксического прекодиционирования [4, 6, 13] и играет важную роль в феномене посткондиционирования с использованием пермиссивной гиперкапнии после ишемически-реперфузионного повреждения мозга [10, 14].

Целью данного исследования являлось сравнение интенсивности апоптоза в клетках околоинфарктной зоны инсульта при изолированном и сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии, предшествующих фокальному ишемическому повреждению.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали крыс-самцов Вистар ($n=60$) массой 284.5 ± 46.0 г, которые были разделены на 4 равные группы. Респираторные воздействия осуществлялись в герметичной камере, как описано ранее [11]. Группы животных различались

Адрес для корреспонденции: pfiza_asmu@mail.ru. Трегуб П.П.

по газовому составу воздуха во время тренировочных воздействий.

Группа НГ (нормобарическая гипоксия: $pO_2=90$ мм рт. ст., $pCO_2=1$ мм рт. ст., остальное N_2): животные дышали газовой смесью в течение 20 мин в день таким образом, чтобы pO_2 сохранялось в пределах 90 мм рт. ст. Группа ПГ (пермиссивная гиперкапния: $pO_2=150$ мм рт. ст., $pCO_2=50$ мм рт. ст., остальное N_2): животные также дышали газовой смесью в течение 20 мин в день, но pO_2 сохранялось в пределах 150 мм рт. ст., а pCO_2 — 50 мм рт. ст. Группа ГГ (гиперкапническая гипоксия: $pO_2=90$ мм рт. ст., $pCO_2=50$ мм рт. ст., остальное N_2): животные также дышали газовой смесью в течение 20 мин в день, но pO_2 сохранялось в пределах 90 мм рт. ст., а pCO_2 — 50 мм рт. ст. Группа К (контроль для воздействия гипоксии/гиперкапнии, группа сравнения: $pO_2=150$ мм рт. ст., $pCO_2=1$ мм рт. ст., остальное N_2): животные подвергались тем же манипуляциям, что и крысы опытных групп, за исключением воздействия гипоксии и/или гиперкапнии. Животные всех групп прошли 15-кратный курс респираторных воздействий.

На следующие сутки после завершения курса воздействий у животных под наркозом (смесь 75 мг кетамина и 10 мг ксилазина на 1 кг массы тела внутривенно) моделировали фокальное ишемическое повреждение головного мозга путем введения в бедренную вену 3% раствора бенгальского розового (30 мг/кг массы) и последующего 10-минутного освещения скальпированного участка теменной области черепа лазером мощностью 20 мВт с длиной волны 532 нм [5]. Через 72 ч животных декапитировали и извлекали головной мозг. Препараты после гистологической подготовки секционировали (толщина среза 10 мкм) и срезы окрашивали по методу TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling) с использованием набора "In Situ Direct DNA Fragmentation Assay kit" ("Abcam", ab66108) по стандартному протоколу, выбор периинфарктной зоны проводился в соответствии с данными [14]. Количество TUNEL-положительных нервных клеток в периинфарктной области подсчитывали не менее чем в 5 полях зрения при 400-кратном увеличении на флуоресцентном микроскопе CX41 с видеокамерой DP71 ("Olympus"). Часть срезов (по два из каждой группы) дополнительно исследовали на конфокальном микроскопе FV10i-W ("Olympus").

Статистический анализ полученных данных проводили в программе "Statistica 6.0" с использованием непараметрического U критерия Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p<0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела до эксперимента, перед операцией и после эксперимента у животных всех групп значимо не различалась (данные не представлены). Во время проведения операций по моделированию фокального ишемического повреждения часть животных погибла. По данным вскрытия основной причиной смерти был отек головного мозга и/или отек легких, которые, вероятно, являлись осложнением оперативного вмешательства. В итоге группы крыс сформировались следующим образом: группа К $n=10$, группа НГ $n=12$, группа ПГ $n=9$, группа ГГ $n=12$.

