



Т. М. КОВАЛЕНКО, І. О. ОСАДЧЕНКО, Н. В. ЧАЙКА, Г. Г. СКИБО

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ

## Вплив гіпоксичного прекондиціювання на чутливість нейронів зони СА1 гіпокампа при експериментальній ішемії мозку

**Мета** — визначити ефективність нейропротекторного впливу прекондиціювання (ПРК) на структуру СА1 зони гіпокампа ішемізованих щіщанок монгольських.

**Матеріали і методи.** Дослідження впливу ПРК проведено на самцях щіщанок монгольських, яких розподілили на чотири групи: 1 — контрольні (інтактні) тварини, 2 — група тварин, у яких моделювали ішемію мозку, 3 — група тварин, які підлягали ПРК без ішемії, 4 — група тварин з ПРК + ішемія. Перед ішемічним впливом проводили інтервальні гіпоксичні тренування (5 разів по 5 хв з 5-хвилинним інтервалом щоденно протягом 21 доби) із застосуванням нормобаричної гіпоксичної газової суміші (10% O<sub>2</sub> у N<sub>2</sub>). Глобальну ішемію мозку моделювали оклюзією обох загальних сонних артерій протягом 5 хв. Забір тканини мозку проводили на 7-му добу після оклюзії. На зрізах гіпокампа визначали ступінь ішемічного ушкодження пірамідних нейронів та астроцитів у зоні СА1 гіпокампа за допомогою світлової мікроскопії та імуногістохімічного методу.

**Результати.** Структурний аналіз показав, що у групі тварин з ішемією на 7-му добу після 5-хвилинної оклюзії сонних артерій у зоні СА1 гіпокампа був високий рівень відстроченої загибелі нейронів. У групі тварин, яких надавали ПРК та ішемії, ця зона була структурно більш збереженою. За даними імуногістохімічного дослідження, хоча у групі ПРК + ішемія певна кількість пірамідних нейронів загинула, кількість нейронів, які вижили, була значно більшою, ніж у групі з ішемією. Крім того, в групі ПРК + ішемія відзначено тенденцію до зменшення постішемної активації астроцитів, хоча їх кількість була більшою, ніж у контрольній групі.

**Висновки.** При аналізі впливу гіпоксичного прекондиціювання на виживання нейронів у зоні СА1 гіпокампа виявлено більшу (на 28,5%) кількість пірамідних нейронів на 7-му добу після ішемії порівняно з групою ішемізованих тварин. Збільшення кількості нейронів, які вижили, і зменшення постішемної активації астроцитів у групі прекондиціювання та ішемії свідчать про запуск тривалих ендогенних механізмів нейропротекції, ініційованих прекондиціюванням.

**Ключові слова:** гіпокамп, гіпоксичне прекондиціювання, глобальна ішемія мозку, нейрони, астроцити.

Хвороби системи кровообігу — одні з найчастіших патологій сучасної цивілізації. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, щорічно у світі внаслідок ішемічної хвороби серця та інсульту помирає понад 17 млн осіб (30% від усіх випадків смерті). За прогнозом, цей показник зростатиме [4].

Мозковий інсульт є найтяжчою формою цереброваскулярних захворювань. За офіційною статистикою, щороку в Україні діагностують 100—110

тис. випадків інсульту (понад третину з них — в осіб працездатного віку). Лише близько 10% осіб повертаються до повноцінного життя [2].

Ішемічний інсульт головного мозку — найпоширеніший тип інсульту (майже 87%). Оскільки для енергетичного забезпечення нервових клітин необхідне постійне і безперервне надходження глюкози та кисню з кровоносного русла, їх дефіцит призводить до значних змін структури нервової тканини і порушення функцій мозку [13].

Незважаючи на те, що добре вивчено всі ланки пошкоджувальної дії ішемії на тканину мозку, мож-

ливості фармакологічного лікування гострого ішемічного інсульту є обмеженими [20]. Тому актуальними завданнями терапевтичної стратегії щодо ішемії мозку є стимуляція та мобілізація внутрішніх резервів організму і активація генетично детермінованих внутрішньоклітинних механізмів, які можуть зменшити пошкоджувальну дію ішемії на мозок та сприятимуть швидшому відновленню його функцій.

Понад 30 років тому було виявлено феномен ішемічної/гіпоксичної толерантності. С. Murry та співавт. [18] показали, що попередній епізод короткочасної ішемії сприяє підвищенню резистентності тканини міокарда до наступної тривалішої пошкоджувальної ішемії. Для позначення цього явища застосовують термін «ішемічне прекодиціювання» (ПРК). Пізніше такі самі ефекти було виявлено в інших тканинах, зокрема в мозку. Отже, ішемічне/гіпоксичне ПРК є механізмом, при якому тканини піддаються впливу контрольованої короткочасної сублетальної ішемії/гіпоксії, яка зменшує пошкодження клітин унаслідок наступної тривалої ішемії [21]. Важливо, що ПРК не зменшує частоту розвитку інсульту, але може зменшити обсяг інфаркту і поліпшити відновлення структури нервової тканини, пошкодженої унаслідок ішемії [17]. Ця форма адаптації, спричинена ПРК, існує в різних тканинах і клітинах, що забезпечує їх виживання та захист від шкідливих стресових чинників [9].

