

© Коллектив авторов, 2018
УДК 611.813.3:531.5:599.323.4

Д. С. Медников¹, А. В. Смирнов^{1,3}, М. В. Шмидт^{1,3}, И. Н. Тюренков²,
Д. В. Куркин², Д. А. Бакулин², Е. В. Волотова²

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ СЕРИНОВОЙ РАЦЕМАЗЫ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ГРАВИТАЦИОННЫХ ПЕРЕГРУЗОК

¹ Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. А. В. Смирнов), ² кафедра фармакологии и биофармации (зав. — чл.-кор. РАН проф. И. Н. Тюренков), факультет усовершенствования врачей, ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»; ³ лаборатория иммуногистохимии и канцерогенеза (зав. — проф. А. В. Смирнов), ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Цель — исследование морфометрических параметров и уровня экспрессии сериновой рацемазы в гиппокампе крыс при многократных гравитационных перегрузках в каудокраниальном направлении (-9 Gz).

Материалы и методы. 12-месячные крысы подвергались воздействию силой 9 G в течение 5 мин дважды в день с интервалом 12 ч на протяжении 28 сут — 2-я группа (гравитационное воздействие, $n=10$). Крысы без воздействия гипергравитации — 1-я группа (контроль, $n=10$). Подсчитывали морфометрически средние площади ядер и перикарионов пирамидных нейронов, удельное количество нейронов с признаками повреждения, относительные площади перикарионов пирамидных нейронов и нейропила. Иммуногистохимически исследовали уровень экспрессии сериновой рацемазы во всех зонах гиппокампа.

Результаты. Обнаружены признаки нарушения кровообращения в микроциркуляторном отделе в виде спонгиоза, утолщения стенок капилляров, диапедеза эритроцитов. Во всех зонах гиппокампа экспериментальных крыс показано резкое увеличение числа пирамидных нейронов с признаками повреждения. Выявлены атрофические изменения, заключающиеся в снижении средней и относительной площадей перикарионов нейронов. При иммуногистохимическом исследовании обнаружено усиление экспрессии сериновой рацемазы в поле CA1, а также транслокация иммунореактивного материала в отростки пирамидных нейронов. В полях CA3 и CA4 обнаружена тенденция к снижению содержания сериновой рацемазы.

Выводы. При длительном гравитационном воздействии в каудокраниальном направлении во всех полях гиппокампа крыс наблюдаются признаки выраженного повреждения в сочетании с усиленной экспрессией и накоплением сериновой рацемазы в дендритах пирамидных нейронов поля CA1, что может свидетельствовать об участии эксайтотоксичности в механизмах вторичного повреждения в данной зоне.

Ключевые слова: гиппокамп, гравитационное воздействие, сериновая рацемазы, крыса

Научно-технический прогресс ставит задачу разработки методов адаптации организма к экстремальным факторам, среди которых особое место занимает гравитационное воздействие. Неблагоприятные эффекты, оказываемые перегрузками, связаны с гемодинамическими изменениями. Их выраженность зависит, главным образом, от направления ускорения, его силы, длительности, а также от градиента нарастания [5, 10, 14]. Сложность систематизации накопленных данных связана с различиями в моделировании гравитационных воздействий. Так, в зависимости от величины ускорений и скорости нарастания перегрузки в краниокаудальном направлении ($+Gz$) могут оказывать как положительное, так и отри-

цательное действие [1, 7, 14]. Отрицательными эффектами характеризуются многократно повторяющиеся длительные $+Gz$ -воздействия. На их основе предложена модель тотальной ишемии головного мозга [2]. Продольные перегрузки в каудокраниальном направлении ($-Gz$) могут вызвать более существенное повреждение головного мозга в связи с тем, что защитные приспособительные механизмы при данном типе воздействий гораздо менее эффективны [1, 4]. Однако работы, посвященные изучению морфофункциональных изменений при $-Gz$ -воздействиях, до сегодняшнего времени остаются единичными.

Срыв вазомоторных компенсаторных возможностей при $-Gz$ -перегрузках приводит к уси-

Сведения об авторах:

Медников Дмитрий Сергеевич (e-mail: mednikov1988@gmail.com), кафедра патологической анатомии,

Тюренков Иван Николаевич (e-mail: fibfuv@mail.ru), Куркин Денис Владимирович (e-mail: strannik986@mail.ru),

Бакулин Дмитрий Александрович (e-mail: fibfuv@mail.ru), Волотова Елена Владимировна (e-mail: evv.md.@yandex.ru), кафедра фармакологии и биофармации, ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

Смирнов Алексей Владимирович (e-mail: alexey-smirnov@rambler.ru), Шмидт Максим Вячеславович (e-mail: schmidtmed@mail.ru),

