

УДК 616.831.31-005.4.-092.913:618.33

DOI 10.63874/2218-0311-2025-1-25-32

**Елизавета Игоревна Бонь¹, Наталия Евгеньевна Максимович²,
Ольга Анатольевна Карнюшко³, Сергей Михайлович Зиматкин⁴,
Никита Витальевич Кохан⁵**

¹канд. биол. наук, доц. доц. каф. патологической физиологии имени Д. А. Маслакова
Гродненского государственного медицинского университета

²д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии им. Д. А. Маслакова
Гродненского государственного медицинского университета

³канд. биол. наук, доц. доц. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии
Гродненского государственного медицинского университета

⁴д-р биол. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии
Гродненского государственного медицинского университета

⁵студент 6-го курса медико-психологического факультета
Гродненского государственного медицинского университета

Elizaveta Bon¹, Nataliya Maksimovich², Olga Karnyushko³, Sergey Zimatkin⁴, Nikita Kokhan⁵

¹PhD in Biology, Associate Professor; ²Doctor of Medical Sciences, Professor;

³PhD in Biology, Associate Professor; ⁴Doctor of Biological Sciences;

⁵Student of the Faculty of Mental Health Medicine

e-mail: asphodela@list.ru¹; mne@grsmu.by²; karnyushko-olga@mail.ru³;

smzimatin@mail.ru⁴; nikita.kokhan1@gmail.com⁵

СОДЕРЖАНИЕ ГИПОКСИЕЙ ИНДУЦИРОВАННОГО ФАКТОРА В НЕЙРОНАХ ТЕМЕННОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА КРЫС С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Церебральная ишемия, включая инсульты, является одной из ведущих причин инвалидности и смерти в мире. Несмотря на достижения в медицине, многие случаи церебральной ишемии остаются недиагностированными или неправильно диагностированными. Это подчеркивает необходимость изучения механизмов, связанных с гипоксией и разработки новых терапевтических подходов для лечения инсультов и других заболеваний, связанных с недостатком кровоснабжения. Адаптация к условиям ишемии представлена повышением выработки в нейронах головного мозга индуцированного фактора 1-α. Его экспрессия повышается при уменьшении в крови количества кислорода. В настоящей работе оценено содержание гипоксией индуцированного фактора в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс с церебральной ишемией различной степени тяжести.

Ключевые слова: гиппокамп, ишемия, теменная кора, гипоксией индуцированный фактор 1-α.

Hypoxia-induced Factor Content in Neurons of the Parietal Cortex and Hippocampus of Rats with Cerebral Ischemia of Various Severity

Cerebral ischemia, including strokes, is one of the leading causes of disability and death in the world. Despite advances in medicine, many cases of cerebral ischemia remain undiagnosed or misdiagnosed. This highlights the need to study the mechanisms associated with hypoxia and develop new therapeutic approaches for the treatment of strokes and other diseases associated with insufficient blood supply. Adaptation to ischemic conditions is represented by an increase in the production of induced factor 1-α in neurons of the brain. Its expression increases with a decrease in the amount of oxygen in the blood. In this study, the content of hypoxia-induced factor 1-α in neurons of the parietal cortex and hippocampus of rats with cerebral ischemia of varying severity was assessed.

Key words: hippocampus, ischemia, parietal cortex, hypoxia-induced factor 1-α.

Введение

Вопросы повышения резистентности организма к недостатку кислорода и энергодефициту являются актуальными, т. к. гипоксия как типовой патологический процесс в той или иной мере инициирует развитие и сопутствует течению всех видов патоло-

гии, приводя к функциональным, а затем структурным изменениям в органах и тканях в результате снижения внутриклеточного напряжения кислорода [1; 3; 5; 6].

В последние годы изучены фундаментальные механизмы развития гипоксии различного генеза и индуцируемых ею метаболических и функциональных нарушений на уровне клетки и субклеточных структур. Выявлен ряд морфофункциональных структур, принимающих непосредственное участие в развитии срочной и долговременной адаптации организма к гипоксии. Эти структуры могут выступать специфическими мишенями для воздействия фармакологических агентов с целью регуляции процессов адаптации организма к гипоксии, что открывает перспективные возможности поиска и разработки новых эффективных лекарственных средств с антигипоксическим действием [6–8; 11].