В експериментальних дослідженнях установлено, що реалізація захисного потенціалу за рахунок ПРК залежить від багатьох чинників: частоти і тривалості ішемічних впливів, повноцінності реперфузії, мінімального порогового часу ішемії до початку реперфузії, видової приналежності, індивідуальних особливостей та віку. Однак феномен ПРК і його механізми в дослідженнях вивчено недостатньо, а отримані дані часто суперечливі. Переважно це пояснюється використанням різних експериментальних моделей ішемії головного мозку та методів проведення ПРК [1].

Відомо, що однією з найчутливіших до ішемічного ураження ділянок мозку є гіпокамп, а саме пірамідні нейрони в зоні CA1. Гіпокамп — це структура мозку, яка відповідає за механізми довгострокової пам'яті, навчання та емоції [5, 16].

**Мета роботи** — визначити ефективність нейропротекторного впливу прекодиціювання на структуру CA1 зони гіпокампа ішемізованих піщанок монгольських.

**Матеріали і методи**

Дослідження впливу ПРК проведено на 26 самцях піщанок монгольських з масою тіла 70—90 г, оскільки у будові судин головного мозку цих тварин є особливість — недорозвинене вілізієве коло, тому для моделювання глобальної ішемії цим тваринам достатньо перетиснути обидві сонні артерії. Цей вид тварин широко використовують дослідники [1]. Для

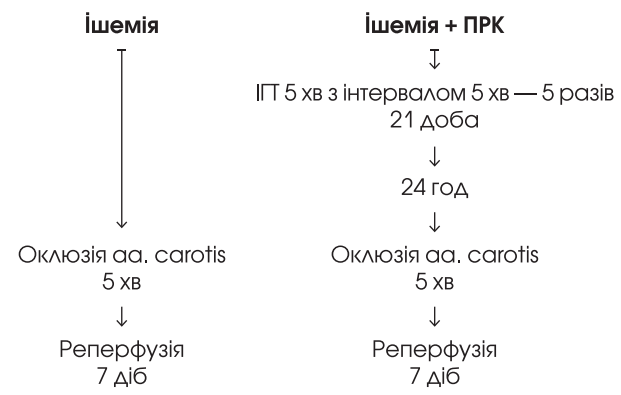
індукції ендогенних механізмів нейропротекції застосовували ПРК у вигляді інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ), які можуть підвищити ішемічну толерантність тканини мозку [12, 19].

Тварин розподілили на чотири групи: 1 — контрольна (інтактні тварини), 2 — тварини, в яких моделювали глобальну ішемію мозку, 3 — тварини, які підлягали ПРК без ішемії, 4 — тварини, у яких перед ішемією проводили ІГТ (ПРК + ішемія).

Гіпоксичні тренування проводили із застосуванням нормобаричних гіпоксичних газових сумішей (10% O<sub>2</sub> у N<sub>2</sub>) 5 разів протягом 5 хв із 5-хвилинним інтервалом. Такий режим гіпоксичних тренувань застосовували 1 раз на день упродовж 21 доби (рис. 1). Потім моделювали у тварин глобальну ішемію шляхом оклюзії обох загальних сонних артерій впродовж 5 хв з наступною реперфузією протягом 7 діб.

Для створення ішемії мозку тварин попередньо наркотизували внутрішньом'язовим введенням каліпсолу (75 мг/кг маси тіла) і ксилазину (2 мг/кг маси тіла), відпрепарували обидві загальні сонні артерії і перетискали їх за допомогою атравматичних мікрозатискачів (оклюзія) протягом 5 хв із наступним їх зняттям та відновленням кровотоку (реперфузія). На 7-му добу після оклюзії брали матеріал для морфологічних та імуногістохімічних досліджень. Фіксацію тканини мозку проводили методом транскардіальної перфузії фіксуючим розчином, який містив 2% параформальдегіду та 0,25% глутаральдегіду. Після фіксації тварин декапітували, мозок видаляли з черепної коробки, розділяли на дві півкулі та виділяли гіпокамп.

Для імуногістохімічного дослідження за допомогою вібратора Leica VT 1000A (США) виготовляли зрізи гіпокампа з однієї півкулі завтовшки 50 мкм. Зрізи відмивали 0,1-молярним фосфатним буфером та поміщали у блокуючий розчин, який містив 1% нормальної сироватки кози та 0,3% Triton X-100. Застосовували подвійне флуоресцентне забарвлення зрізів. Для ідентифікації нейронів використовували



**Рис. 1.** Протокол моделювання гіпоксичного прекодиціювання при глобальній ішемії мозку в піщанок монгольських

антитіла, специфічні до нейронального ядерного регуляторного білка NeuN (Dako, Данія), для визначення астроцитів — поліклональні антитіла до специфічного маркера астроцитів — гліального фібрилярного кислого білка GFAP (Dako, Данія). Зрізи інкубували з первинними анти-NeuN-антитілами миші (1:1000) та анти-GFAP-антитілами кроля (1:1500) протягом 16 год за температури +4 °C. Після відмивання зрізи інкубували з вторинними протимишачими антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor 488 (1:1000) і протикролячими, кон'югованими з Alexa Fluor 555 (1:1000, Molecular probes, США) протягом 1,5 год за кімнатної температури. Після відмивання зрізи поміщали на гістологічні скельця в спеціальне середовище для флуоресцентної мікроскопії Fluorescence Mounting Media (Dako, Данія).