лаборатория иммуногистохимии и канцерогенеза, ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», 400131, г. Волгоград, ул. Рокоссовского, 1Г

ленному притоку, затруднению венозного оттока и подъему давления в церебральных артериях с повреждением гематоэнцефалического барьера и развитием вазогенного отека [1, 4]. При нарушениях мозгового кровообращения одной из наиболее уязвимых структур головного мозга является гиппокамп, принимающий участие в формировании и регуляции когнитивных функций, механизмах пространственного ориентирования, обучения и памяти [3]. Комплексное изучение морфологических изменений, возникающих в гиппокампе при воздействии перегрузок, необходимо для более полного понимания закономерностей процессов повреждения, адаптации и репарации. Перспективным направлением в изучении механизмов повреждения при $-Gz$ -перегрузках является исследование феномена эксайтотоксичности. Эксайтотоксичность является универсальным механизмом вторичного повреждения. Она вовлечена в развитие многих патологических процессов и связана с избыточным действием или нарушенным обратным захватом возбуждающих нейротрансмиттеров [11]. Одним из наиболее значимых медиаторов в ЦНС является глутамат [8, 15]. В условиях ишемии, при травмах и нарастающем отеке головного мозга глутамат оказывает избыточное постсинаптическое влияние на NMDA-рецепторы [8, 9]. Последующие за гиперактивацией NMDA-рецепторов изменения приводят к сдвигам внутриклеточного гомеостаза и развитию внутриклеточного ацидоза, увеличению содержания свободного кальция в цитозоле и образованию свободных радикалов. Известно о роли глутаматного повреждения в активации NO-синтаз [9, 12]. D-серин выступает в роли ко-агониста NMDA-рецепторов и в нормальных условиях вовлечен в процессы обучения и памяти [3, 15]. Однако во многих исследованиях предполагается его роль в глутаматном повреждении при ряде заболеваний и травмах ЦНС [9]. Образование D-серина в нейронах и глиальных клетках происходит с участием фермента сериновой рацемазы (SR) из L-серина [3, 8]. Увеличение содержания SR и продукта его ферментативной реакции D-серина, по данным ряда авторов, опосредуют эксайтотоксическое повреждение путем связывания D-серина в глицин-связывающем сайте NMDA-рецептора, увеличивая таким образом его сродство к глутамату [6, 9]. Целью настоящего исследования было изучение структурных изменений и особенностей экспрессии сериновой рацемазы в гиппокампе крыс при многократном воздействии перегрузок в каудокраниальном векторе.

Материал и методы. Исследование проведено на половозрелых крысах линии Вистар (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область, РФ, карантин 2 нед). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». При проведении экспериментов учитывали требования комиссии по проблеме этики отношения к животным Российского национального комитета по биоэтике при РАН; и этические нормы, признанные мировым сообществом и изложенные в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». Гравитационные перегрузки моделировали на бодрствующих 12-месячных крысах со среднеактивным типом поведения. Крыс помещали в пеналы, размещенные по краям горизонтальной штанги центрифуги в строго каудокраниальном направлении и подвергали воздействию величиной 9 G в течение 5 мин дважды в день с интервалом 12 ч на протяжении 28 сут (2-я группа, гравитационное воздействие, $n=10$). 1-ю группу составили крысы того же возраста без гравитационного воздействия (контроль, $n=10$). Сила и продолжительность воздействия были выбраны после серии предварительных экспериментов по совокупности возникающих изменений (летальность, поведенческие, двигательные и когнитивные нарушения, отек головного мозга). Функциональное состояние нервной системы оценивали непосредственно после воздействия с помощью теста McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной. Оценку поведенческих и когнитивных функций проводили через 1 ч после гравитационного воздействия с применением тестов «открытое поле» (ОП), «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ), «экстраполяционное избегание» (ТЭИ), «радиальный восьмилучевой лабиринт». Однократное воздействие -9 Gz сопровождалось развитием поведенческих и когнитивных расстройств, однако при отсутствии повторных воздействий наблюдалось их постепенное затухание. 28-суточное -9 Gz-воздействие приводило к постепенному снижению двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных в тесте «Открытое поле», появлению признаков стойкой ретроградной амнезии, выражающихся в увеличении латентного периода первого захода и количестве заходов в темную камеру установки УРПИ, и латентного периода подныривания в тесте ТЭИ, также были отмечены когнитивные нарушения, проявляющиеся в ухудшении процессов кратковременной и долговременной памяти в тесте радиального восьмилучевого лабиринта. Неврологический дефицит после гравитационного воздействия также постепенно нарастал, его симптомы с увеличением общего времени воздействия на животных прогрессировали, что выражалось в увеличении балла неврологического дефицита к 28-м суткам эксперимента. На 29-е сутки животных выводили из эксперимента с применением в качестве наркоза хлоралгидрата (400 мг/кг, интраперитонеально), декапитировали, получали образцы головного мозга, фиксировали в 10% забуференном формалине. Фронтальные парафиновые срезы головного мозга крыс изучали на уровне от $-4,56$ до $-6,12$ относительно брегмы [11]. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином — эозином, тионином по методу Ниссля. Исследование микропрепаратов проводили с помощью микроскопа «Axio Lab. A1», фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color» (все приборы — Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). В нейронах пирамидного слоя определяли средние площа-