Важная роль в адаптации организма к гипоксии принадлежит специфическому регуляторному белку – гипоксией индуцированному фактору (HIF, сокр. от англ. *Hypoxia-inducible factors*), экспрессия которого увеличивается при уменьшении напряжения кислорода в крови [7–9].

Показано, что HIF играет важную роль в системном ответе организма на гипоксию, образуется во многих тканях организма, в т. ч. в нервной ткани, где его экспрессия максимальна в нейронах [10–15].

Цель – оценить содержание гипоксией индуцированного фактора в нейронах теменной коры и гиппокампа крыс с церебральной ишемией различной степени тяжести.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 24 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей.

Моделирование церебральной ишемии осуществляли в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг).

В исследованиях использованы модели частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ), субтотальной (СИГМ) и тотальной (ТИГМ) ишемии головного мозга [2].

Частичную ишемию головного мозга (ЧИГМ) моделировали путем перевязки одной общей сонной артерии (ОСА) справа.

Ступенчатую субтотальную ИГМ (ССИГМ) осуществляли путем перевязки обеих ОСА с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3 суток (подгруппа 2) или 1 сутки (подгруппа 3).

Субтотальную ишемию головного мозга (СИГМ) моделировали путем одномоментной перевязки обеих ОСА.

Тотальную ишемию головного мозга (ТИГМ) моделировали путем декапитации животных.

Забор головного мозга осуществляли спустя 1 ч после операции.

После декапитации у крыс быстро извлекали головной мозг, кусочки коры больших полушарий фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °C (на ночь), затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы, монтировали на предметные стекла. Препараты обрабатывали согласно протоколу иммуноцитохимической реакции для световой микроскопии, исключаяющей процедуру теплового демаскирования антигенов. Для определения иммунореактивности молекулярного маркера HIF применяли первичные поликлональные мышиные антитела Anti-HIF1A antibody фирмы Elabscience (Китай, Catalog No. E-AB-66968) в разведении 1 : 500 при +4 °C, экспозиция 20 ч, во влажной камере [4]. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB

detection IHC kit Abcam (Великобритания, ab. 80436). Содержание HIF оценивали в цитоплазме нейронов пятого слоя теменной коры и нейронов поля СА₁ гиппокампа в иммуногистохимических препаратах на основе величины оптической плотности осадка хромогена с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы головного мозга от сравниваемых контрольной и опытных групп животных изучали в одинаковых условиях.

В результате исследований получены количественные непрерывные данные. Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ (тест Крускаллы – Уоллиса с поправкой Бонферони).

Результаты и их обсуждение

У крыс с ЧИГМ не было выявлено изменения содержания HIF по отношению к уровню в контрольной группе ($p > 0,05$) (таблица 1, рисунки 1, 2).

Таблица 1 – Содержание HIF (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры и поля СА₁ гиппокампа головного мозга крыс ишемией головного мозга различной степени тяжести, Me (LQ; UQ)

Группы		Теменная кора	Гиппокамп
Контроль		0,18 (0,17; 0,19)	0,18 (0,16; 0,19)
ЧИГМ		0,18 (0,16; 0,20)	0,17 (0,16; 0,19)
ССИГМ	1-я подгруппа	0,24 (0,24; 0,25)*	0,23 (0,22; 0,26)*
	2-я подгруппа	0,14 (0,12; 0,16)*	0,16 (0,15; 0,17)
	3-я подгруппа	0,14 (0,11; 0,14)*	0,14 (0,13; 0,15)*
СИГМ		0,12 (0,06; 0,16)*	0,13 (0,09; 0,14)*
ТИГМ		0,03 (0,02; 0,05)*	0,10 (0,09; 0,11)*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль»; ЧИГМ – частичная ишемия головного мозга; ССИГМ – субтотальная ступенчатая ишемия головного мозга; СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ТИГМ – тотальная ишемия головного мозга.