Аналіз зрізів гіпокампа проведено за допомогою конфокального мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

З гіпокампа другої півкулі мозку отримували фронтальні зрізи завтовшки 400 мкм за допомогою чопера (McIlwain tissue chopper, Велика Британія) і заливали в епоксидні смоли за стандартною методикою електронної мікроскопії [6]. З отриманих блоків виготовляли тонкі зрізи, забарвлювали їх метиленовим синім та використовували для вивчення динаміки та ступеня ішемічного ушкодження пірамідних нейронів у CA1 зоні гіпокампа на світлооптичному рівні.

Аналіз тонких зрізів проводили за допомогою мікроскопів Olympus та Leica DM 1000 (Leica Microsystems, Німеччина).

Морфометричний аналіз одержаних препаратів здійснювали за допомогою комп'ютерної системи аналізу зображень Image Tool (США) і Bioquant (R&M Biometrics, США). Підраховували відносну кількість неушкоджених нейронів у зоні CA1 гіпокампа на 100 мкм довжини пірамідного шару. Зображення тканини гіпокампа, отримані з допомогою конфокального мікроскопа, використовували для підрахунку кількості астроцитів на 10 000 мкм<sup>2</sup> площі CA1 зони.

Статистичний аналіз цифрових даних проводили за допомогою програми Statistica (StatSoft, США). Аналіз вибірок передбачав розрахунок середнього арифметичного значення, стандартного відхилення та стандартної похибки середнього арифметичного значення. Для визначення статистичної значущості розбіжностей між вибірками використовували t-критерій Стюдента, оскільки при проведенні тесту Шапіро—Уїлка дані мали нормальний розподіл. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## Результати

У контрольних тварин пірамідні нейрони в зоні CA1 розташовувались у вигляді шару завширшки 3—5 клітин, тіла яких мали світле округле ядро з добре розрізняваними одним чи двома ядерця-

ми та вузькою смужкою дещо темнішої цитоплазми навколо ядра (рис. 2А). На поперечних зрізах гіпокампа видно чітко окреслені апікальні дендрити у поздовжньому розрізі, орієнтовані паралельно у радіальному напрямку.

Після застосування ПРК без наступної ішемізації тварин статистично значущих змін кількості пірамідних нейронів у зоні CA1 не виявлено (рис. 3). У цілому в будові та розташуванні клітин та їх відростків не було суттєвих відмінностей порівняно з контрольною групою тварин (рис. 2В).

За даними наших попередніх досліджень динаміки ушкодження гіпокампа після короточасної ішемії, початкові зміни в нейронах виявлялися через одну добу після оклюзії у вигляді набрякання, просвітлення цитоплазми і збільшення об'єму клітин та ядер. З третьої доби починалися нейродегенеративні зміни пірамідних нейронів, які критично наростали до 7-ї доби [3]. У цей термін переважали некротичні зміни нейронів у зоні CA1 з ознаками каріопікнозу, каріорексису та цитолізу. Світлооптично ушкоджені клітини виглядали гіперхромними, з погано розрізняваними ядрами, зменшеними розмірами тіл. Спостерігали значне розрідження клітин у пірамідному шарі та зменшення його ширини внаслідок дегенерації значної частини нейронів разом з апікальними дендритами (рис. 2Б).

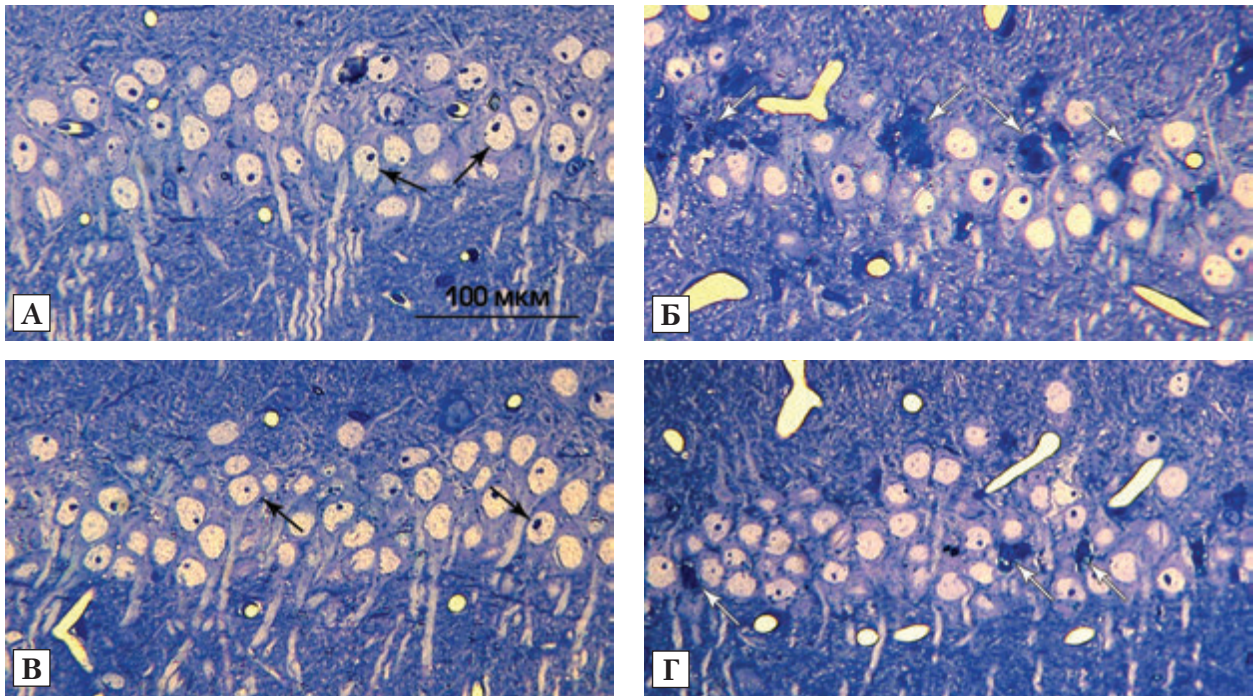
Серед пошкоджених клітин у зоні CA1 гіпокампа в ішемізованих тварин розташовувалися неушкоджені клітини з добре розрізняваним світлим ядром і цитоплазмою, хоча вони виглядали набряклими.