ди перикарионов ($S_{\text{пер}}$), ядер ($S_{\text{я}}$), относительную площадь перикарионов ($ОП_{\text{пер}}$), а также нейропиля ($ОП_{\text{ц}}$). 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 (ИГХ) исследование проводили непрямым иммунопероксидазным методом с применением моноклональных антител к СР (инкубация 1 ч, 1:50, Santa Cruz, Biotechnology, Inc.) с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, США), в качестве хромогена использовали диаминобензидин (DAB). Оценку уровня экспрессии проводили путем подсчета относительной площади (ОП) иммунопозитивного материала (ИПМ), а также интенсивности экспрессии в соответствии с 4-балльной адаптированной шкалой Allred (0 — отсутствие реакции, 1 — слабая интенсивность, 2 — умеренная интенсивность, 3 — значительно выраженная интенсивность) 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 пакетов программ MS Office Excel 2007 (Microsoft Inc., США), Statistica 6.0 (StatSoft, США). Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала [Q1; Q3], где Q1 — 25-й процентиль, Q3 — 75-й процентиль. Значимость различий между группами оценивали по критерию Манна—Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. При гистологическом исследовании поля СА1 гиппокампа у животных 2-й группы (подвергнутых перегрузке -9 Gz) в пирамидном слое обнаружено резкое увеличение числа нейронов с признаками повреждения. Пирамидные нейроны приобретали веретеновидную форму перикариона, отмечалась гиперхромия ядер и цитоплазмы. Нарушение citoархитектоники поля СА1 проявлялось менее компактным расположением пирамидных нейронов, возникающим по причине перичеселлюлярного и периваскулярного отека (рис. 1, б), а также приобретения отростками нейронов усиленной извитости. Менее плотное расположение тел нейронов в пирамидном слое и признаки повреждения, выявляемые визуально, подтверждались и морфометрическим методом: $ОП_{\text{пер}}$ нейронов пирамидного слоя СА1 в экспериментальной группе снижалась на 20,6% ($p < 0,01$), а удельное количество

(УК) нейронов с признаками повреждения увеличилось на 59,7% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (таблица). Морфометрическое исследование выявило незначимое увеличение $S_{\text{пер}}$ пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа во 2-й группе на 2,9% ($p > 0,05$). В то же время, отмечалось уменьшение $S_{\text{я}}$ во 2-й группе на 16,3% ($p < 0,05$) по сравнению с таковой в группе контроля.

При ИГХ-исследовании с использованием антител к СР в контрольной группе преобладала цитоплазматическая экспрессия с интенсивностью в 2 балла, в отдельных нейронах выявлялась экспрессия, достигающая 3 баллов. В группе крыс с гравитационными перегрузками экспрессия сменялась на выраженную 3 баллами. Особенностью экспрессии СР в экспериментальной группе являлась транслокация ИПМ, который определялся не только в цитоплазме перикарионов, но и в отростках пирамидных нейронов (рис. 2, б). Кроме того, участки экспрессии с интенсивностью преимущественно в 2 балла имелись и в глиоцитах молекулярного и полиморфного слоев. При морфометрическом исследовании определялось увеличение $ОП_{\text{ипм}}$ в пирамидном слое на 5,5% по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (см. таблицу).