Во всех случаях экспериментального моделирования фокального инсульта формировались типичные фотохимические инфаркты с участием всех слоев сенсомоторной коры головного мозга. На всех срезах в области ишемического повреждения различались фиброзные изменения и микрососуды с наличием тромбов, что характерно для фотохимического тромбоза [8]. Отмечались различия морфологических изменений в периинфарктной зоне между опытными группами и группой сравнения: у крыс, подвергнутых сочетанному воздействию гиперкапнии и гипоксии, в отличие от контроля, отчетливо удавалось дифференцировать архитектуру двигательных нейронов, сформированное ядро и цитоплазму с отростками. Это позволяет заключить, что в этой группе последствия ишемического повреждения в нервной ткани были минимальными.

Значимых различий в общем количестве клеток для каждого препарата при сравнении групп

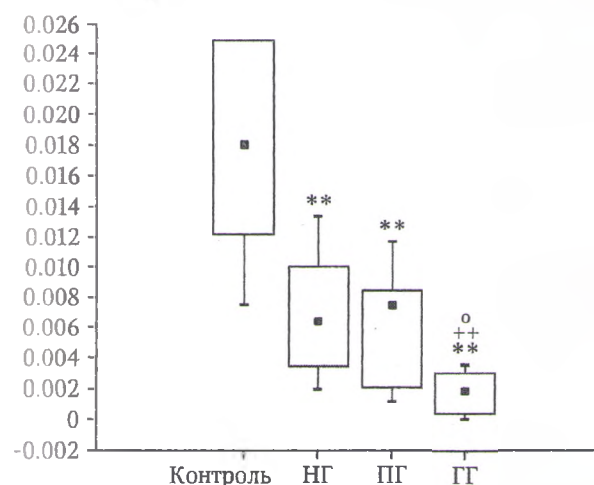


Рис. 1. Количество TUNEL-положительных нервных клеток в периинфарктной области головного мозга крыс с фокальным ишемическим инсультом (в % к общему числу нервных клеток).

** $p<0.01$ по сравнению с контролем; * $p<0.05$ по сравнению с группой ПГ; ° $p<0.05$ по сравнению с группой ПГ.

не наблюдалось. Во всех опытных группах отмечалось уменьшение количества TUNEL-положительных нервных клеток в перинфарктной области головного мозга (рис. 1).

В группе ГГ (рис. 2) число клеток, содержащих участки фрагментации ДНК, было минимальным: по отношению к группе сравнения (рис. 3) было меньше в 10 раз, а по отношению к группам НГ и ПГ — в 3.5 и 4 раза соответственно. Изолированное воздействие гипоксии в 3 раза уменьшало количество клеток, вступающих в фазу апоптоза, по сравнению с контролем, а воздействие перmissive гиперкапнии снизило этот показатель

в 2.4 раза. При этом различия в содержании TUNEL-положительных клеток между группами НГ и ПГ не отмечалось.

Уменьшение числа TUNEL-положительных флуоресцентных меток в ткани головного мозга у крыс опытных групп при воздействии гипоксии/гиперкапнии свидетельствует о том, что фрагментация ядерной ДНК присутствует у них в меньшем количестве нервных клеток, что напрямую отражает угнетение апоптоза [7]. Этот процесс является следствием гипоксического и гиперкапнического воздействия, имеет большое значение в механизме нейропротекции и проявляется, в