У всіх досліджуваних групах тварин підраховували кількість неушкоджених нейронів з наявними на зрізі ядерцями для запобігання повторному підрахунку клітин на серійних зрізах. У групі тварин з ішемією через 7 діб після 5-хвилинної оклюзії сонних артерій у зоні CA1 гіпокампа спостерігали високий рівень загибелі нейронів. Кількість нейронів, які вижили, становила 58 % (див. рис. 3).

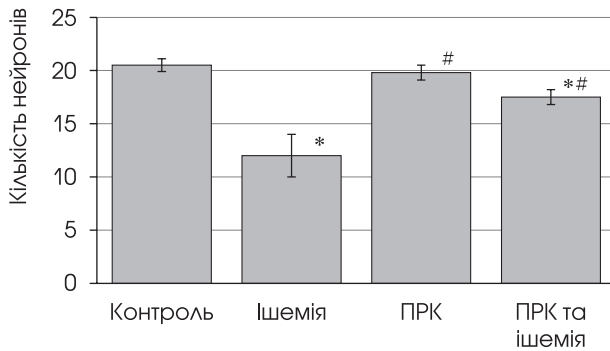
При застосуванні гіпоксичного ПРК перед наступним епізодом глобальної ішемії тварин виявлено більшу (на 28,5 %) кількість пірамідних нейронів, які вижили на 7-му добу після ішемії (див. рис. 3) порівняно з групою ішемізованих тварин. Неушкоджені нервові клітини у тварин цієї групи мали чітко виражені плазматичну та ядерну мембрани, ядра були великими і світлими, чітко розрізнялись ядерця та апікальні дендрити. Соматонейронів мала дещо більші розміри (рис. 2Г), що може свідчити про їх набрякання. Отже, зона CA1 гіпокампа, селективно чутлива до різних ушкоджувальних впливів, структурно була більше збереженою при ішемії після проведення гіпоксичних тренувань.

Для детального аналізу впливу ПРК на пірамідні нейрони зони CA1 гіпокампа в умовах ішемії, а також для оцінки реакції астроцитів проводили імуногістохімічне забарвлення зрізів гіпокампа з використанням специфічних маркерів нейронів [3,



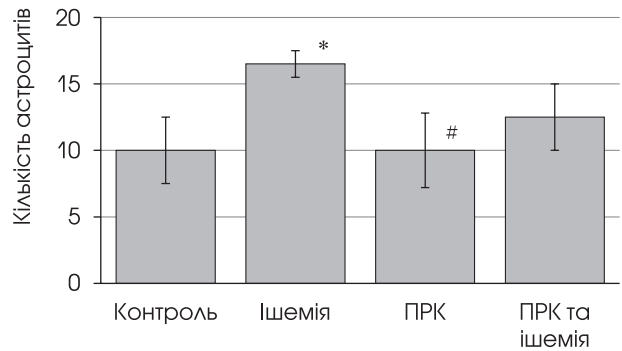


**Рис. 2.** Фрагменти СА1 зони гіпокампа у щіщанок монгольських. Тонкі зрізи, забарвлення метиленовим синім: А — контроль; Б — ішемія; В — прекодиціювання; Г — прекодиціювання + ішемія. Чорними стрілками позначено ядра неушкоджених пірамідних нейронів з ядерцями, білими стрілками — загиблі нервові клітини