Для поля СА2 гиппокампа крыс 2-й группы были характерны схожие с полем СА1 признаки нарушения кровообращения, проявляющиеся, прежде всего, резким отеком, стазами эритроцитов, полнокровием, а также плазматическим пропитыванием стенок сосудов микроциркуляторного русла. Поле СА2 характеризовалось максимальным увеличением числа нейронов с признаками повреждения на 68% ($p < 0,001$), снижением $ОП_{\text{пер}}$ нейронов пирамидного слоя на 14% по сравнению с контролем ($p < 0,01$), обнаружено уменьшение $S_{\text{пер}}$ на 36,5% ($p < 0,001$). $S_{\text{я}}$ нейронов пирамидного слоя у животных, подвергавшихся перегрузке -9 Gz , уменьшилась на 39,7% по сравнению с контролем ($p < 0,001$). При ИГХ-исследовании СР в поле СА2 не обнаружено значимых отличий $ОП_{\text{ипм}}$ от таковой в контрольной группе. При этом ИПМ визуализировался

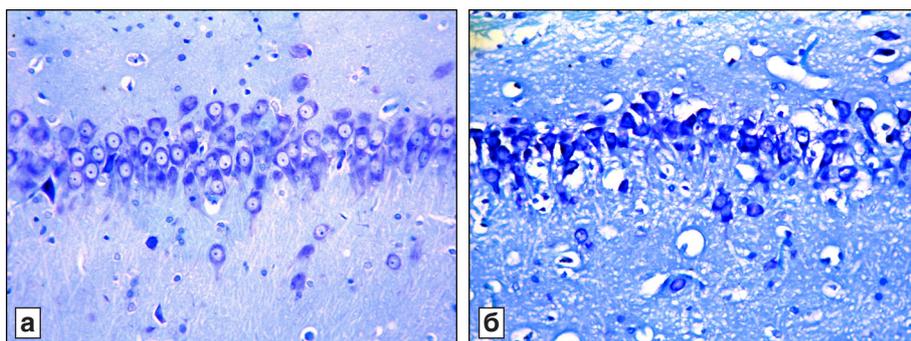


Рис. 1. Гистологическое исследование зоны СА1 гиппокампа крыс.

а — контроль; б — крысы, подвергавшиеся гравитационному воздействию. Перичеселлюлярный и периваскулярный отек, увеличение числа поврежденных нейронов пирамидного слоя. Окраска по Нисслю. Ув. 400

в дендритах пирамидных нейронов, что не наблюдалось в контроле.

При исследовании поля СА3 гиппокампа крыс 2-й группы обнаружен максимально выраженный периваскулярный и перицеллюлярный отек. В пирамидном слое преобладали нейроны с признаками повреждения, вплоть до клеток-теней, со сморщенными перикарионами и извитыми отростками. Морфометрическое исследование зоны СА3 пирамидного слоя гиппокампа животных из 2-й группы выявило уменьшение $S_{пер}$ на 15,3% ($p<0,01$), уменьшение $S_{я}$ нейронов — на 17,8% ($p<0,01$) по сравнению с таковыми у животных контрольной группы (см. таблицу). УК нейронов с признаками повреждения в поле СА3 увеличилось на 63,3% по сравнению с таковым в контрольной группе ($p<0,01$). $ОП_{пер}$ нейронов пирамидного слоя снизилась во 2-й группе на 15,7% ($p<0,01$) по сравнению с контролем. При ИГХ-исследовании с применением антител к СР в поля СА3 у крыс 2-й группы в пирамидных нейронах обнаружена равномерная цитоплазматическая экспрессия с интенсивностью преимущественно в 2 балла, причем, в отличие от контрольной группы, ИПМ выявлялся не только в перикарионах нейронов, но и в отростках, которые приобретали извитой вид. В поле СА3 выявлена тенденция к уменьшению $ОП_{ипм}$ (см. таблицу), однако, не наблюдалось изменений интенсивности экспрессии.

При гистологическом исследовании поля СА4 гиппокампа крыс 2-й группы выявлены значительные изменения клеточного состава пирамидного слоя. Преобладали нейроны с признаками повреждения, большинство из которых составляли клетки-тени со сморщенными перикарионами, приобретавшими веретеновидную или близкую к веретеновидной форму. Как и в остальных полях гиппокампа были отмечены нарушения кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла: резкое полнокровие, стазы и диapedез эритроцитов. Перицеллюлярный и периваскулярный отек выявлялся не только в пирамидном слое, но и молекулярном, и краевом полиморфном. Изменения сосудов микроциркуляторного русла проявлялись утолщением их стенок, появлением сегментарных фибриноидных некрозов, плазматическим пропитыванием, отсутствием эластической мембраны. Морфометрический анализ выявил уменьшение $S_{пер}$ на 35,4% ($p<0,01$) и $S_{я}$ нейронов — на 45,5% ($p<0,001$). УК нейронов с признаками повреждения в пирамидном слое поля СА4 увеличилось на 66,6% по сравнению с контролем ($p<0,001$).