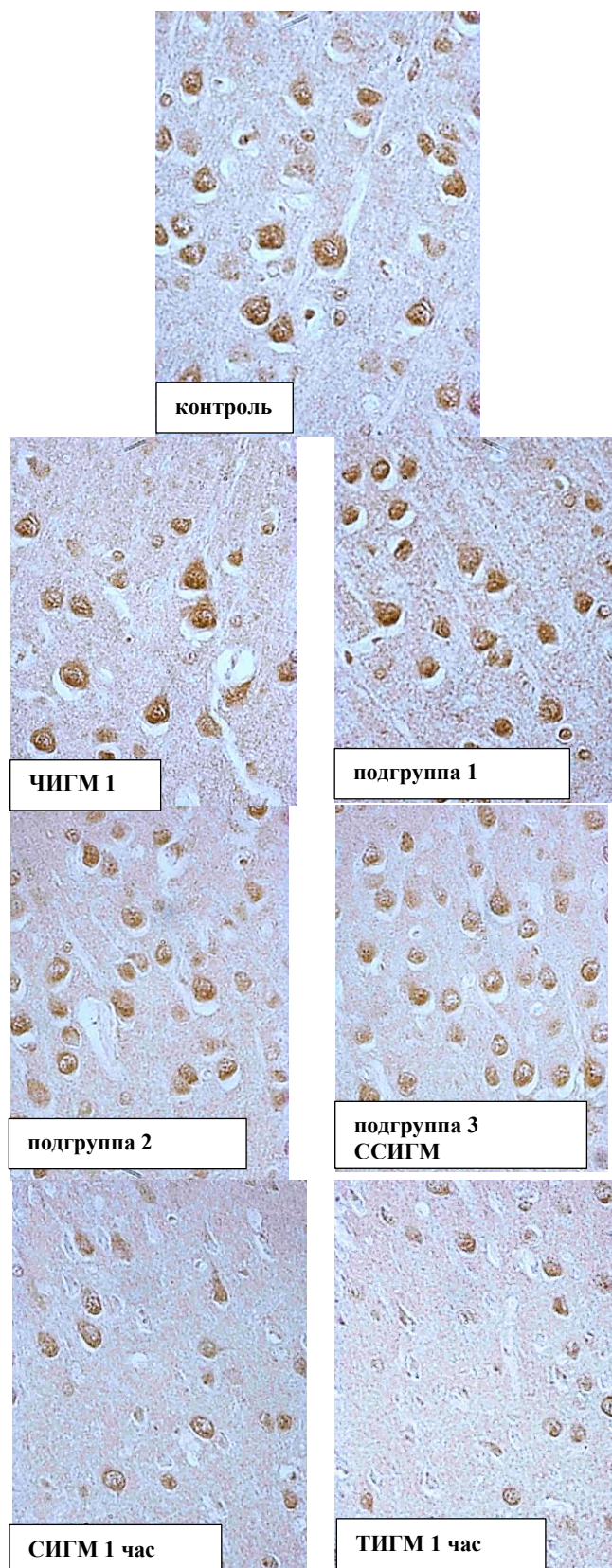


Рисунок 1 – Содержание НІФ (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов теменной коры крыс с частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ), субтотальной (СИГМ) и тотальной (ТИГМ) ишемией головного мозга. Увеличение x400