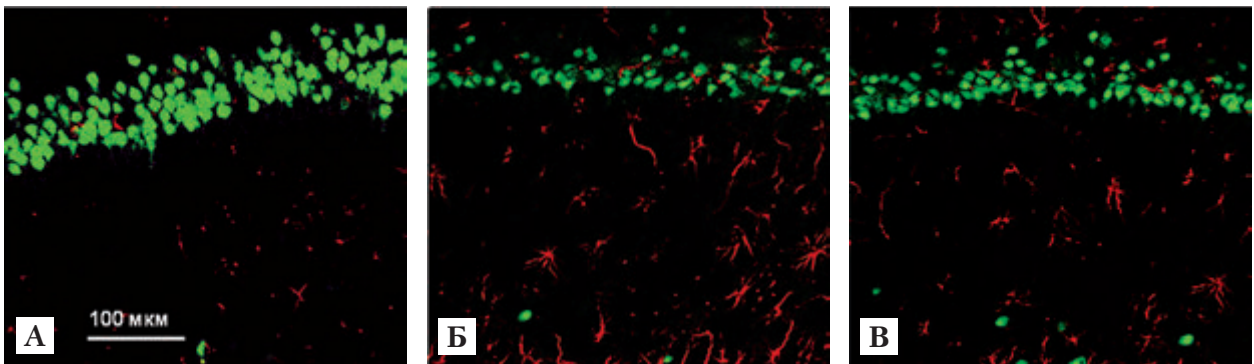
\* Різниця щодо контролю статистично значуща ( $p < 0,05$ ).  
# Різниця щодо групи з ішемією без прекодиціювання статистично значуща ( $p < 0,05$ ).

**Рис. 3.** Кількість непошкоджених нейронів на 100 мкм довжини пірамідного шару в зоні СА1 гіпокампа у щіщанок монгольських після прекодиціювання та ішемії



\* Різниця щодо контролю статистично значуща ( $p < 0,05$ ).  
# Різниця щодо групи з ішемією без прекодиціювання статистично значуща ( $p < 0,05$ ).

**Рис. 5.** Зміни кількості астроцитів на 10 000 мкм<sup>2</sup> площі зони СА1 гіпокампа у щіщанок монгольських після різних експериментальних впливів



**Рис. 4.** Імуногістохімічне забарвлення зони СА1 гіпокампа. Зелена флуоресценція відповідає NeuN-позитивним ядрам пірамідних нейронів, червона — GFAP-позитивним тілам астрогліальних клітин: А — контроль; Б — ішемія; В — прекодиціювання + ішемія

5]. За даними імуногістохімічних досліджень та світлової мікроскопії виявлено, що в групі тварин з ішемією була порушена структура шару пірамідних нейронів. При забарвленні зрізів метиленовим синім спостерігали високий ступінь гіперхромності клітин та ознаки загибелі їх шляхом некрозу (див. рис. 2Б), що спричиняло зменшення кількості неушкоджених нейронів. Імуногістохімічно це відповідало зменшенню кількості ядер пірамідних нейронів з NeuN-позитивною флуоресценцією (рис. 4).

При застосуванні попередніх гіпоксичних тренувань зона CA1 гіпокампа була стійкішою до наступного ішемічного впливу. Хоча певна кількість пірамідних нейронів у групі ПРК + ішемія загинула (див. рис. 2Г), кількість нейронів, які вижили, була значно більшою, ніж у групі з ішемією, про що свідчило NeuN-позитивне імунофлуоресцентне забарвлення ядер нейронів (див. рис. 4). Отже, структура пірамідного шару в зоні CA1 гіпокампа в групі ПРК + ішемія була більш збереженою.

При імуногістохімічному забарвленні зони CA1 гіпокампа ішемізованих тварин спостерігали реактивний астроцитоз: гіпертрофію та гіперплазію астроцитів у всіх шарах зони CA1 (*stratum pyramidale*, *stratum radiatum* і *stratum lacunosum-moleculare*) (див. рис. 4), кількість клітин порівняно із контрольною групою була більшою на 65%. У тварин з ПРК відзначено певну гіпертрофію астроцитів у *stratum lacunosum*. Імовірно, відбувалася міграція клітин до *stratum radiatum*, але статистично значущих відмінностей за кількістю астроцитів від контрольної групи не виявлено. В зоні CA1 гіпокампа ішемізованих тварин, попередньо прекодиційованих, спостерігали помірну активацію астроцитів. Відзначено тенденцію до зменшення постішемічної гіперплазії астроцитів (рис. 5).

### Обговорення

Як зазначено вище, виражена гіпоксія призводить до пошкодження тканин головного мозку, загибелі нейронів і порушення когнітивних функцій організму, що виявляється погіршенням пам'яті, поведінковими змінами, погіршенням здатності до навчання та іншими патологічними порушеннями [10, 19]. Проте гіпоксія, яка не призводить до пошкодження нейронів, може бути чинником, котрий збільшує толерантність мозкової тканини до подальшого пошкодження ішемією-реперфузією [5, 14, 21]. Показано, що гіпоксія та ішемія як прекодиційовальний чинник збільшує толерантність мозкової тканини при моделюванні ішемії як у щушок, так і в інших гризунів (щурів, мишей) [11, 12]. Зокрема, у роботі К. Kitagawa [15], піонера вивчення впливу ішемічного ПРК, продемонстровано, що 5-хвилинна оклюзія сонних артерій у щушок призводить до відстроченої загибелі нейронів. Проте оклюзія тривалістю 2 хв, яка спричиняла зменшення вмісту високоенергетичних фосфатів і порушення синтезу білків у нервовій тканині, не

призводила до загибелі нейронів і тому була обрана як легкий ішемічний вплив. Одноразова 2-хвилинна ішемія за 1—2 дні до 5-хвилинної ішемії лише частково захищала від відстроченої загибелі нейронів. Проте дві 2-хвилинні ішемічні процедури з інтервалом 1 день за 2 дні до 5-хвилинної ішемії демонстрували повний захист від загибелі нейронів [15]. Це дослідження спричинило значний резонанс, тому що це був новий спосіб досягнення нейропротекції. Згодом отримані результати були підтверджені в багатьох дослідженнях на різних моделях [9, 21]. Результати наших досліджень з використанням інтервальних гіпоксичних тренувань для ПРК узгоджуються з даними інших авторів і підтверджують можливість використання нейропротекторної дії ІГТ при ішемічному ушкодженні.

