

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 611.813.3:616.831-005.4:599.323.4

Н. С. Щербак<sup>1,3</sup>, М. М. Галагудза<sup>3</sup>, А. Н. Кузьменков<sup>3</sup>, Д. А. Овчинников<sup>3</sup>,  
Г. Ю. Юкина<sup>2</sup>, Е. Р. Баранцевич<sup>3</sup>, В. В. Томсон<sup>2</sup> и Е. В. Шляхто<sup>1,3</sup>

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОЛЯ СА1 ГИППОКАМПА У МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНOK ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

<sup>1</sup> Институт сердечно-сосудистых заболеваний (дир. — академик РАМН проф. Е. В. Шляхто),

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр (дир. — проф. В. В. Томсон), Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова; <sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины (руков. — д-р мед. наук М. М. Галагудза), Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

Цель настоящей работы — исследование влияния ишемического посткондиционирования (ИП) на жизнеспособность нейронов поля СА1 гиппокампа, а также на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в цитоплазме указанных нейронов у 30 самцов монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*). Ишемическое повреждение головного мозга моделировали путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий на 7 мин. ИП производили с помощью трех эпизодов реперфузии — ишемии по 15/15 с. Спустя 48 ч реперфузии осуществляли морфометрический анализ и гистоэнзимологически выявляли ЛДГ в цитоплазме нейронов поля СА1 гиппокампа с количественной цитофотометрической оценкой активности фермента. Результаты показали, что 7-минутная ишемия приводит к уменьшению количества жизнеспособных нейронов (до 24%), а также способствует уменьшению активности в них ЛДГ (с  $0,260 \pm 0,009$  до  $0,190 \pm 0,006$  отн. ед.). Применение ИП способствовало значимому увеличению количества (до 52,9%,  $P < 0,01$ ) жизнеспособных нейронов в поле СА1 гиппокампа, а также сопровождалось повышением в них активности ЛДГ (до  $0,240 \pm 0,008$  отн. ед.,  $P < 0,001$ ).

**Ключевые слова:** гиппокамп, лактатдегидрогеназа, ишемическое посткондиционирование, песчанка монгольская

Ишемическое посткондиционирование (ИП) — один из малоизученных способов эндогенной нейропротекции, реализующийся при выполнении коротких ишемических стимулов в раннем реперфузионном периоде после пролонгированной ишемии головного мозга (ГМ) [6, 19]. Механизмы реперфузионного повреждения ГМ включают генерацию высоких концентраций активных форм кислорода, метаболические нарушения, невосстановление кровотока (no-reflow), внутриклеточный отек и другие изменения, приводящие в итоге к гибели клеток нервной ткани [18].

Нейропротективный потенциал ИП в настоящее время практически не используется в клинической практике, что во многом объясняется недостаточной изученностью изменений метаболизма нервной ткани в ответ на применение ИП. Только всестороннее исследование эндогенных способов защиты ГМ в эксперименте позволит экстраполировать полученные результаты на человека и принять решение о возможности их применения в клинической практике. Известно, что у всех млекопитающих имеются две коллатеральные системы кровоснабжения ГМ — артериальный круг

### Сведения об авторах:

Щербак Наталья Сергеевна (e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru), Институт сердечно-сосудистых заболеваний, кафедра факультетской терапии, ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, 197022 Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8

Галагудза Михаил Михайлович (e-mail: galagoudza@mail.ru), Кузьменков Андрей Николаевич (e-mail: naghval@yandex.ru), Овчинников Дмитрий Александрович (e-mail: od03@yandex.ru), Шляхто Евгений Владимирович (e-mail: Shlyakhto@inbox.ru), Институт экспериментальной медицины, «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова» Минздравсоцразвития РФ, 197341 Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Юкина Галина Юрьевна (e-mail: pipson@inbox.ru), Томсон Владимир Викторович (e-mail: nic.spb@mail.ru) Научно-исследовательский центр ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