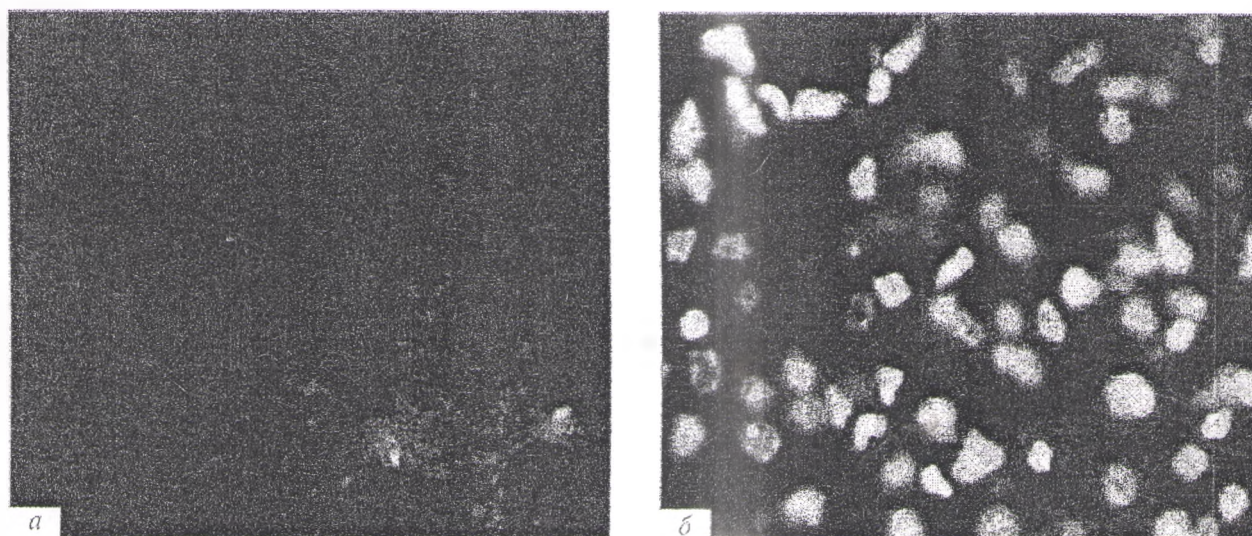


Рис. 2. Перинфарктная зона коры головного мозга у крысы группы ГГ. *а* — канал с TUNEL-положительными (FITC-положительными) клетками, *б* — наложение каналов с TUNEL-положительными клетками и окраски ядер PI. Конфокальная микроскопия, $\times 900$.

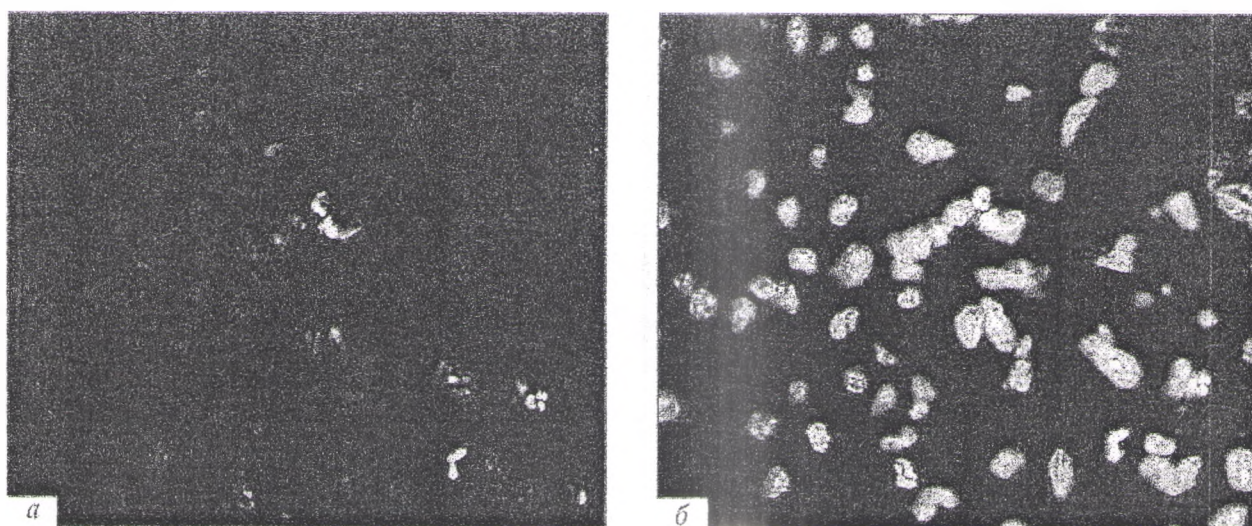


Рис. 3. Перинфарктная зона коры головного мозга у крысы группы сравнения. *а* — канал с TUNEL-положительными (FITC-положительными) клетками, *б* — наложение каналов с TUNEL-положительными клетками и окраски ядер PI. Конфокальная микроскопия, $\times 900$.