Можна припустити, що нейропротекція, індукована ПРК, супроводжується суттєвими змінами у генній експресії, тобто є можливість стимулювати за допомогою ПРК генетичне репрограмування клітин, що сприятиме цитопротекції та їх виживанню. У відповідь на ішемічне ПРК не лише підвищується експресія генів, які забезпечують нейропротекцію і регенерацію, а й пригнічується активність генів, котрі призводять до дегенеративних змін унаслідок інсульту [22].

Виділяють дві фази ішемічної толерантності, яку спричиняють ПРК стимули. Рання (негайна) толерантність розвивається протягом декількох хвилин після попереднього впливу подразника і забезпечує короткотривалу (декілька годин) нейропротекцію, реалізується через посттрансляційні модифікації білків. Цей спосіб виникнення толерантності тканин до гіпоксії/ішемії нині успішно впроваджують у кардіохірургічній практиці, проте церебральне ПРК складно застосовувати в клінічній практиці через високоорганізовану структуру мозкової тканини та інші її особливості [1].

У класичному розумінні ПРК реалізується через пізню (відтерміновану) толерантність, для виникнення якої необхідно не менше доби, але триває вона, за різними даними, дні і тижні. При цьому нейропротекція забезпечується через зміни в експресії генів і синтезі білків *de novo* та має важливіше значення для повної відповіді на пошкоджувальну ішемію [22]. За даними експериментів, ПРК-стимул у вигляді епізоду нелетальної ішемії робить мозкову тканину чутливішою (а не стійкою) до подальшої тяжкої ішемії, якщо інтервал між епізодами занадто малий [7].

Феномен ПРК зумовлений існуванням ендогенної системи захисту тканин мозку від пошкодження. Ішемічне/гіпоксичне ПРК спричиняє перепрограмування транскрипції у відповідь на нього, що призводить до встановлення нейропротективного фенотипу, а не деструктивного запального як після інсульту [17]. Механізм церебрального ПРК залучає багато ланок та елементів регуляції клітини і є досить складним, потребує детальніших досліджень.

Існують три основних рівня передачі сигналу: сенсори/тригери (мембранні рецептори, іонні канали, редокс-чутливі ферменти), каскад внутрішньоклітинних медіаторів (вторинні месенджери, NO-синтаза, кінази, транскрипційні фактори) та ефектори (цитопротективні білки) [16, 19].

Перетворення адаптогенного сигналу на рівні геному здійснюється активованими ранніми генами та їх продуктами, серед яких провідну роль відіграють такі транскрипційні фактори, як фактор, індукований гіпоксією, сімейства HIF-1, цАМФ-зв'язувальний реактивний білок CREB та ядерний транскрипційний фактор NF-κB, які регулюють активацію генів пізньої дії. Саме вони під впливом гіпоксичного чи ішемічного ПРК активуються та впливають на свої пізні гени-мішені, продукти яких кооперативно залучаються в процеси пластичності та виживання нейронів при дії пошкоджувальних чинників. До таких проадаптивних білків належать: нейротрофіни, мітохондріальні та цитозольні антиоксиданти, антиапоптозні білки, білки теплового шоку, деякі гормони, іоно- і метаболічні глутаматні рецептори. Крім того, гіпоксичне/ішемічне ПРК може спричинити «перехресну» експресію транскрипційних чинників, що позитивно впливає на збереження нейронів у різних структурах мозку [7, 8, 12, 14].

Отримані нами результати узгоджуються з даними А. В. Чурилової зі співавт. [8], які використовували триразові епізоди помірної гіпоксії як ПРК, що значною мірою запобігало структурним пошкодженням, індукції відстроченого апоптозу, зменшувало поведінкові розлади, підвищувало здатність до навчання, які спостерігали в групі тварин з тяжкою гіпоксією. Поодинокий епізод гіпоксичного ПРК такого ефекту не показав.

*Конфлікту інтересів немає.*

*Усі наведені дані є результатами власних досліджень у рамках бюджету наукового плану Інституту фізіології імені О. О. Богомольця.*

*Участь авторів: концепція і дизайн дослідження — Т. К., І. О., Г. С.;*

*збір та обробка матеріалу — Т. К., І. О., Н. Ч.; статистичне опрацювання даних — Н. Ч.; написання тексту — Т. К., Н. Ч.; редагування — Г. С.*

Наведені дані дають підставу припустити, що ПРК у вигляді інтервальних гіпоксичних тренувань, як модель запуску ендогенної нейропротекції, ймовірно, активує зазначені вище механізми виживання нейронів. Цей вид ПРК цікавий тим, що його можна застосувати в майбутньому як неінвазивний метод індукції нейропротективного фенотипу в осіб групи ризику виникнення інсульту мозку. Метою дослідження ПРК є розробка нових терапевтичних засобів для допомоги хворим. З одного боку, ПРК є привабливою експериментальною стратегією для визначення ендогенних захисних чи регенераційних механізмів, які можуть бути індуковані або підтримані терапевтично, з другого — ПРК можна буде використовувати як терапевтичний захід, котрий спричиняє толерантність в індивідів з очікуваними ішемічними станами (пацієнти із субарахноїдальними крововиливами чи транзиторними ішемічними атаками) [1].