Морфометрическая характеристика гиппокампа контрольных крыс и подвергавшихся многократным гравитационным перегрузкам в каудораниальном направлении

| Морфометрический параметр | Зоны гиппокампа крыс контрольной группы | | | | Зоны гиппокампа крыс экспериментальной группы | | | |
|--|---|--------------------|--------------------|---------------------|---|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | СА1 | СА2 | СА3 | СА4 | СА1 | СА2 | СА3 | СА4 |
| Относительная площадь иммунопозитивного материала, СР, % | 4,1 [3,2;6,9] | 7,7 [6,2;8,9] | 8,6 [7,3;9,2] | 16,1 [7,2;20,4] | 9,6 [8,3;10,1]* | 7,4 [6,5;8,9] ($p>0,05$) | 6,2 [4,7;7,1] ($p>0,05$) | 8,2 [5,9;11] ($p>0,05$) |
| Средняя площадь перикариона, мкм ² | 107,6 [95,4;115,5] | 94,44 [87,3;102,2] | 118,2 [99,4;129,6] | 149,5 [137,7;171,3] | 110,7 [98,8;119,4] ($p>0,05$) | 59,9 [56,8;81,5]**** | 100,1 [85,5;116,2]** | 96,6 [79,9;111,8]** |
| Средняя площадь ядра нейрона, мкм ² | 70,1 [59,8;82,5] | 62,1 [59,1;70,8] | 78,3 [64,4;91,8] | 89,3 [77,7;96,2] | 58,7 [46,6;67,7]* | 37,4 [34;49,8]**** | 64,3 [55,7;74,8]** | 48,6 [38,8;70,1]**** |
| Удельное количество нейронов с признаками повреждения, % | 14,9 [11,3;16,9] | 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 перикарионов, % | 45,3 [41,6;48,5] | 39,0 [29,0;43,4] | 39,5 [31,1;46,3] | 38,9 [31,47;42,2] | 24,7 [22,7;27,3]** | 25,0 [22,4;28,4]** | 23,8 [17,9;30,1]** | 27,8 [21,1;33,5]** |
| Относительная площадь нейропиля, % | 54,7 [47,6;57,9] | 61,0 [54,8;65] | 60,5 [53,3;66,4] | 61,1 [55,5;66,4] | 75,3 [68,6;79]** | 75,0 [67,7;80,8]** | 76,2 [69,8;11,1]** | 72,2 [64,4;77,9]** |

Различия значимы по сравнению с показателями в контрольной группе: * при $p<0,05$; ** при $p<0,01$; *** при $p<0,001$.

Примечание. СР — сериновая ращимаза. В квадратных скобках — минимальная и максимальная величина показателя.

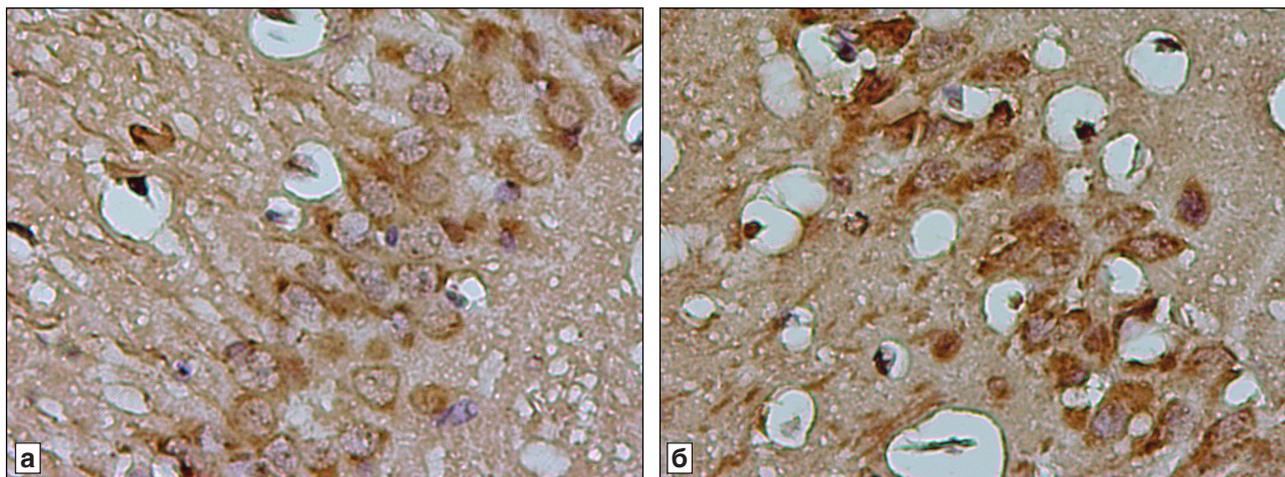


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование зоны СА1 гиппокампа крыс с применением антител против сериновой рацемазы. а — контроль, равномерное цитоплазматическое распределение ИРМ; б — крысы, подвергавшиеся гравитационному воздействию. Усиление интенсивности ИРМ, транслокация ИРМ в отростки пирамидных нейронов. Докраска гематоксилином. Ув. 400