Баранцевич Евгений Робертович (e-mail: professorerb@yandex.ru), кафедра неврологии и мануальной медицины ФПО ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

большого мозга и система лептоменингеальных анастомозов. У монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) имеется особенность — незамкнутый артериальный круг большого мозга, поэтому при окклюзии обеих общих сонных артерий у этих животных практически полностью прекращается кровоснабжение переднего мозга и развивается острая ишемия. Впервые использование монгольских песчанок для моделирования ишемии ГМ было предложено в 1966 г. [11]. Эта модель позволяет создать обратимую ишемию переднего мозга и воспроизводит ситуацию резкого общего снижения перфузии ГМ, которая может развиваться при асфиксии новорожденных, операциях на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения, операциях на сосудах головы и шеи, в частности, при каротидной эндартерэктомии и стентировании сонных артерий. Данная модель может применяться для оценки эффективности новых способов предотвращения гипоксической энцефалопатии и связанных с ней нарушений когнитивных функций, что представляет серьезную проблему в кардиохирургической практике [2, 4, 15].

Известно, что наиболее чувствительны к ишемии нейроны поля СА1 гиппокампа, коры ГМ и стриатума [18, 19]. Поэтому наиболее значимыми для понимания изменений метаболизма нервной ткани при применении ИП являются исследования, в которых оценивается активность ферментов в цитоплазме нейронов, локализованных в наиболее уязвимых к ишемическому и реперфузионному повреждению участках ГМ. Ишемия – реперфузия сопровождается глубокими нарушениями окислительно-восстановительных реакций энергетического метаболизма клетки, протекающих с участием ключевых ферментов, одним из которых является лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Результаты исследований, направленных на изучение ее активности при ишемическом повреждении ГМ, противоречивы, что, возможно, связано с неоднозначной ролью фермента в процессах аэробного и анаэробного окисления [8, 13, 14]. Изучение изменений активности ЛДГ при применении ИП может способствовать расширению представлений о механизмах формирования нейропротективного ответа.

Цель настоящей работы — анализ жизнеспособности нейронов и активности ЛДГ в их цитоплазме в поле СА1 гиппокампа при применении ИП на модели глобальной ишемии – реперфузии ГМ у монгольских песчанок.

Материал и методы. Все эксперименты проведены в соответствии с рекомендациями Этических коми-