### Висновки

На підставі аналізу впливу гіпоксичного прекодионування на виживання нейронів в зоні СА1 гіпокампа в умовах експериментальної ішемії мозку можна зробити висновок, що застосування попереднього прекодионування збільшує на 28,5% кількість пірамідних нейронів, які виживають на 7-му добу після ішемії.

Під час імуногістохімічного аналізу впливу гіпоксичного прекодионування на постішемічну активацію макроглії спостерігали тенденцію до зменшення реактивного астрогліозу.

Збільшення кількості нейронів та зменшення постішемічної активації астроцитів свідчать про запуск тривалих ендогенних механізмів нейропротекції запропонованими режимами прекодионування.

### Література

1. Абусуева Б. А., Исмаил-Заде Е. Н., Камчатнов П. Р., Манышева К. Б. Ишемическое прекодиционирование — возможность применения в клинической неврологии // Практическая медицина. — 2017. — Т. 1, № 1 (102). — С. 20—27.
2. Галушко О. А. Сучасні рекомендації та українські реалії в інтенсивній терапії гострого ішемічного інсульту // Медицина неотложных состояний. — 2013. — № 7. — С. 88—95.
3. Коваленко Т. М., Осадченко І. О., Цупиков О. М. та ін. Нейропротекторний ефект кверцетину при експериментальній ішемії мозку // Фізіол. журн. — 2006. — Т. 52, № 5. — С. 21—27.
4. Міщенко Т. С. Епідеміологія цереброваскулярних захворювань і організація допомоги хворим з мозковим інсультом в Україні // Укр. вісн. психоневрол. — 2017. — Т. 25, № 1 (90). — С. 22—24.
5. Скибо Г. Г., Коваленко Т. М., Осадченко І. О. та ін. Структурні зміни в гіпокампі при експериментальній ішемії мозку // Укр. неврол. журн. — 2006. — Т. 4. — С. 38—44.
6. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. — М.: Мир, 1975. — 324 с.
7. Цейтлин А. М., Лубнин А. Ю., Зельман В. Л., Элиава Ш. Ш. Ишемическое прекодиционирование мозга // Международный конгресс «Сердце—мозг». Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2010. — № 3. — С. 11—22.
8. Чурилова А. В., Глущенко Т. С., Самойлов М. О. Изменения нейронного гиппокампа и неокортекса крыс под влиянием различных режимов гипобарической гипоксии // Морфология. — 2012. — Т. 141, № 1. — С. 7—11.
9. Шляхто Е. В., Баранцевич Е. Р., Щербак Н. С., Галагудза М. М. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Ч. 1 // Вестн. РАМН. — 2012. — № 67 (6). — С. 42—50.



10. Balduini W. et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats // *Brain Res.* — 2000. — N 859. — P. 318—325.
11. Bhuiyan M. I.H., Kim Y.J. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning // *Int Neurol* J. — 2010. — Vol. 14. — P. 203—212.
12. Cai Zh., Manalo D. J., Manalo G., Wei G. et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury // *Circulation.* — 2003. — Vol. 108, N 1. — P. 79—85.
13. Cassella C. R., Jagoda A. Ischemic stroke: advances in diagnosis and management // *Emerg. Med. Clin. North Am.* — 2017. — Vol. 35, N 4. — P. 911—930.
14. Guo Sh. et al. Hypoxic preconditioning improves spatial cognitive ability in mice // *Neurosignals.* — 2006. — Vol. 15, N 6. — P. 314—21. DOI: <http://doi.org/10.1159/000121368>.
15. Kitagawa K., Matsumoto M. et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain // *Brain Res.* — 1990. — Vol. 528. — P. 21—24.
16. Lee J. C., Tae J. C., Lee H. J. et al. Roles of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and NF- $\kappa$ B in Ischemic Preconditioning-Mediated Neuroprotection of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Against a Subsequent Transient Cerebral Ischemia // *Mol. Neurobiol.* — 2017. — Vol. 54, N 9. — P. 6984—6998.
17. McDonough A., Weinstein J.R. Correction to: Neuroimmune response in ischemic preconditioning // *Neurotherapeutics.* — 2017. — Vol. 15. — P. 511—524.
18. Murry C. E., Jennings R. B. et al. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* — 1986. — Vol. 74, N 5. — P. 1124—1136. DOI: <http://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124>.
19. Serebrovskaya T.V., Xi L. Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: Practical analysis on methods and equipment // *Exp. Biol. Med.* — 2016. — Vol. 241, N 15. — P. 1708—1723.
20. Stocchetti N., Taccone F. S., Citerio G. et al. Neuroprotection in acute brain injury: An up-to-date review // *Crit. Care* — 2015. — Vol. 19, N 1. — P. 1—11. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13054-015-0887-8>.
21. Stokfisz K., Ledakowicz-Polak A., Zagorski M., Zielinska M. Ischaemic preconditioning — Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience // *Adv. Med. Sci.* — 2017. — Vol. 62, N 2. — P. 307—316. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.advms.2016.11.006>.
22. Vijayakumar N. T., Sangwan A., Sharma B. et al. Cerebral ischemic preconditioning: the Road so far... // *Mol. Neurobiol.* — 2016. — Vol. 53, N 4. — P. 2579—2593. DOI: <http://doi.org/10.1007/s12035-015-9278-z>.