Также отмечено снижение $ОП_{пер}$ пирамидного нейрона на 11,1% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (см. таблицу). При ИГХ-исследовании с применением антител к СР выявлена тенденция к снижению уровня экспрессии ИРМ. В контрольной группе отмечалась значительная позитивная реакция цитоплазмы с интенсивностью ИРМ в 3 балла. В группе крыс, подвергавшихся — 9 Gz, реакция ИРМ сменялась на преимущественно умеренную, оценивавшуюся в 2 балла, в единичных клетках пирамидного слоя она достигала 3 баллов. Следует отметить, что в контрольной группе животных уровень экспрессии СР был самым высоким в поле СА4 как визуально по интенсивности реакции, так и по самым высоким значениям $ОП_{имп}$.

Обсуждение полученных данных. Обнаруженные при морфологическом исследовании гиппокампа признаки нарушения кровообращения в микроциркуляторном отделе, в том числе резкий перичеселлюлярный и периваскулярный отек, полнокровие капилляров, диapedез эритроцитов, а также выраженное увеличение числа нейронов с признаками повреждения во всех полях гиппокампа свидетельствуют о глубоких дегенеративных изменениях и развитии как обратимого, так и необратимого повреждения ткани мозга при многократном длительном —9 Gz-воздействии. Развитие атрофических процессов подтверждается морфометрически значимым увеличением $ОП_n$ во всех полях гиппокампа, значимым снижением $S_{пер}$, а также $S_я$ пирамидных нейронов в полях СА2, СА3 и СА4. Значимое снижение относительной площади перикарионов нейронов пирамидного слоя и очаговые

выпадения свидетельствуют о включении процессов клеточной гибели с возможным участием апоптоза. Морфологические проявления спонгиоза в гиппокампе крыс, возникающие при длительном воздействии гипергравитации, по нашему мнению, связаны с нарастающим вазогенным отеком. Однократное воздействие центробежного ускорения в каудокраниальном векторе приводит к гемодинамическим сдвигам, выражающимся в усиленном притоке артериальной крови и нарушении венозного оттока в ткани головного мозга. Значительный подъем давления в сосудах является причиной нарушения функции гематоэнцефалического барьера и увеличения проницаемости стенок капилляров [1, 4]. Тем не менее, возникающие в стенках сосудов адаптивные изменения, связанные с плазморрагией, после однократного воздействия являются обратимыми, а признаки повреждения нейронов — слабо выраженными. Длительно повторяющиеся воздействия больших нагрузок приводят к развитию деструктивных изменений в сосудах микроциркуляторного русла по типу фибриноидного некроза, нарастанию гипоксического повреждения с последующим утолщением стенок и склерозированием, вплоть до полной облитерации. Наблюдавшиеся нами структурные изменения в гиппокампе соответствуют изменениям, описанным на различных моделях хронических форм цереброваскулярных болезней [13, 16], на основании чего многократные гравитационные перегрузки в каудокраниальном направлении могут быть предложены в качестве универсальной модели вазогенного отека и хронических нарушений мозгового кровообращения.

Выявленные нами особенности экспрессии СР в гиппокампе крыс при -9 Gz -воздействии, прежде всего, заключались в значимом увеличении $OP_{имп}$ в поле СА1. Тенденция к снижению экспрессии наблюдалась в поле СА3 и в особенности в СА4. По данным многочисленных исследований, поле СА1 является наиболее чувствительным к ишемическому повреждению [4, 5], что, возможно, связано с вовлечением в процесс повреждения механизма эксайтотоксичности с гиперактивацией NMDA-рецепторов. С другой стороны — отсутствие достоверной разницы для поля СА2 и тенденция к снижению уровня экспрессии СР в поле СА4 могут объяснять более высокую относительную устойчивость пирамидных нейронов к гипоксии в данных зонах по сравнению с таковой в поле СА1. Дисфункция NMDA-рецепции в зоне СА1, по нашему мнению, выступает дополнительным компонентом вторичного повреждения, усугубляя действие гипоксии и утяжеляя функциональные изменения в условиях нарастающего отека. Важной особенностью характера экспрессии СР в группе крыс, подвергавшихся многократному длительному -9 Gz -воздействию, являлось накопление ИПМ в дендритах пирамидных нейронов, проходящих в радиальном слое поля СА1, а также наблюдаемая транслокация ИПМ в полях СА2 и СА3 в дендриты пирамидных нейронов, которые приобретали усиленную извитость. Поскольку перемещение цитозольной СР к плазмолемме и в дендриты рассматривается как механизм предупреждения образования избытка D-серина и NMDA-опосредуемого глутаматного повреждения [6, 8], обнаруженное нами увеличение экспрессии СР в перикарионах нейронов пирамидного слоя поля СА1, а также накопление ИПМ в дендритах радиального слоя можно рассматривать как признак возможного участия эксайтотоксичности в механизмах повреждения при многократном воздействии гравитационных перегрузок в каудокраниальном направлении.

