

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
В ПИРАМИДНОМ СЛОЕ ГИППОКАМПА КРЫС
ПРИ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ, ВЫЗВАННОЙ ДЛИТЕЛЬНЫМИ
ВОЗДЕЙСТВИЯМИ ГРАВИТАЦИОННЫХ ПЕРЕГРУЗОК**

© 2019 г. И. Н. Тюренков¹, А. В. Смирнов^{1,2}, Д. С. Медников¹, М. В. Шмидт^{1,2},
М. Р. Экова¹, Д. В. Куркин¹, Д. А. Бакулин¹, *, Е. В. Волотова¹

¹Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

²Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

*E-mail: mbfdoc@gmail.com

Поступила в редакцию 08.09.2018 г.

После доработки 08.09.2018 г.

Принята к публикации 27.09.2018 г.

Исследование морфофункциональных изменений гиппокампа при моделировании нарушений церебральной гемодинамики необходимо для понимания механизмов формирования психоневрологических дефицитов. Цель исследования: оценка повреждения ЦНС и особенностей экспрессии одного из основных регуляторов апоптоза – Bcl-2 в гиппокампе крыс с нарушением церебральной гемодинамики, вызванным повторяющимися гравитационными перегрузками. Исследование выполнено на крысах линии Вистар, которые на протяжении 28 дней в течение 5 мин дважды в день подвергались гравитационным перегрузкам (9 g) в каудо-краниальном векторе. Психоневрологические нарушения у животных оценивались с использованием шкалы McGraw и тестов “открытое поле”, “адгезивный тест”, “условная реакция пассивного избегания” (УРПИ) и “экстраполяционное избавление” (ГЭИ). Срезы головного мозга окрашивали по методу Ниссля и подсчитывали удельное количество нейронов с признаками повреждения. При иммуногистохимическом исследовании уровня экспрессии Bcl-2 подсчитывали относительную площадь иммунореактивного материала в пирамидном слое всех зон гиппокампа. Воздействие гравитационных перегрузок вызывало нарушения в поведении животных, что выражалось в низкой двигательной активности и возникновении признаков ретроградной амнезии, снижении мелкой моторики и нарастании психоневрологического дефицита. При гистологическом исследовании выявлены деструктивные изменения сосудов, увеличение удельного количества пирамидных нейронов с наличием повреждения во всех зонах гиппокампа. Зоны CA2 и CA4 характеризовались максимальным увеличением числа поврежденных нейронов и одновременно выраженной экспрессией Bcl-2.

Ключевые слова: гиппокамп, апоптоз, Bcl-2, психоневрологический дефицит

DOI: 10.1134/S0869813919030075

Цереброваскулярные болезни (ЦВБ) представляют собой разнородную по этиологии и патогенезу группу заболеваний, в основе которых лежит нарушение церебральной гемодинамики [1]. Неуклонный рост хронических форм в структуре ЦВБ обуславливается распространенностью атеросклероза и гипертонической болезни, а также тенденцией к увеличению продолжительности жизни [2, 3]. Увеличение продолжительности жизни, часто сопровождающееся дисциркуляторной

энцефалопатией и деменцией, относит хронические нарушения мозгового кровообращения (НМК) к числу важных не только медицинских, но и социальных проблем [2, 4].

Изменения психоэмоциональной сферы и прогрессирующее снижение когнитивных функций становятся причиной инвалидизации, значительно осложняют процесс диагностики, лечения и реабилитации пациентов [2–4]. В этой связи особый интерес представляет исследование морфофункциональных изменений гиппокампа как одной из центральных структур головного мозга, которая участвует в формировании и регулировании когнитивной функции, принимающей участие в процессах развития памяти и пространственного ориентирования [5–7]. Наиболее перспективным направлением в исследовании компенсаторно-приспособительных возможностей гиппокампа может служить изучение процессов клеточной выживаемости при повреждающих воздействиях, а также поиск способов ингибировать регулирующую клеточную гибель.

Bcl-2 – представитель подсемейства антиапоптотических белков, действующий как внутриклеточный блокатор митохондриального пути апоптоза [8, 9]. Ингибируя действие эффекторных каспаз, а также блокируя высвобождение AIF (apoptotic inducible factor) и цитохрома с, Bcl-2 предотвращает регулирующую клеточную гибель и обеспечивает выживаемость в условиях повреждения [9, 10]. Кроме того, в неактивном состоянии Bcl-2 обнаруживается внутриклеточно в виде комплекса с BHLH-протеином Bcl-1, при диссоциации которого и высвобождении свободного Bcl-1 активируется Bcl-1-зависимая аутофагия, что также направлено на выживаемость клетки, в том числе при гипоксии [11]. Поэтому целью настоящего исследования стала оценка повреждения ЦНС и морфологическое исследование гиппокампа с определением содержания маркера антиапоптоза Bcl-2 у крыс с нарушением церебральной гемодинамики, вызванным повторяющимися гравитационными перегрузками (9g) в каудо-краниальном векторе в течение 28 дней.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на половозрелых 12-месячных крысах линии Вистар (ФГУП ПЛЖ “Рапполово”, Ленинградская область, РФ, карантин 2 недели). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. “Об утверждении правил лабораторной практики”. Исследование было одобрено региональным независимым этическим комитетом ГУ Волгоградского медицинского научного центра (протокол № 191-2014 от 25 февраля 2014 г.).