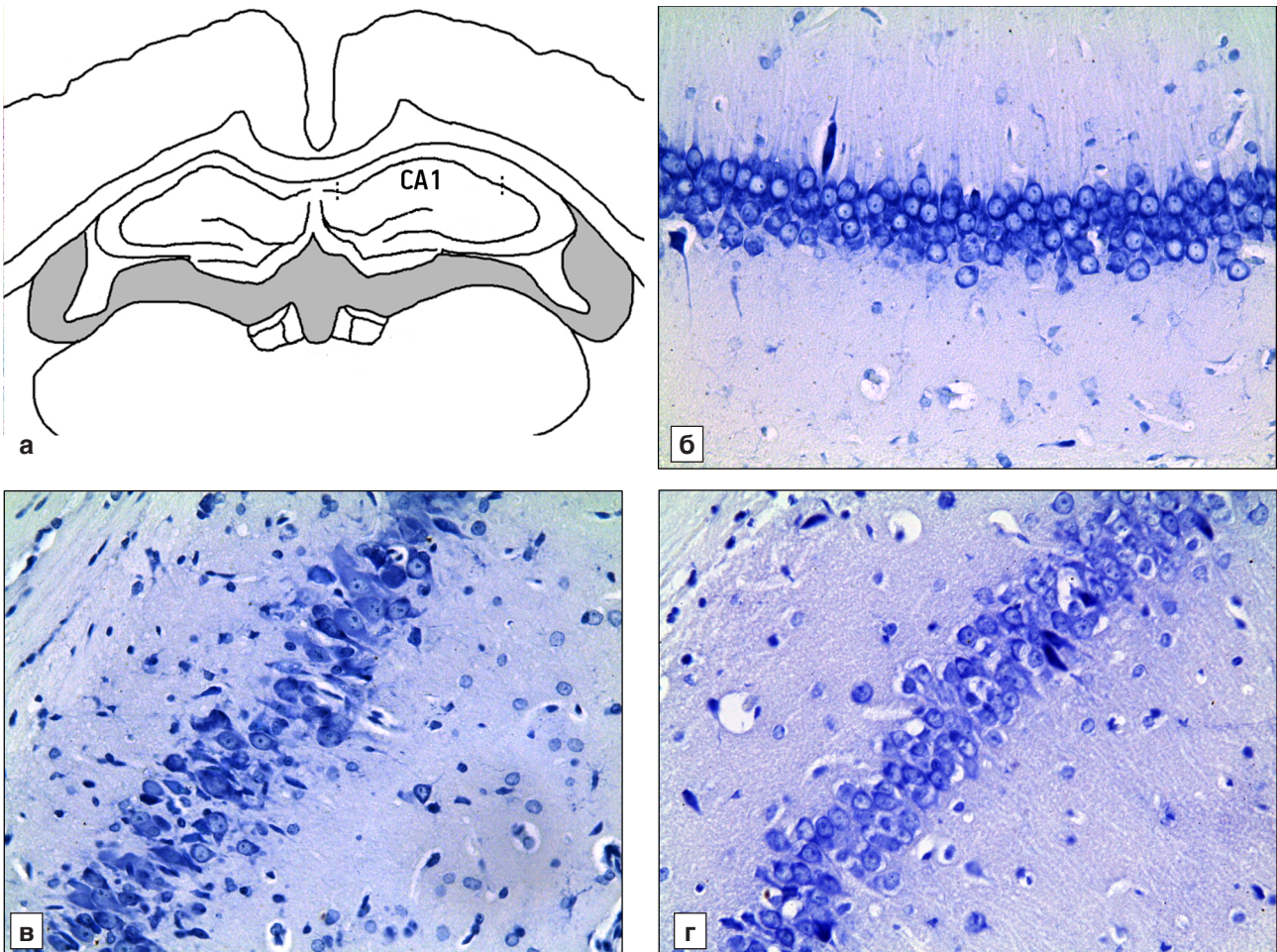
тетов СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова и ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова, а также в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья США № 85-23).

Исследование выполнено на песчанках-самцах (*Meriones unguiculatus*) массой 60–80 г, наркотизированных хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). У одной группы животных (n=10) моделировали обратимую глобальную ишемию ГМ путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий на 7 мин с последующей реперфузией в течение 48 ч. У другой группы песчанок (n=10) проводили ИП — 3 эпизода реперфузии – ишемии по 15/15 с, выполненных непосредственно после завершения 7-минутной ишемии. Третью группу составили ложнооперированные (ЛО) животные (n=10), им выполняли все хирургические манипуляции, кроме окклюзии общих сонных артерий. Через 48 ч по 5 животных из каждой группы наркотизировали повторно, извлекали ГМ, выделяли его сегменты, содержащие гиппокамп, фиксировали их в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Для общегистологической оценки фронтальные срезы толщиной 5 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу монгольской песчанки (bregma 1,5–1,9 мм) [12], окрашивали гематоксилином–эозином. Для морфометрического анализа препараты окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля, на которых под световым микроскопом ДМ-750 (Leica, Германия) на нескольких срезах (об. 40, ок. 10) поля СА1 гиппокампа подсчитывали количество пирамидных нейронов и далее определяли их общее число в пересчете на 1 мм пирамидного слоя. Учитывали клетки, сохранившие жизнеспособность, т.е. содержащие в плоскости среза ядрышко [10]. У остальных 5 животных каждой группы аналогичным образом выделяли сегменты ГМ, содержащие гиппокамп, после чего их ступенчато замораживали через охлажденный изооктан в жидком азоте. На криостатных срезах толщиной 10 мкм активность ЛДГ выявляли тетразолиевым методом [5] и оценивали на спектроцитометре плаг-методом при увеличении 280, площадь зонда составляла 0,785 мкм<sup>2</sup>, длина волны — 545 нм [3]. Результаты цитометрического анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности (D). Проводили по 50 измерений D в нейронах пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа на срезе у каждого животного.