Таким образом, при длительном гравитационном воздействии в каудокраниальном направлении в гиппокампе у крыс наблюдаются признаки выраженного повреждения во всех зонах гиппокампа в сочетании с усиленной экспрессией и накоплением сериновой рацемазы в дендритах пирамидных нейронов поля СА1, что может свидетельствовать об участии эксайтотоксичности в механизмах вторичного повреждения в данной зоне. Морфометрически выявленное уменьшение $S_{пер}$ и $S_{я}$ пирамидных нейронов, снижение $OP_{пер}$, а также увеличение $OP_{н}$ свидетельствуют о развитии атрофических процессов и возмож-

ном глиозе при длительном гравитационном воздействии в каудокраниальном направлении.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: И. Н. Т., А. В. С.

Сбор и обработка материала: Д. С. М., М. В. Ш.

Статистическая обработка данных: Д. А. Б.

Анализ и интерпретация данных: Д. В. К.

Написание и редактирование текста: Е. В. В.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаевый М. Д., Назарова Л. Е., Гаевая Л. М., Огурцов Ю. А. Воспроизведение геморрагического инсульта в эксперименте // Патол. физиол. и экспер. тер. 2000. № 2. С. 7–8 [Gaevyi M. D., Nazarova L. E., Gaevaya L. M., Ogurtsov Yu. A. Procreation of a hemorrhagic stroke in an experiment // Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2000. № 2. P. 7–8. In Russ.].
2. Макарова Л. М. Нейропротективное действие препарата «мексидол» при тотальной ишемии мозга (к вопросу о целесообразности применения данного препарата при гравитационных перегрузках) // Бюл. экспер. биол. 2006. № 1. С. 48–55 [Makarova L. M. Neuroprotective effect of «meksidol» at a total ischemia of a brain (to a question of expediency of use of this drug at gravitational overloads) // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2006. № 1. P. 48–55. In Russ.].
3. 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. 2016. Т. 150, вып. 6. С. 20–25 [Smirnov A. V., Grigor'eva N. V., Ekova M. R., Shmidt M. V., Mednikov D. S., Tyurenkov I. N., Kurkin D. V., Volotova E. V. Morphological changes and serine racemase expression in rat hippocampus under combined stress condition // Morfologiya. 2016. Vol. 150, № 6. P. 20–25. In Russ.].
4. 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. ВолГМУ. 2016. Т. 60, № 4. С. 90–95 [Smirnov A. V., Shmidt 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 protein in the modeling hypertensive encephalopathy // Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. 2016. Vol. 60, № 4. P. 90–95. In Russ.].
5. Штемберг А. С., Кудрин В. С., Клодт П. М., Наркевич В. Б., Базян А. С. Влияние антиортостатической гиподинамии и перегрузки на дискриминантное обучение и обмен моноаминов в структурах мозга мышей // Нейрохимия. 2012. Т. 29, № 4. С. 318–326 [Shtemberg A. S., Kudrin V. S., Klodt P. M., Narkevich V. B., Bazyan A. S. The effects of antiorthostatic hypodynamia and overload on discriminant learning and monoamine exchange in the brain structures of mice // Neurokhimiya. 2012. Vol. 6, № 4. P. 291–298. In Russ.].
6. Balan L., Foltyn V. N., Zehl M., Dumin E., Dikopol'tsev E., Knoh D., Ohno Y., Kihara A., Jensen O. N., Radzishevsky I. S., Wolosker H. Feedback inactivation of D-serine synthesis by