Гипертензивная энцефалопатия моделировалась на бодрствующих крысах со среднеактивным типом поведения. Для воспроизведения хронических нарушений мозгового кровообращения использовали метод многократных длительных перегрузок в каудо-краниальном векторе. Животных помещали в пеналы, размещенные по краям горизонтальной штанги центрифуги в строго каудо-краниальном направлении и подвергали гравитационной перегрузке величиной 9 g в течение 5 мин дважды в день с интервалом 12 ч на протяжении 28 дней – 2-я группа (гипертензивная энцефалопатия, $n = 10$). Контрольную (1) группу составили крысы того же возраста без гравитационного воздействия (контроль, $n = 10$).

Функциональное состояние центральной нервной системы оценивалось непосредственно после воздействия с помощью балльной шкалы неврологического дефицита McGraw в модификации Ганнушкиной. Оценку поведенческих и когнитивных функций проводили через час после первого (первый день) и последнего (через 28 дней) гравитационного воздействия с применением тестов: “открытое поле” (ОП), “условная реакция пассивного избегания” (УРПИ), “экстраполяци-

онное избавление” (ТЭИ), “адгезивный тест”. Обучение в тестах УРПИ и ТЭИ проводили за 24 ч до первого вращения. При проведении адгезивного теста фиксировалось время удаления инородного предмета (лейкопластырь) с поверхности подушечек обеих передних лап (время наблюдения – 180 с; для каждого животного рассчитывалось среднее время удаления с обеих лап).

На 29-е сутки животных выводили из эксперимента с применением в качестве наркоза хлоралгидрата (400 мг/кг, интраперитонеально), декапитировали гильотинным методом (“Гильотина для крыс” АЕ0702, “Open Science”, РФ), после краниотомии извлекали головной мозг, фиксировали его в 10%-ном забуференном формалине с дальнейшим изготовлением гистологических препаратов по стандартной методике.

Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа “Axio Lab. A1” (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), фотодокументирование осуществляли камерой “AxioCam 105 color” (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Оценку степени повреждения проводили с помощью подсчета удельного количества (УК) нейронов с признаками повреждения (гиперхромия ядра и цитоплазмы, клетки-тени, сморщивание перикариона, сморщивание перикариона в сочетании с гиперхромией). Иммуногистохимическое исследование проводили непрямой пероксидазно-антипероксидазным методом с применением моноклональных антител против Vcl-2 (инкубация 1 ч, 1 : 100, Dako, clone 124 monoclonal mouse anti-human, США) с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, США), в качестве хромогена использовали DAB (диаминобензидин). Оценку уровня экспрессии проводили путем подсчета относительной площади иммунореактивного материала (ИРМ) в пирамидном слое всех зон гиппокампа с помощью модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ MS Office Excel 2007 (Microsoft Inc., США), Statistica 6.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США). Достоверность различий между группами оценивали с использованием критериев Шапиро–Уилка, Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Уилкоксона, Дана и хи-квадрат. Данные представлены в виде медианы (Me) с указанием 25-го (Q1) и 75-го (Q3) квартилей (Me [Q1;Q3] или диаграммы размаха). Значения $p < 0.05$ расценивались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование гравитационных перегрузок в каудо-краниальном направлении приводило к возникновению симптомов психоневрологического дефицита уже после первого воздействия. При этом симптомы (вялость, слабость, тремор, блефароптозы, манежность движений) прогрессировали по мере увеличения числа эпизодов перегрузок. Так, если на первый день фиксировались неврологические симптомы легкой степени, то через 28 дней их можно было охарактеризовать как тяжелые. При этом значимое увеличение балла по шкале McGraw фиксировалось уже через 14 дней после первого вращения (рис. 1А).