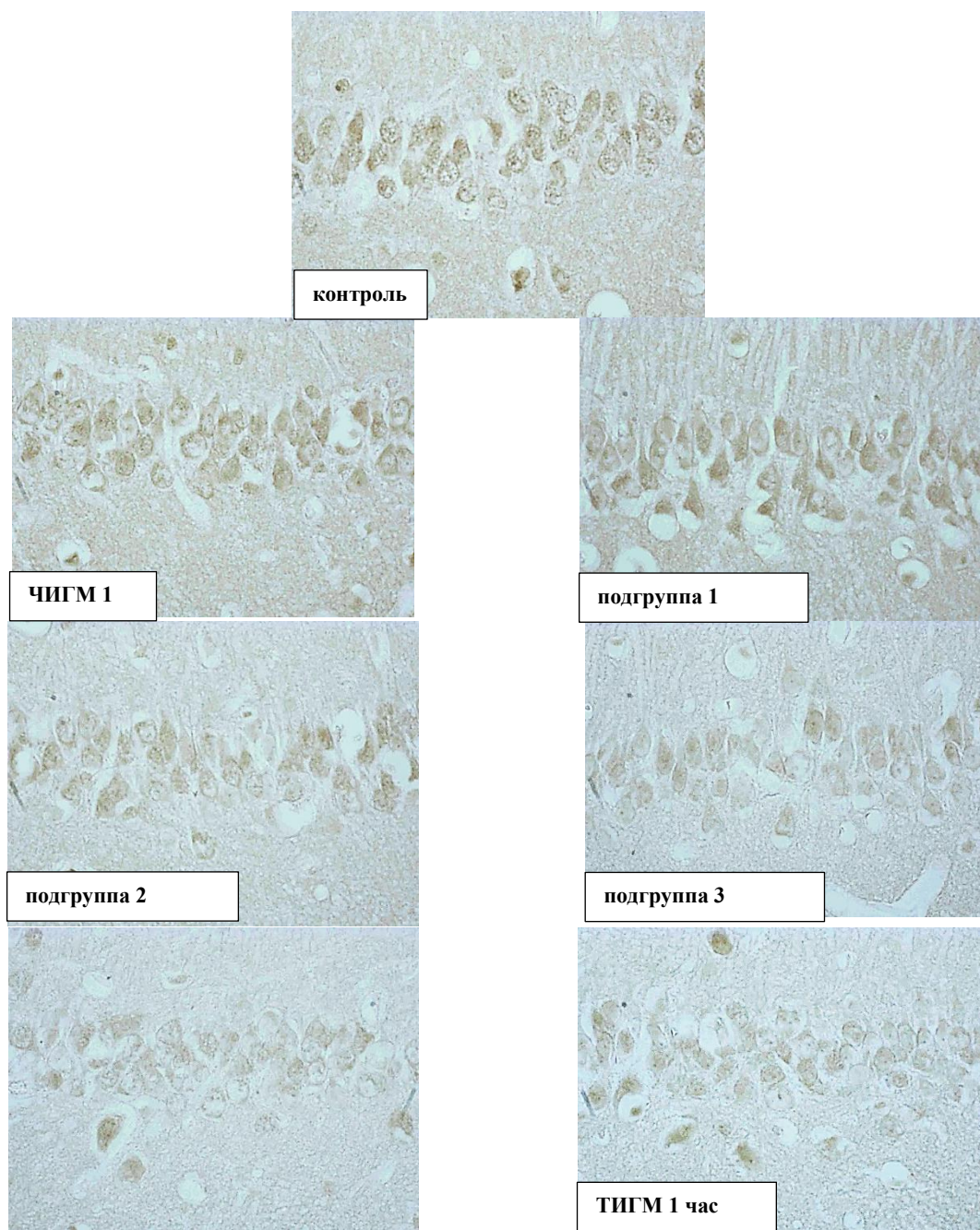


Рисунок 2 – Содержание НІФ (в единицах оптической плотности) в цитоплазме пирамидных нейронов поля СА₁ гиппокампа крыс с частичной (ЧИГМ), ступенчатой субтотальной (ССИГМ), субтотальной (СИГМ) и тотальной (ТИГМ) ишемией головного мозга. Цифровая микрофотография. Увеличение x400

По сравнению с группой «контроль», в 1-й подгруппе ССИГМ (промежуток между перевязками обеих ОСА 7 суток), происходило увеличение содержания НІФ на 25 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 22 % – в гиппокампе ($p < 0,05$), во 2-й подгруппе ССИГМ (промежуток между перевязками 3 суток) содержание НІФ уменьшилось – на 22 % в теменной коре ($p < 0,05$), а в гиппокампе не изменилось ($p > 0,05$). В 3-й подгруппе отмечалось снижение содержания НІФ – на 22 % как в теменной коре ($p < 0,05$), так и в гиппокампе ($p < 0,05$).

В 3-й подгруппе ССИГМ (интервал между перевязками ОСА 1 сутки) содержание НІФ было меньше, по сравнению с 1-й подгруппой на 42 % – в теменной коре ($p < 0,05$) и на 39 % – в гиппокампе ($p < 0,05$), а по сравнению со 2-й подгруппой различий не было ни в одном из изучаемых отделов ($p > 0,05$).

Таким образом, в 1-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками 7 суток наблюдалось увеличение содержания НІФ, в то время как во 2-й и 3-й подгруппах отмечалось снижение данного показателя.