Результаты обрабатывали статистически с вычислением среднего арифметического, его стандартной ошибки, дисперсии. Значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы «Statistica 6.0». Различия считали значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. В группе ЛО крыс пирамидный слой поля СА1 гиппокампа характеризовался плотным расположением большого количества мелких пирамидных нейронов в 4–5 слоях, имеющих ровную и округлую форму клеточных тел (рисунок). Активность ЛДГ в их цитоплазме составляла 0,260±0,009 отн. ед.

Через 48 ч после ишемии при морфологическом изучении поля СА1 гиппокампа отмечался перичеселлюлярный отек. Выявлялись сморщенные нейроны, что сопровождалось уменьшением их размеров, приобретением угловатой формы и гиперхроматозом ядер. Также отмечались нейро-



Поле CA1 гиппокампа монгольской песчанки.

а — схематичное изображение локализации поля CA1 гиппокампа; б-г — пирамидный слой поля CA1 гиппокампа: б — у ложнооперированных животных; в — через 48 ч после моделирования ишемии; г — после ишемического посткондиционирования. б-г — окраска толуидиновым синим по Нисслю. Об. 400, ок. 10 (б-г).

ны с набухшей цитоплазмой и ядрами, подвергшиеся хроматолизу (см. рисунок). Наблюдалось значимое ( $P < 0,01$ ) уменьшение числа жизнеспособных нейронов на 76% по сравнению с таковым в группе ЛО животных ( $85 \pm 11$  и  $352 \pm 10$  соответственно). Активность ЛДГ в цитоплазме нейронов у животных после ишемии была значимо ниже ( $0,190 \pm 0,006$  отн. ед.,  $P < 0,01$ ), чем в группе ЛО.

При анализе гистологических срезов ГМ, содержащих поле CA1 гиппокампа в группе с применением ИП, отмечалось наличие нейронов с округлой формой клеточных тел, с крупными светлыми ядрами, однако среди них встречались сморщенные нейроны с гиперхромными ядрами (см. рисунок, г). Морфометрический анализ показал, что количество жизнеспособных нейронов составляло 52,9% от такового в группе ЛО и было значимо больше, чем в группе животных после ишемии ( $186 \pm 11$  и  $85 \pm 11$  соответственно). Кроме того, в группе животных после ИП регистрирова-

лась более высокая, чем в группе после ишемии, активность ЛДГ ( $0,240 \pm 0,008$  отн. ед.,  $P < 0,001$ ). При этом активность ЛДГ в группе песчанок после ИП не отличалась от таковой в группе ЛО.

**Обсуждение полученных данных.** Моделирование 7-минутной глобальной ишемии ГМ с последующей реперфузией в течение 48 ч приводило к повреждению пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа, которое выражалось в уменьшении числа жизнеспособных нейронов, а также в снижении активности ЛДГ в их цитоплазме. Нарастание проявлений повреждения в постишемическом периоде объясняется феноменом отсроченной гибели нейронов, впервые обнаруженным T. Kirino [9]. Данные литературы об активности ЛДГ при ишемии – реперфузии ГМ немногочисленны и противоречивы [8, 13]. При этом необходимо отметить, что активность ЛДГ в клинической практике оценивали только в сыво-

ротке крови или в спинномозговой жидкости, а в экспериментальных исследованиях — в гомогенате ГМ, что не дает представления о протекании метаболических процессов в клетках отдельных структур ГМ.