Гравитационные перегрузки приводили к нарушению мелкой моторики экспериментальных животных, что выражалось в достоверном снижении числа животных, не удалявших инородный предмет с поверхности подушечек передних лап (рис. 1Б). Так, через 28 дней воздействия в опытной группе все животные не удалили инородный предмет с одной из лап, в то время как в контрольной группе время, затрачиваемое на обнаружение и очистку обеих лап, не превышало 25 с. У животных опытной группы были отмечены нарушения в тактильной чувствительности, а

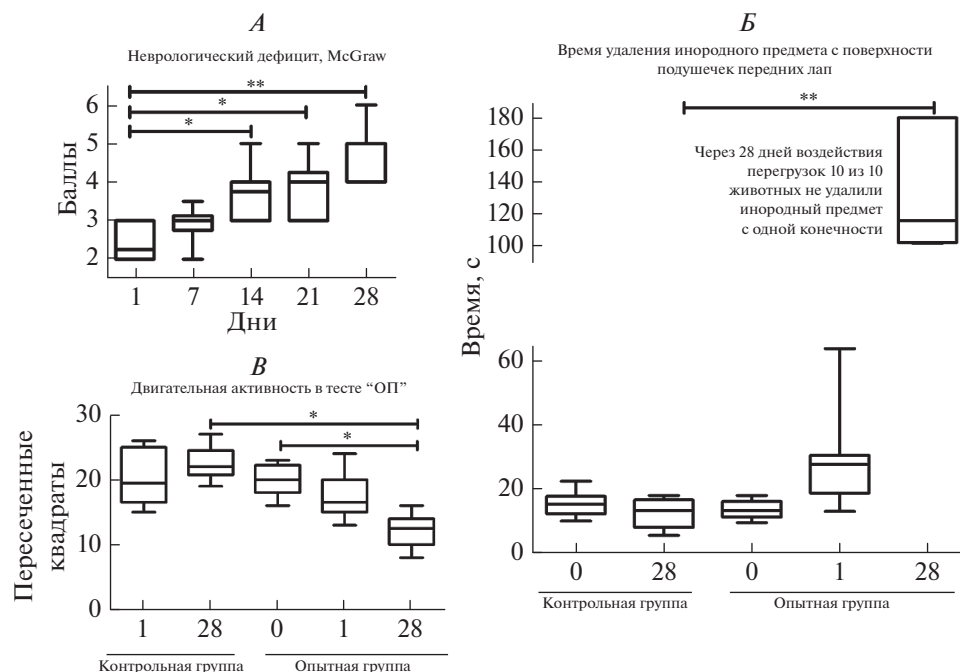


Рис. 1. Уровень неврологического дефицита по шкале McGraw, регистрируемый с 1-го по 28-й день эксперимента (А); время удаления инородного предмета с подушечки обеих лап животного (Б); двигательная активность животных в тесте "открытое поле" до начала эксперимента и спустя 1 и 28 дней (В). ОП – "открытое поле"; *, ** – различия достоверны при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно.

именно увеличение латентного периода обнаружения инородного предмета на волярной поверхности лапки.

В тесте "открытое поле", через 28 дней воздействия, в опытной группе показатель двигательной активности был значимо ниже, чем в интактной, а также значимо ниже исходного уровня, зафиксированного до начала вращения (рис. 1В).

Тестирование животных в установке для выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) показало, что через 2 ч после 1-го вращения в первый день у животных появлялись признаки ретроградной амнезии. Так, 4 из десяти животных зашли в темный отсек установки через 1 день и 9 из 10 через 28 дней вращения (рис. 2А). Эти наблюдения подтверждались данными в тесте решения экстраполяционной задачи (ТЭИ), в котором животные опытной группы с ранее выработанной стратегией избавления от аверсивной среды, медленнее вспоминали тактику поведения в установке, дольше в ней находились и совершали большее число безуспешных двигательных актов (прыжки). В конце эксперимента достоверно меньшее число животных опытной группы решило экстраполяционную задачу (рис. 2Б).

Гистологическое исследование СА1 зоны гиппокампа крыс 2-й группы (гипертензивная энцефалопатия) выявило резкие нарушения в мозговых сосудах, проявляющиеся прежде всего в выраженном периполюлярном и периваскулярном отеке (рис. 3). В сосудах микроциркуляторного русла выявлено полнокровие, стазы и диапедез эритроцитов. Стенки артериол приобретали признаки деструктивных и адаптивных изменений, связанных с плазматическим пропитыванием и утолщением, а также появлением сегментарных и циркулярных фибриноидных некрозов.