По сравнению с контролем в группе СИГМ, моделируемой путем одномоментной перевязки обеих ОСА, содержание НІФ уменьшилось на 33 % в теменной коре ($p < 0,05$) и на 28 % – в гиппокампе ($p < 0,05$) и не имело отличий от содержания НІФ во 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ.

При тотальной церебральной ишемии отмечено наиболее значимое уменьшение содержания НІФ, по сравнению с контролем – на 83 % в теменной коре, $p < 0,05$ и на 44 % в гиппокампе, $p < 0,05$.

Таким образом, изменения содержания НІФ в 1-й, 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ были разнонаправленными: в 1-й подгруппе с максимальным интервалом между перевязками ОСА 7 суток оно увеличивалось, свидетельствуя о достаточном времени (7 суток) для активации механизмов компенсации при гипоксии путем повышения экспрессии генов, которые обеспечивают адаптацию клетки к гипоксии и стимулируют эритропоэз (гены эритропоэтина), ангиогенез (ген фактора роста эндотелия сосудов), ферменты гликолиза (ген альдолазы, лактатдегидрогеназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы и пр.). Кроме того, НІФ регулирует экспрессию генов, участвующих в обмене железа, регуляции сосудистого тонуса, клеточной пролиферации, апоптозе, липогенезе, развитии В-лимфоцитов и др. [7–15], в то время как по мере сокращения временного интервала между перевязками ОСА его содержание снижалось, указывая на недостаточное включение механизмов компенсации при более тяжелых формах ИГМ.

Содержание НІФ в 1-й подгруппе ССИГМ (интервал между перевязками ОСА 7 суток) превосходило значение показателей в группе «ЧИГМ» и «контроль», в то время как в 3-й подгруппе ССИГМ с минимальным интервалом между перевязками ОСА 1 сутки в большей степени было близко к значениям содержания белка в группе «СИГМ», моделируемой путем одномоментной перевязки обеих ОСА, что свидетельствует о более выраженном нарушении антигипоксической защиты. Наиболее выраженное снижение НІФ отмечалось при тотальной ишемии головного мозга как отражение деградации белка.

Кроме того, гипоксией индуцированный фактор ответственен за формирование долговременной адаптации к гипоксии, в связи с чем является подходящей мишенью для фармакологического воздействия [9; 10]. Поиск лекарственных веществ, выступающих в роли индукторов или ингибиторов его синтеза является актуальным направлением в экспериментальной фармакологии, поскольку позволяет не только регулировать процессы адаптации к гипоксии, но и более эффективно лечить цереброваскулярные, сердечно-сосудистые, онкологические и другие заболевания, в генезе которых ведущую роль играет кислородная недостаточность.

Заключение

Таким образом, наиболее значительные изменения произошли при тотальной ишемии (ТИГМ), при частичной (ЧИГМ) не изменялись, а при субтотальной ступенчатой ишемии (ССИГМ) 7 суток даже превысил контрольный уровень.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Беленичев, И. Ф. Нейропротекция и нейропластичность: монография. / И. Ф. Беленичев // «Полиграф плюс». – 2014. – 512 с.
2. Бонь, Е. И. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Биомедицина. – 2018. – № 2. – 59–71 с.
3. Бонь, Е. И. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // Оренбургский медицинский вестник. – 2021. – № 2. – 29–36 с.
4. Коржевский, Д. Э. Иммуногистохимическое исследование головного мозга / Д.Э. Коржевский, Е.Г. Гилерович, О.В. Кирик // Санкт-Петербург: СпецЛит. – 2016. – 143 с.
5. Максимович, Н. Е. Головной мозг крысы и его реакция на ишемию: монография. / Н. Е. Максимович, Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Гродно: ГрГМУ. – 2020. – 240 с.
6. Clemens, J. A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants / J.A. Clemens // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – V. 28. – 1526–1531 p.
7. Maksimovich, N. Ye. The role of hypoxia-induced factor in cell metabolism / N. Ye. Maksimovich, E.I. Bon, I. K. Dremza // Clinical Reviews and Case Reports. – Vol. 2, № 1. – P. 1–5.
8. Hypoxia of the brain and mechanisms of its development / E.I. Bon [et al.] // J. Clinical Research and Reports. – Vol. 13, № 14. – 1–5 p.
9. Aquaporin 4 in Traumatic Brain Injury: From Molecular Pathways to Therapeutic Target / E. Dadgostar [et al.] // Neurochem Res. – 2022. – 860–871 c.
10. Vatte, S HIF-1, an important regulator in potential new therapeutic approaches to ischemic stroke / S. Vatte, R. Ugale // Neurochem Int. – 2023. – 5605 c.
11. Dexmedetomidine ameliorates acute brain injury induced by myocardial ischemia-reperfusion via upregulating the HIF-1 pathway / X. Yang [et al.] // Shock. – 2023. – 83 c.
12. HIF-1: structure, biology and natural modulators / C. Yang [et al.] // Chin J Nat Med. – 2021. – 521–527 c.
13. Cardamonin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the HIF-1 α /VEGFA pathway / H. Ni [et al.] // Phytother Res. – 2022. – 404 c.
14. Li, G Effects of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Signaling Pathway on Acute Ischemic Stroke / G. Li, L. Tao, H. Wu // Comput Math Methods Med. – 2022. – 6786 c.
15. Pericyte, but not astrocyte, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) drives hypoxia-induced vascular permeability in vivo / J. Baumann [et al.] // Fluids Barriers CNS. – 2022. – 6 c.