В настоящей работе применение ИП сопровождалось сохранением жизнеспособности нейронов поля СА1 гиппокампа и более высоким уровнем активности ЛДГ в цитоплазме этих нейронов, который не отличался от активности фермента в группе ЛО животных. В последние 20 лет в биохимических исследованиях произошла переоценка роли лактата в энергетическом метаболизме нервной ткани. Доминировавшие ранее представления о лактате, как о метаболически инертном конечном продукте анаэробного гликолиза, сменились концепцией о ключевом значении лактата и различных изоформ ЛДГ в аэробном пути образования энергии в клетке [14]. Таким образом, обнаруженный факт нормализации активности ЛДГ в цитоплазме нейронов под действием ИП может рассматриваться как адаптивная перестройка метаболизма, свидетельствующая о сохранности энергетического обмена в нейронах.

С другой стороны — можно предположить, что изменение активности ЛДГ в пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа под действием ИП косвенно свидетельствует о вовлечении в его протективные механизмы функционирования астроцит-нейронного лактатного челнока, ответственного за долгосрочную память, где именно лактат является главным элементом нейрон-глиальных метаболических взаимодействий. При этом лактат поступает из астроцита в нейрон, где под влиянием ЛДГ он преобразуется в пируват, который обеспечивает энергетический баланс нейрона [7, 16].

Посткондиционирование ГМ может быть вызвано не только короткими эпизодами реперфузии — ишемии, но и неишемическими стимулами, например, фармакологическими агентами или эпизодами гипобарической гипоксии. Кроме того, было установлено, что посткондиционирование ГМ дает нейропротективный эффект не только непосредственно после пролонгированной ишемии (гипоксии), но и спустя 6–48 ч после ее прекращения [17]. Последний феномен получил название позднего, или отсроченного, посткондиционирования ГМ. Позднее посткондиционирование ГМ с помощью трех 2-часовых эпизодов умеренно выраженной гипобарической гипоксии, выполненное через 24 ч после 3-часовой тяжелой гипоксии, полностью предотвращало гибель нейронов неокортекса и поля СА4 гиппокампа, но лишь частично устранило гибель нейронов поля

СА1 [1]. Раннее посткондиционирование в целом давало менее выраженный нейропротективный эффект, полностью предотвращая гибель нейронов поля СА1 и частично — поля СА4 и неокортекса. Указанные различия отражают неодинаковые механизмы нейропротективного действия раннего и отсроченного посткондиционирования ГМ. Примечательно, что прерывистая гипоксия (3 сеанса с интервалом в 24 ч) оказывала нейропротективное действие не только при выполнении послетестовой гипоксии, но и за 24 ч до ее наступления, т. е. в режиме прекодиционирования [1].

Таким образом, полученные результаты подтверждают наличие цитопротективного эффекта ИП ГМ. Очевидно, что в механизмах реализации протективного эффекта ИП задействован ключевой фермент энергетического обмена — ЛДГ. Полученные результаты необходимо учитывать при разработке рекомендаций по применению ИП в клинической практике с целью уменьшения ишемического и реперфузионного повреждения, а также при разработке способов фармакологического посткондиционирования ГМ.

*Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев М. Г., Рыбникова Е. А. и Самойлов М. О. Изменение выраженности гипоксических повреждений мозга крыс под влиянием гипоксического посткондиционирования. *Морфология*, 2012, т. 141, вып. 1, с. 12–15.
2. Гусев Е. И. и Скворцова В. И. Современные представления о лечении острого церебрального инсульта. *Consilium medicum*, 2000, т. 2, с. 60–65.
3. Журавлева Т. Б. и Прочуханов Р. А. Введение в количественную гистохимию ферментов. М., Медицина, 1978.
4. Иванов С. В., Сыркин А. Л. и Самушия М. А. Расстройства личности в послеоперационном периоде аортокоронарного шунтирования. *Журн. неврол. психиатр.*, 2004, т. 104, с. 10–17.
5. Лойда З., Госсрау Р. и Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., Мир, 1982.
6. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Нифонтов Е. М. и др. Эффект ишемического посткондиционирования при экспериментальной глобальной ишемии головного мозга. *Артериальная гипертензия*, 2011, т. 17 вып. 2, с. 182–188.
7. Dalsgaard M. K., Quistorff B., Danielsen E. R. et al. A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. *J. Physiol.*, 2004, v. 554, p. 571–578.
8. Donnan G.A., Zapf P., Doyle A.E. and Bladin P.F. CSF enzymes in lacunar and cortical stroke. *Stroke*, 1983, v. 14, p. 266–269.
9. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, 1982, v. 239, p. 57–69.

10. Kirino T., Tamura A. and Sano K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. *Stroke*, 1986, v. 17, p. 455–459.
11. Levine S. and Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Neurol.*, 1966, v. 6, p. 255–262.
12. Loskota W. J., Lomax P. and Verity M. A. A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain. Ann Arbor Science Publishers., Ann Arbor, Mich. USA. 1974.
13. Parakh N., Gupta H. L. and Jain A. Evaluation of enzymes in serum and cerebrospinal fluid in cases of stroke. *Neurol. India*, 2002, v. 50, p. 518.
14. Schurr A. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2006, v. 26, p. 142–152.
15. Sotaniemi K. A. Long-term neurologic outcome after cardiac operation. *Ann. Thorac. Surg.*, 1995, v. 59, p. 1336–1339.
16. Suzuki A., Stern S. A., Bozdagi O. et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 2011, v. 144, p. 810–823.
17. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009, v. 29, p. 873–885.
18. Zhao H., Ren C., Chen X. and Shen J. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia. *Curr. Drug Targets*, 2012, v. 13, p. 173–187.
19. Zhao H., Sapolsky R. M. and Steinberg G. K. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2006, v. 26, p. 1114–1121.

Поступила в редакцию 13.06.2012

### MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF HIPPOCAMPAL CA1 AREA IN MONGOLIAN GERBILS AFTER ISCHEMIC POSTCONDITIONING

*N. S. Shcherbak, M. M. Galagudza, A. N. Kuz'menkov,  
D. A. Ovchinnikov, G. Yu. Yukina, Ye. R. Barantsevich,  
V. V. Tomson and Ye. V. Shlyakhto*

The aim of this study was to determine the effect of ischemic postconditioning on hippocampal CA1 neuronal survival and cytoplasmic activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the gerbil model of cerebral ischemia-reperfusion injury. Ischemia was induced by bilateral common carotid artery occlusion (for 7 min) in male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Ischemic postconditioning protocol comprised 3 cycles of 15 s reperfusion/15 s ischemia. After 48 h of reperfusion, CA1 neuronal death was detected by Nissl staining and the cytoplasmic LDH was demonstrated histochemically in CA1 area of the hippocampus with a quantitative cytophotometric assessment of the enzyme activity. The results have shown that 7 min ischemia resulted in a significant decrease in the number of viable neurons (up to 24% ) in the CA1 area of hippocampus; in addition, it reduced the activity of LDH in these neurons (from  $0.260 \pm 0.009$  to  $0.190 \pm 0.006$  relative units). The application of ischemic postconditioning significantly increased the number of viable neurons (up to 52.9%,  $P < 0.01$ ) in the CA1 area of hippocampus, and it was accompanied by an increase in the activity of LDH ( $0.240 \pm 0.008$  relative units,  $P < 0.001$ ).

**Key words:** *hippocampus, lactate dehydrogenase, ischemic postconditioning, Mongolian gerbil*

Institute of Cardiovascular Diseases, Scientific Research Center, St. Petersburg I. P. Pavlov State Medical University; Institute of Experimental Medicine, V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, St. Petersburg