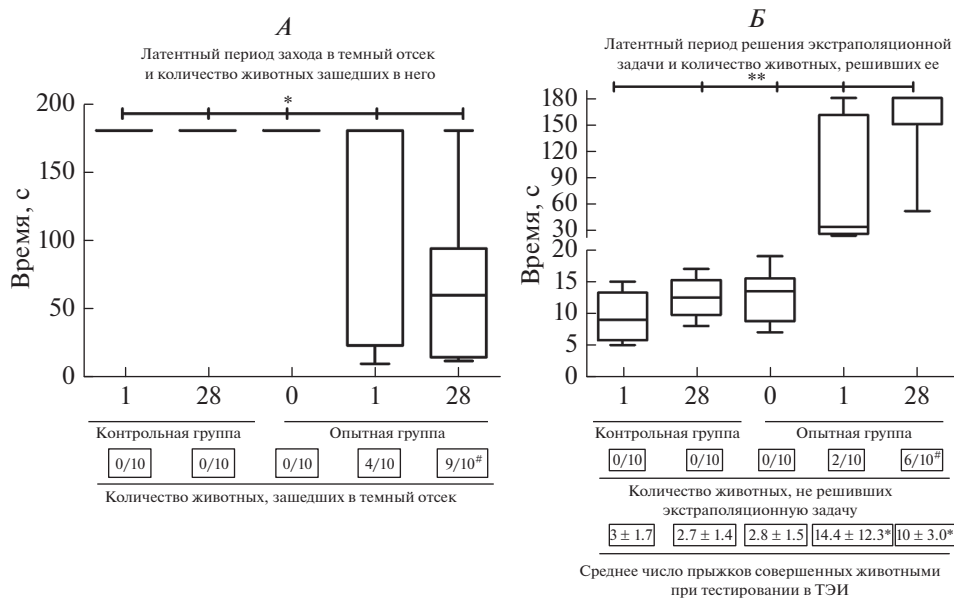


Рис. 2. Латентный период захода в темный отсек и количество заходов него в тесте УРПИ (А); латентный период подныривания (решения экстраполяционной задачи), количество животных, не решивших ее и среднее количество прыжков, совершенных животными до момента подныривания под край цилиндра тесте ТЭИ (Б); УРПИ – условная реакция пассивного избегания; ТЭИ – тест “экстраполяционное избегание”; *, ** – различия достоверны при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно, критерий Дана; # – различия достоверны при $p < 0.05$, критерий хи-квадрат.

Нарушение цитоархитектоники выражалось в резком увеличении числа нейронов пирамидного слоя с признаками повреждения (табл. 1). Среди поврежденных нейронов доминировали гиперхромные и гиперхромные в сочетании со сморщиванием перикариона. Морфометрический подсчет выявил увеличение удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения на 59.7% по сравнению с контролем ($p < 0.01$), при этом в отдельных полях зрения пирамидный слой СА1 зоны был представлен в виде гомогенизированной полоски, представленной тотально гиперхромными нейронами. Кроме того, визуально определялось менее компактное расположение нейронов по сравнению с контролем, а также очаговые выпадения и усиленная извитость отростков пирамидных нейронов (рис. 3).

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител против Vcl-2 в зоне СА1 крыс контрольной группы преобладала цитоплазматическая экспрессия преимущественно слабой интенсивности, в отдельных нейронах выявлялась умеренная экспрессия. В группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией характер экспрессии сменялся на преимущественно выраженную (табл. 1). Важной особенностью в характере экспрессии иммунореактивного материала у крыс с гипертензивной энцефалопатией является визуально более интенсивное окрашивание в нейронах со сморщенными перикарионами. Усиление экспрессии Vcl-2 также проявлялось в увеличении относительной площади иммунореактивного материала на 3.9% по сравнению с контролем.

В зоне СА2 гиппокампа крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией при гистологическом исследовании обнаружены схожие с СА1 зоной нарушения

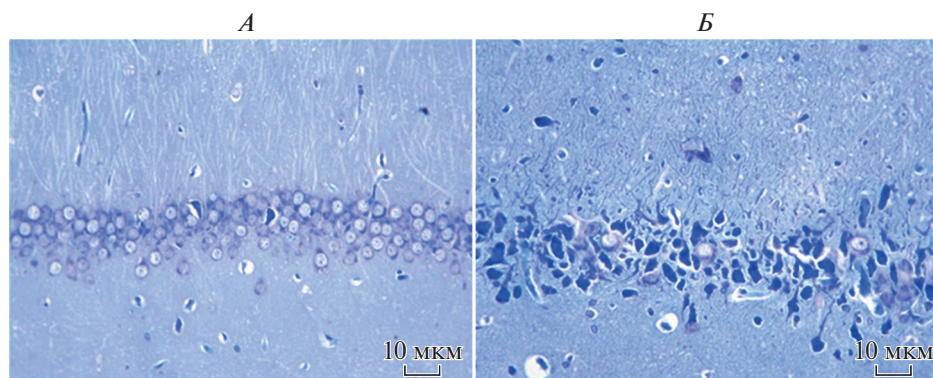


Рис. 3. Зона СА1 гиппокампа. Окраска тионином по методу Ниссля (ув. 400).

А – животное контрольной группы. *Б* – крыса с моделируемой гипертензивной энцефалопатией – отмечается выраженный перичеселлюлярный и периваскулярный отек, резкое увеличение количества нейронов с признаками повреждения.

микрогемодикуляции. СА2 зона характеризовалась наиболее выраженным увеличением удельного количества нейронов с признаками повреждения по сравнению с контролем – на 68% ($p < 0.001$). Среди поврежденных пирамидных нейронов преобладали тотально гиперхромные в сочетании с веретеновидной формой перикариона. При иммуногистохимическом исследовании Vcl-2 в СА2 зоне выявлено усиление экспрессии иммунореактивного материала. Интенсивность экспрессии Vcl-2-позитивного материала сменялась со слабо выраженной в контрольной группе на умеренную в группе крыс с моделируемой гипертензивной энцефалопатией. Относительная площадь иммунореактивного материала во 2-й группе увеличивалась на 5.6% по сравнению с контролем ($p < 0.01$; табл. 1).