частности, снижением гибели нейронов в перинфарктной зоне [3].

Доказано, что одним из важнейших механизмов увеличения толерантности головного мозга к ишемии после гипоксического прекондиционирования является ингибирование апоптоза [4,6,13]. Было показано, что перmissive гиперкапния вызывает эффект посткондиционирования и ингибирует апоптоз во время ишемически-реперфузионного повреждения головного мозга главным образом за счет угнетения активности каспазы-3, блокирования проапоптозного белка Вах и стимуляции антиапоптозных белков семейства bcl-2 [10,14].

Таким образом, можно утверждать, что при экспериментальной фокальной ишемии головного мозга максимальный нейропротективный эффект при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии по сравнению с их изолированным воздействием обусловлен процессом ингибирования апоптоза в перинфарктной зоне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куликов В.П., Трегуб П.П., Беспалов А.Г., Введенский А.Ю. Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в увеличении резистентности организма к острой гипоксии в эксперименте // Патол. физиол. и Экспер. тер. 2013. № 3. С. 59-61.
2. Трегуб П.П., Куликов В.П., Ручейкин Н.Ю., Белова Е.В., Мотин Ю.Г. Пролиферативная и синтетическая активность нервных клеток после сочетанного и изолированного воздействия гипоксией и гиперкапнией // Бюл. Экспер. биол. 2015. Т. 159, № 3. С. 311-313.
3. Broughton B.R., Reutens D.C., Sobey C.G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia // Stroke. 2009. Vol. 40, N 5. P. e331-e339.
4. Cantagrel S., Krier C., Ducrocq S., Bodard S., Payen V., Laugier J., Guilloteau D., Chalon S. Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in a rat model of immature brain hypoxia-ischaemia // Neurosci. Lett. 2003. Vol 347, N 2. P. 106-110.
5. Chen F., Suzuki Y., Nagai N., Peeters R., Sun X., Coudyzer W., Marchal G., Ni Y. Rat cerebral ischemia induced with photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: a stroke model for MR imaging research // MAGMA. 2004. Vol. 17, N 3-6. P. 103-108.
6. Gao X., Chang C., Duan D., Ru L., Yin G. Effect of hypoxic preconditioning on neural cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in cerebral ischemia-reperfusion in rats // J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. 2006. Vol. 26, N 1. P. 17-20.
7. Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschopf H., Hartung H.P., Toyka K.V., Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques // Lab. Invest. 1994. Vol. 71, N 2. P. 219-225.
8. Pevsner P.H., Eichenbaum J.W., Miller D.C., Pivawer G., Eichenbaum K.D., Stern A., Zakian K.L., Koutcher J.A. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2001. Vol. 45, N 3. P. 227-233.
9. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilo M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // J. Neurochem. 2008. Vol. 106, N 3. P. 1450-1458.
10. Tao T., Liu Y., Zhang J., Xu Y., Li W., Zhao M. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model // Brain Res. 2013. Vol. 1533. P. 52-62.
11. Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Bepalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2015. Vol. 24, N 2. P. 381-387.
12. Zhan L., Wang T., Li W., Xu Z.C., Sun W., Xu E. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic pre-conditioning in adult rats // J. Neurochem. 2010. Vol. 114, N 3. P. 897-908.
13. Zhang Y.B., Lu G.W., Yang M.F., Niu J.Z., Sun B.L. Changes in Bcl-2 and Caspase-3 expressions in cortex of hypoxic preconditioning mice // Sheng Li Xue Bao. 2008. Vol. 60, N 2. P. 249-253.
14. Zhou Q., Cao B., Niu L., Cui X., Yu H., Liu J., Li H., Li W. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // Anesthesiology. 2010. Vol. 112, N 2. P. 288-297.