- NMDA receptor-elicited translocation of serine racemase to the membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. Vol. 106, № 18. P. 7589–7594.
7. Fedotov A.A., Akulov S.A., Akulova A.S. Alterations in cardiovascular system under artificially simulated microgravity: preliminary study // *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2016. P. 204–206.
 8. Kolodney G., Dumin E., Safory H., Rosenberg D., Mori H., Radzishovsky I., Wolosker H. Nuclear Compartmentalization of Serine Racemase Regulates D-Serine Production: Implications for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, № 52. P. 31037–31050.
 9. Mustafa A.K., Ahmad A.S., Zeynalov E., Gazi S.K., Sikka G., Ehmsen J.T., Barrow R.K., Coyle J.T., Snyder S.H., Dore S. Serine racemase deletion protects against cerebral ischemia and excitotoxicity // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30, № 4. P. 1413–1416.
 10. Nishida Y., Maruyama S., Shouji I., Kemuriyama T., Tashiro A., Ohta H., Hagiwara K., Hiruma M., Yokoe H. Effects and biological limitations of +Gz acceleration on the autonomic functions-related circulation in rats // *J. Physiol. Sci.* 2016. Vol. 66, № 6. P. 447–462.
 11. Paxinos G., Watson C.A. The rat brain in stereotaxic coordinates // Toronto: Acad. Press, 1982. 90 p.
 12. Rueda C.B., Llorente-Folch I., Traba J., Amigo I., Gonzalez-Sanchez P., Contreras L., Juaristi I., Martinez-Valero P., Pardo B., Del Arco A., Satrustegui J. Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs) // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. Vol. 1857, № 8. P. 1158–1166.
 13. Tomassoni D., Avola R., Di Tullio M.A., Amenta F. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in the brain of spontaneously hypertensive rats // *Clinical and experimental hypertension*. 2004. Vol. 26, № 4. P. 335–350.
 14. Tran C.C., Ossard G., Etienne X., Serra A., Berthelot M., Jouanin J.C., Guézennec C.Y. Brief exposure to -2 Gz reduces cerebral blood flow velocity during subsequent +2 Gz acceleration // *J. Gravit. Physiol.* 2004. Vol. 11, № 2. P. 81–82.
 15. Yoshimura T., Goto M. D-amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases // *FEBS J.* 2008. Vol. 275, № 14. P. 3527–3537.
 16. Zhao Y.N., Li J.M., Chen C.X., Zhang P., Li S.X. Hypertension-mediated enhancement of JNK activation in association with endoplasmic reticulum stress in rat model hippocampus with cerebral ischemia-reperfusion // *Genet Mol Res.* 2015. Vol. 14, № 3. P. 10980–10990.

Поступила в редакцию 18.06.2017
Получена после доработки 23.07.2017

MORPHOLOGICAL CHANGES AND PECULIARITIES OF SERINE RACEMASE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS EXPOSED TO REPEATED NEGATIVE GRAVITATIONAL OVERLOADS

*D. S. Mednikov*¹, *A. V. Smirnov*^{1,3}, *M. V. Schmidt*^{1,3},
*I. N. Tyurenkov*², *D. V. Kurkin*², *D. A. Bakulin*²,
*Ye. V. Volotova*²

Objective — to study the morphometric parameters and serine racemase expression in the hippocampus of rats exposed to repeated gravitational overloads in caudo-cranial direction (–9 Gz).

Material and methods. 12 months-old rats were exposed to a force of 9G for 5 min twice daily with an interval of 12 h for 28 days — group 2 (exposure to gravitation, n=10). Rats not affected by hypergravitation formed group 1 (control, n=10). Morphometric methods were used to calculate an average size of the cell nuclei and perikarya of pyramidal neurons, the proportion of neurons with the signs of damage, the relative areas of pyramidal neuron perikarya and neuropil. Immunohistochemically the level of serine racemase expression was studied in all the hippocampal areas.

Results. The signs of cerebral microcirculatory disorders were detected such as spongiosis, capillary wall thickening, erythrocyte diapedesis. In all the zones of the hippocampus significant increase in number of pyramidal neurons with the signs of injury was observed. The atrophic changes were demonstrated by the decrease in the average and relative areas of pyramidal neuron perikarya in all the hippocampal areas. Immunohistochemical study has shown the increase in serine racemase expression in CA1, as well as translocation of immunoreactive material into the processes of pyramidal neurons. In CA3 and CA4, a tendency to decreased expression of serine racemase was found.

Conclusions. Following a long-term exposure of rats to gravitational overloads in caudo-cranial direction, all the hippocampal areas demonstrated the signs of damage combined with an enhanced expression and accumulation serine racemase in the dendrites of pyramidal neurons of the CA1 area, which may indicate the participation of excitotoxicity in the mechanisms of secondary damage in this area.

Key words: *hippocampus, gravitational force, serine racemase, rat*

¹ Department of Pathological Anatomy, ² Department of Pharmacology and Biopharmaceutics, Volgograd State Medical University, 1, Ploshchad' Pavshikh Bortsov, Volgograd 400137; ³ Laboratory of Morphology, Immunohistochemistry and Carcinogenesis, Volgograd Medical Research Center, 1G, Rokossovskogo St., Volgograd 400131