При гистологическом исследовании СА3 зоны гиппокампа крыс 2 группы обнаружен максимально выраженный периваскулярный и перичеселлюлярный отек. В пирамидном слое преобладали нейроны с признаками повреждения вплоть до тотально гиперхромных, со сморщенными перикарионами и извитыми отростками. Удельное количество нейронов с признаками повреждения в СА3 увеличилось на 63.3% по сравнению с контрольной группой ($p < 0.01$; табл. 1). При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против Vcl-2 в СА3 зоне крыс 2 группы обнаружена цитоплазматическая экспрессия интенсивностью преимущественно умеренной выраженности в пирамидных нейронах и в отдельных глиальных клетках. Относительная площадь иммунореактивного материала в СА3 зоне увеличивалась на 4.4% по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Следует отметить, что в наиболее деформированных пирамидных нейронах интенсивность окрашивания была выше, достигая резко выраженной.

При гистологическом исследовании зоны СА4 гиппокампа крыс 2-й группы выявлены значительные изменения клеточного состава пирамидного слоя. Преобладали нейроны с признаками повреждения, большинство из которых составляли тотально гиперхромные со сморщенными перикарионами, приобретавшими веретеновидную или близкую к веретеновидной форму. Как и в остальных зонах, в СА4 гиппокампа крыс 2-й группы отмечены выраженные нарушения кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла: резкое полнокровие, стазы и диapedез эритроцитов. Перичеселлюлярный и периваскулярный отек выявлялся не только в пирамидном слое, но и в молекулярном и краевом полиморфном слоях. Изме-

Таблица 1. Оценка степени повреждения и относительной площади Vcl-2-позитивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании гипертензивной энцефалопатии

Морфометрический параметр	Контроль				Гравитационное воздействие			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество пирамидных нейронов с признаками повреждения, %	14.9 [11.3;6.9]	6.8 [4.9;8.2]	13.5 [9.5;16.3]	4.4 [2.9;7.0]	74.6 [69.3;81.5]**	74.8 [55.0;84.8]***	76.8 [72.5;79.9]**	71.0 [58.8;81.2]***
Относительная площадь ИРМ, Vcl-2, %	2.5 [2.1;3.4]	3.3 [3;3.5]	3.9 [3.7;4.2]	4 [3;5]	6.4 [5.3;17.1]**	8.9 [8.1;10.5]**	8.3 [6.8;9.4]**	9.7 [8.7;1.5]**

*, **, *** – различия достоверны по сравнению с контрольной группой при $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно, критерий Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы с указанием интерквартильного размаха (Me [Q₁;Q₃]) [12].

ния артериол проявлялись утолщением стенок, появлением сегментарных фибриноидных некрозов и милиарных аневризм. Морфометрический анализ выявил уменьшение УК нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое CA4 зоны увеличился на 66.6% по сравнению с контролем ($p < 0.001$; табл. 1). При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против Vcl-2 выявлено максимальное усиление экспрессии как в значениях относительной площади иммунореактивного материала (табл. 1), так и визуально в интенсивности реакции (рис. 4). Зона CA4 гиппокампа контрольных крыс характеризовалась равномерным распределением иммунореактивного материала преимущественно умеренной интенсивности. Во 2-й группе показатель интенсивности сменялся на резко выраженную и сохранялась тенденция к обнаружению в наиболее сморщенных нейронах максимальной цитоплазматической реакции. Кроме того, иммунореактивный материал визуализировался в глиальных элементах нейропиля, достигая умеренно выраженной интенсивности в отдельных астроцитах. Относительная площадь иммунореактивного материала увеличилась на 5.7% по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неблагоприятные эффекты, оказываемые перегрузками, связаны с гемодинамическими сдвигами, и их выраженность зависит, главным образом, от направления ускорения, его силы, длительности, а также от градиента нарастания. Сложность систематизации накопленных в современной литературе данных связана с различиями в моделировании гравитационных воздействий. Так, в зависимости от вели-

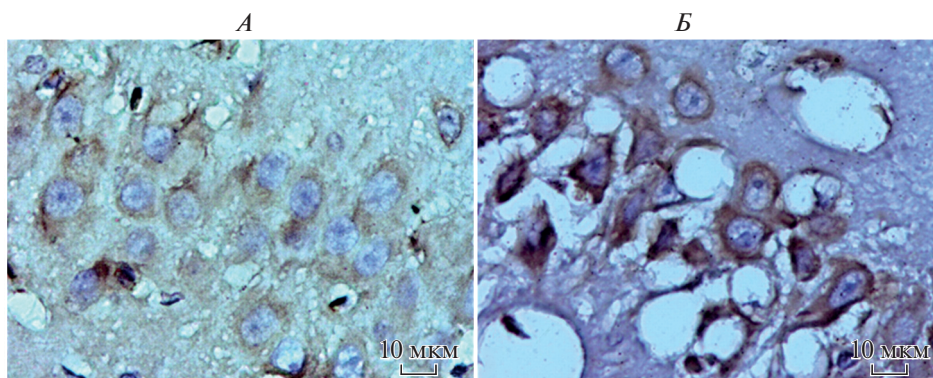


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование СА4 зоны гиппокампа. Антитела против Bcl-2, докраска гематоксилином (ув. 400).