REFERENCES

1. Belenichev, I. F. Neuroprotection and neuroplasticity: monograph. / I. F. Belenichev // «Polygraph plus». – 2014. – 512 p.
2. Bon, E. I. Modeling methods and morphofunctional markers of cerebral ischemia / E. I. Bon, N. E. Maksimovich // Biomedicine. – 2018. – No. 2. – 59–71 p.
3. Bon, E. I. Comparative analysis of morphological disorders of neurons in the parietal cortex and hippocampus of rats with various types of experimental cerebral ischemia / E. I. Bon, N. E. Maksimovich // Orenburg Medical Bulletin. – 2021. – No. 2. – 29–36 p.
4. Korzhevsky, D. E. Immunohistochemical study of the brain / D. E. Korzhevsky, E. G. Gilerovich, O. V. Kirik // St. Petersburg: SpetsLit. – 2016. – 143 p.

5. Maksimovich, N. E. The rat brain and its response to ischemia: monograph. / N. E. Maksimovich, E. I. Bon, S. M. Zimatkin // Grodno: Grodno State Medical University. – 2020. – 240 p.
6. Clemens, J.A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants / J.A. Clemens // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – V. 28. – 1526–1531 p.
7. Maksimovich, N.Ye. The role of hypoxia-induced factor in cell metabolism / N. Ye. Maksimovich, E.I. Bon, I. K. Dremza // Clinical Reviews and Case Reports. – Vol. 2, No. 1. – R. 1-5.
8. Hypoxia of the brain and mechanisms of its development / E. I. Bon [et al.] // J. Clinical Research and Reports. – Vol. 13, No. 14. – 1–5 p.m.
9. Aquaporin 4 in Traumatic Brain Injury: From Molecular Pathways to Therapeutic Target / E. Dadgostar [et al.] // Neurochem Res. – 2022. – 860–871 p.
10. Vatte, S HIF-1, an important regulator in potential new therapeutic approaches to ischemic stroke / S. Vatte, R. Ugale // Neurochem Int. – 2023. – 5605 p.
11. Dexmedetomidine ameliorates acute brain injury induced by myocardial ischemia-reperfusion via upregulating the HIF-1 pathway / X. Yang [et al.] // Shock. – 2023. – 83 p.
12. HIF-1: structure, biology and natural modulators / C. Yang [et al.] // Chin J Nat Med. – 2021. – 521–527 p.
13. Cardamonin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the HIF-1 α /VEGFA pathway / H. Ni [et al.] // Phytother Res. – 2022. – 404c.
14. Li, G Effects of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Signaling Pathway on Acute Ischemic Stroke / G. Li, L. Tao, H. Wu // Comput Math Methods Med. – 2022. – 6786 c.
15. Pericyte, but not astrocyte, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) drives hypoxia-induced vascular permeability in vivo / J. Baumann [et al.] // Fluids Barriers CNS. – 2022. – 6 c.

Рукапіс паступіў у рэдакцыю 08.04.2025