Т. Н. КОВАЛЕНКО, И. А. ОСАДЧЕНКО, Н. В. ЧАЙКА, Г. Г. СКИБО

Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев

## Влияние гипоксического прекондиционирования на чувствительность нейронов зоны СА1 гиппокампа при экспериментальной ишемии мозга

**Цель** — определить эффективность нейропротекторного влияния прекондиционирования (ПРК) на структуру СА1 зоны гиппокампа ишемизированных песчанок монгольских.

**Материалы и методы.** Исследование влияния ПРК проведено на самцах песчанок монгольских, которых распределили на четыре группы: 1 — контрольные (интактные) животные, 2 — группа животных, у которых моделировали ишемию мозга, 3 — группа животных с ПРК без ишемии, 4 — группа животных с ПРК + ишемия. Перед ишемическим воздействием проводили интервальные гипоксические тренировки (5 раз по 5 мин с 5-минутным интервалом ежедневно на протяжении 21 суток) с применением нормобарических гипоксических газовых смесей (10% O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>). Глобальную ишемию мозга моделировали путем окклюзии обеих общих сонных артерий на протяжении 5 мин. Забор ткани мозга проводили на 7-е сутки после окклюзии. На срезах гиппокампа определяли степень ишемического повреждения пирамидных нейронов и астроцитов в СА1 зоне с помощью световой микроскопии и иммуногистохимического метода.

**Результаты.** Структурный анализ показал, что в группе животных с ишемией на 7-е сутки после 5-минутной окклюзии сонных артерий в зоне СА1 гиппокампа был высокий уровень отсроченной гибели нейронов. В группе животных, подвергавшихся ПРК и ишемии, данная зона была структурно более сохранной. По данным иммуногистохимического исследования, хотя в группе ПРК + ишемия часть пирамидных нейронов погибла, количество выживших нейронов было значительно больше, чем в группе с ишемией. Кроме того, в группе ПРК + ишемия отмечена тенденция к уменьшению постишемической активации астроцитов, хотя их количество было больше, чем в контрольной группе.

**Выводы.** При анализе влияния гипоксического прекондиционирования на выживание нейронов в зоне СА1 гиппокампа выявлено большее (на 28,5%) количество пирамидных нейронов на 7-е сутки после ишемии по сравнению с группой ишемизированных животных. Увеличение количества выживших нейронов и уменьшение постишемической активации астроцитов свидетельствуют о запуске длительных эндогенных механизмов нейропротекции, инициированных прекондиционированием.

**Ключевые слова:** гиппокамп, гипоксическое прекондиционирование, глобальная ишемия мозга, нейроны, астроциты.

T. M. KOVALENKO, I. O. OSADCHENKO, N. V. CHAIKA, G. G. SKYBO

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv

## The effect of hypoxic preconditioning on the sensitivity of neurons of the hippocampal CA1 area in the experimental brain ischemia

**Objective** — to determine the neuroprotective effects of preconditioning (PC) on the structure of hippocampal CA1 area in ischemic Mongolian gerbils.

**Methods and subjects.** Study of PC effects was carried out on gerbil males which was divided into 4 groups: 1 — control animals, 2 — group of animals with brain ischemia, 3 — group of animals with PC without ischemia, 4 — group of animals with PC + ischemia. Before ischemia were used interval hypoxic trainings (5 times for 5 minutes at 5-minute intervals every day for 21 days) using normobaric hypoxic gas mixtures (10% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>). Global ischemia was modeled by occlusion of both carotid arteries. The brain tissue was taken 7 days after the occlusion. The thin sections of hippocampus were used for studying a degree of ischemic damage of pyramidal neurons and astrocytes in CA1 area with light microscopy and immunohistochemical methods.

**Results.** The structural analysis showed the high level of delayed neuronal death in hippocampal CA1 area on the seventh day after 5-minute occlusion in the ischemic group. In the group of animals with PC + ischemia the structural damage of this zone was less evident. Immunohistochemical analysis revealed that the number of survived neurons was significantly higher compared with the group with ischemia. In addition, there was a tendency to reduction of astrocyte's post-ischemic activation in the PC + ischemia group, although the number of astrocytes was higher than in the control group.

**Conclusions.** Analysing the effects of hypoxic PC in the hippocampal CA1 area under cerebral ischemia it was found the increasing of the quantity of survived pyramidal neurons on the seventh day after ischemia. The number of these neurons was 28.5% higher compared with ischemia group. The increase in the number of survived neurons and the reduction of postischemic activation of astrocytes demonstrate the initiation of long-term endogenous mechanisms of neuroprotection by preconditioning.

**Key words:** hippocampus, hypoxic preconditioning, global brain ischemia, neurons, astrocytes.