А – животное контрольной группы – отмечается равномерная экспрессия в нейронах пирамидного слоя. *Б* – крыса с моделируемой гипертензивной энцефалопатией – наблюдается увеличение относительной площади и интенсивности иммунореактивного материала.

чины ускорений и скорости нарастания, перегрузки в кранио-каудальном векторе (+ Gz) могут оказывать как положительное, так и отрицательное действие [13, 14]. Возникающие и прогрессирующие повреждения и нарушения функционирования ЦНС после многократно повторяющихся гравитационных воздействий в каудо-краниальном векторе, которые выражались в увеличении балла неврологического дефицита, снижением чувствительности к внешним раздражителям и/или мелкой моторики (адгезивный тест), сниженной двигательной активностью животных (“открытое поле”), в проявлении ретроградной амнезии (УРПИ и ТЭИ), являются следствием и проявлением морфологических патологических изменений в тканях головного мозга. Обнаруженный нами выраженный спонгиоз во всех зонах гиппокампа при экспериментальном моделировании гипертензивной энцефалопатии связан с вазогенным отеком, который имеет тенденцию к нарастанию по мере увеличения общей продолжительности воздействия отрицательных продольных перегрузок. Однократное воздействие в каудо-краниальном векторе силой 9 g приводит к гравитационному смещению крови в головной мозг и верхнюю половину тела крыс, срыву вазомоторных ауторегуляторных возможностей и депонированию крови в сосудах микроциркуляторного русла. При этом возникающие нарушения обуславливаются не только усиленным артериальным притоком, но и нарушением венозного оттока. Совокупность этих факторов приводит к первичным альтеративным изменениям в стенках артериол с развитием плазматического пропитывания, повреждению гематоэнцефалического барьера и появлению периваскулярного отека. Однако обусловленные однократным (что было выявлено в предыдущих исследованиях) воздействием функциональные нарушения являются нестойкими и быстро регрессируют. При многократно повторяющихся воздействиях артериолы претерпевают необратимые изменения с развитием фибриноидных некрозов и утолщением стенок, что ведет к гипоксическому повреждению нервных клеток.

Выявленное нами увеличение удельного количества нейронов пирамидного слоя гиппокампа с признаками повреждения во всех зонах свидетельствует о развитии дегенеративных изменений, а преобладание среди поврежденных нейронов тотально гиперхромных со сморщенными перикарионами и усиленной извитостью отростков, проходящих в радиальном слое, свидетельствует о развитии как

обратимого, так и необратимого повреждения [15]. В наших предшествующих работах было показано, что при моделировании гипертензивной энцефалопатии в гиппокампе крыс наблюдаются атрофические процессы, выраженные в снижении средних площадей перикариона и ядра пирамидных нейронов. Кроме того, описаны очаговые выпадения и снижение относительной площади перикарионов пирамидных нейронов, особенно значительное в СА1 зоне, что свидетельствует о клеточной гибели с возможным участием апоптоза [15, 16].

Важной выявленной в данной работе особенностью экспрессии Bcl-2 в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии является наиболее резкое усиление степени экспрессии в зонах СА2 и СА4. Учитывая действие Bcl-2 как обеспечивающего выживаемость [8, 9], мы предполагаем важную роль Bcl-2 как одного из факторов более высокой устойчивости СА2 и СА4 зон по сравнению с СА1 и СА3. Ряд исследований сообщает о большей уязвимости СА1 и СА3 [6], что, возможно, связано в том числе и с более низкой активностью Bcl-2 в этих зонах. Тем не менее, для полноценного понимания механизмов регулируемой клеточной смерти и выживаемости при гипертензивной энцефалопатии необходимо дальнейшее изучение подсемейства проапоптотических белков, таких как Bax, Bid, Bak, а также маркеров аутофагии. Перспективным направлением может стать исследование уровня экспрессии белка Beclin-1 из подсемейства WH3-domain proteins, отвечающего за индукцию аутофагии [11]. Поскольку этот белок связывает антагонистически действующие белки Bcl-2/Bcl-XL/Bax, выявленное нами усиление экспрессии Bcl-2 может свидетельствовать о распаде Beclin-1/Bcl-2 комплекса и перекрестном участии Bcl-2 в регулировании как процессов, связанных с блокированием митохондриального пути активации апоптоза, так и процессов активации Beclin-1-зависимой аутофагии.

Таким образом, воздействие повторяющихся продольных радиальных гравитационных перегрузок в каудо-краниальном векторе с силой 9 g, длительностью 5 минут и режимом 2 раза в день в течение 28 дней приводит к нарастанию тяжести неврологического дефицита, снижению мелкой моторики животного и его поведенческой активности, а также появлению признаков ретроградной амнезии и снижения когнитивных навыков. Проведенное качественное и количественное исследование гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании гипертензивной энцефалопатии выявило резкий перичеселлюлярный и периваскулярный отек, утолщение стенок сосудов микроциркуляторного русла с развитием в них изменений деструктивного и адаптивного характера, выраженное увеличение удельного количества нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое всех зон. При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против Bcl-2 выявлено достоверное усиление экспрессии во всех зонах гиппокампа, при этом максимально выраженное усиление экспрессии как в относительной площади иммунопозитивного материала, так и в интенсивности реакции обнаружено в зонах СА2 и СА4.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет финансирования государственных заданий по проведению доклинических исследований средства для коррекции НМК (номера государственных регистраций 115042410205, 115042410206).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимова К.Ю., Стефанова Н.А., Логвинов С.В. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении. Бюл. сиб. мед. 13(1): 56–61. 2014. [Maksimova K.Yu., Stefanova N.A., Logvinov S.V. Morphological changes in the hippocampus of rats in accelerated aging. Bull. Siberian Med. 13(1): 56–61. 2014. (In Russ.)].
2. Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. М. Медицина. 1965. [Zhabotinsky Yu.M. Normalnaya i patologicheskaya morfologiya neyrona. [Normal and pathological morphology of the neuron]. Moscow. Medicina. 1965].
3. Смирнов А.В., Шмидт М.В., Медников Д.С., Экова М.Р., Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Структурные изменения гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании гипертензивной энцефалопатии с учетом экспрессии белков теплового шока. Вестн. ВолгГМУ. 60(4): 90–95. 2016. [Smirnov A.V., Schmidt M.V., Mednikov D.S., Ekova M.R., Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Volotova E.V. The structural features of the hippocampus of rats with the expression of heat shock proteins in the modeling hypertensive encephalopathy. J. VolgSMU. 60(4): 90–95. 2016. (In Russ.)].
4. Литвинов А.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Анализ последствий ишемического поражения головного мозга животных, вызванного воздействием центробежного ускорения в кранио-каудальном векторе на фоне однократного введения производных гамма-амино- и гамма-оксимасляной кислот. Вестн. Рос. Военно-мед. акад. 40(4): 179–183. 2012. [Litvinov A.A., Kurkin D.V., Volotova E.V. Analysis of cerebral ischemic damage results, caused caudo-cranial gravitational forces, in case of new derivatives of gamma-amino- and gamma-oxobutyric acid single administration. Vestnik Voenno-Meditsinskoi Akademii. 40(4): 179–183. 2012. (In Russ.)].
5. Гаевый М.Д., Назарова Л.Е., Гаевая Л.М., Огурцов Ю.А. Воспроизведение геморрагического инсульта в эксперименте. Патол. физиол. и экспер. терапия. (2): 7–8. 2000. [Gaevy M.D., Naifarova L.E., Gaevaya L.M., Ogurtsov Yu.A. Experimental hemorrhagic stroke. Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (2) 2): 7–8. 2000. (In Russ.)].
6. Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Экова М.Р., Шмидт М.В., Медников Д.С., Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Морфологические изменения и особенности экспрессии сериновой рацемазы в гиппокампе крыс при комбинированном стрессорном воздействии. Морфология. 150(6): 20–25. 2016. [Smirnov A.V., Grigorieva N.V., Ekova M.R., Schmidt M.V., Mednikov D.S., Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Volotova Ye. V. Morphological changes and serine racemase expression in rat hippocampus under combined stress condition. Morfologiya. 150(6): 20–25. 2016. (In Russ.)].
7. Rolls E.T. Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system. Cortex. 62: 119–157. 2015.
8. Ito R, Lee A.C. The role of the hippocampus in approach-avoidance conflict decision-making: Evidence from rodent and human studies. Behav. Brain Res. 15(313): 345–357. 2016.
9. Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Biochim. Biophys. Acta. 1644(2-3): 83–94. 2004.
10. Смирнов А.В., Григорьева Н.В., Горелик Е.В. Патологическая анатомия цереброваскулярной болезни. Стратегии стимуляции нейрогенеза. Вестн. ВолгГМУ. 46(2): 3–8. 2013. [Smirnov A.V., Grigoryeva N.V., Gorelik E.V. Morbid anatomy of cerebrovascular disease, strategies stimulation of neurogenesis. J. VolgSMU. 46(2): 3–8. 2013. (In Russ.)].
11. Mukhopadhyay S., Panda P.K., Sinha N., Das D.N., Bhutia S.K. Autophagy and apoptosis: Where do they meet? Apoptosis. 19(4): 555–566. 2014.
12. Смирнов А.В., Шмидт М.В., Медников Д.С., Экова М.Р., Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Особенности структурных изменений пирамидного слоя гиппокампа крыс при гравитационном воздействии в каудо-краниальном векторе с учетом экспрессии GFAP. Журн. анат. гистопатол. 6(2): 75–82. 2017. [Smirnov A.V., Schmidt M.V., Mednikov D.S., Ekova M.R., Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Volotova E.V. Features of structural changes in the pyramidal layer of a hippocampus of rats in gravitational overload in caudo-cranial vector, taking into account GFAP expression. J. Anatomy and Histopathology. 6(2): 75–82. 2017. (In Russ.)].
13. Sato T., Miyoshi T., Nakazawa K., Yano H., Takeoka H. Reflex response changes during hyper and microgravity. J. Gravit. Physiol. 8(1): P97–P99. 2001.
14. Marušič U., Meeusen R., Pišot R., Kavcic V. The brain in micro- and hypergravity: The effects of changing gravity on the brain electrocortical activity. Eur. J. Sport Sci. 14(8): 813–822. 2014.
15. Chan S.L., Yu V.C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: From mechanistic insights to therapeutic opportunities. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 31(3): 119–128. 2004.
16. Смирнов А.В., Шмидт М.В., Медников Д.С., Экова М.Р., Тюренков И.Н., Бакулин Д.А. Морфометрическое исследование гиппокампа правого полушария крыс при моделиро-

вании гипертензивной энцефалопатии. Волгоградский научно-медицинский журнал. 52(4): 7–11. 2016. [Smirnov A.V., Schmidt M.V., Mednikov D.S., Ekova M.R., Tyurenkov I.N., Bakulin D.A. Morphometric study of the right hemisphere hippocampus in rats in modeled hypertensive encephalopathy. Volgograd J. Med. Res. 52(4): 7–11. 2016. (In Russ.)].

Functional and Morphological Changes in the Pyramidal Layer of the Hippocampus in Rats with Encephalopathy Caused by Prolonged Exposure to Gravitational Overloads

I. N. Tyurenkov^a, A. V. Smirnov^{a, b}, D. S. Mednikov^a, M. V. Shmidt^{a, b}, M. R. Ekova^a,
D. V. Kurkin^a, D. A. Bakulin^{a, *}, E. V. Volotova^a

^aVolgograd State Medical University, Volgograd, Russia

^bVolgograd Medical Scientific Center, Volgograd, Russia

*e-mail: mbfdoc@gmail.com

Abstract—The study of morphofunctional changes in the hippocampus in the simulation of cerebral hemodynamic disorders is necessary for understanding the mechanisms of formation of neurological disorders. The study aimed to assess the damage to the CNS and the level of expression of Bcl-2 in the hippocampus of rats with cerebral hemodynamic disturbance caused by repeated gravitational overloads. The study was carried out on Wistar rats, which were subjected to gravitational overloads (9 g) in the caudocranial vector twice a day for 5 minutes for 28 days. Neurological disorders in animals were assessed using the McGraw scale and the Open field test, Adhesive test, passive and active avoidance tests. Brain sections were Nissl stained, and the number of damaged neurons was calculated. An immunohistochemical study of the expression level of Bcl-2 calculated the relative size of the immunoreactive material in the pyramidal layer of all zones of the hippocampus. The gravitational overloads caused disturbances in the behavior of animals, which manifested itself in low motor activity with signs of retrograde amnesia, a decrease in fine motor skills, and an increase in the neurological deficit. Histological examination revealed destructive changes in blood vessels, an increase in the number of pyramidal neurons with signs of damage in all zones of the hippocampus. The CA2 and CA4 zones were characterized by a maximum increase in the number of damaged neurons and increased expression of Bcl-2.

Keywords: hippocampus, apoptosis, Bcl-2, neurological disorders

ЦИТИРОВАТЬ:

Тюренков И.Н., Смирнов А.В., Медников Д.С., Шмидт М.В., Экова М.Р., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. Функциональные и морфологические изменения в пирамидном слое гиппокампа крыс при энцефалопатии, вызванной длительными воздействиями гравитационных перегрузок. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 105(3): 339–349.

DOI: 10.1134/S0869813919030075

TO CITE THIS ARTICLE:

Tyurenkov I.N., Smirnov A.V., Mednikov D.S., Shmidt M.V., Ekova M.R., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V. Functional and Morphological Changes in the Pyramidal Layer of the Hippocampus in Rats with Encephalopathy Caused by Prolonged Exposure to Gravitational Overloads. Russian Journal of Physiology. 105(3): 339–349.

DOI: 10.1134/S0869813919030075