

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2013
УДК 611.813.3.018:599.323.4

*Н. С. Щербак, М. М. Галагудза, Г. Ю. Юкина, Е. Р. Баранцевич,
В. В. Томсон и Е. В. Шляхто*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ РАЗЛИЧНЫХ ПОЛЕЙ ГИППОКАМПА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИИ

Институт сердечно-сосудистых заболеваний (дир. — академик РАМН проф. Е. В. Шляхто); Научно-исследовательский центр (дир. — проф. В. В. Томсон); Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова; 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 (ИПостК) на жизнеспособность различных полей нейронов гиппокампа, а также на активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в их цитоплазме у 30 песчанок монгольских (*Meriones unguiculatus*). Ишемическое повреждение головного мозга моделировали билатеральной окклюзией общих сонных артерий на 7 мин. ИПостК воспроизводили с помощью трех эпизодов реперфузии—ишемии по 15/15 с. Спустя 48 ч реперфузии проводили морфометрический анализ и гистоэнзимологически определяли активность СДГ в цитоплазме пирамидных нейронов полей СА1, СА2, СА3, СА4 гиппокампа. Результаты показали, что 7-минутная ишемия приводит к значимому уменьшению количества неизмененных нейронов в полях СА1 (до 24%) и СА3 (до 56%) гиппокампа, а также во всех полях гиппокампа способствует увеличению активности СДГ в их цитоплазме, по сравнению с показателем у ложнооперированных животных. Применение ИПостК приводит к значимому увеличению количества (до 52,9%, $P < 0,01$) неизмененных нейронов в поле СА1 и (до 88%, $P < 0,05$) в поле СА3 гиппокампа и сопровождается снижением активности СДГ в сохранивших жизнеспособность нейронах всех полей гиппокампа.

Ключевые слова: гиппокамп, сукцинатдегидрогеназа, ишемия—реперфузия, ишемическое посткондиционирование, песчанка монгольская

Транзиторная ишемия головного мозга может сопровождаться селективной гибелью нейронов в наиболее чувствительных к ней отделах головного мозга, к которым относятся поле СА1 гиппокампа, кора большого мозга и стриатум [14, 29]. При наступлении ишемии в клетке запускается цепь процессов, известных под названием ишемического каскада, первым и важнейшим звеном которой является внутриклеточный энергодифицит. Итогом развертывания ишемического каскада являются глубокие нарушения ионного гомеостаза нейронов, внутриклеточный отек и разрушение плазмолеммы, а также запуск механизмов программируемой клеточной гибели. Многочисленные исследования подтверждают гипотезу о том, что постишемическая реперфузия головного мозга даже после относительно непродолжительной ишемии приводит к дополнительным нарушениям энергетического метаболизма

клетки, которые могут выражаться в дисфункции митохондрий и изменении активности митохондриальных ферментов [22, 29]. В исследовании, проведенном на митохондриях, изолированных из нейронов гиппокампа и стриатума у крыс в разные сроки после 15-минутной глобальной ишемии головного мозга, было обнаружено, что выраженность дисфункции митохондрий различается в зависимости от их локализации. Так, митохондрии из синаптических терминалей были в наибольшей степени повреждены непосредственно после ишемии, тогда как несинапсомальные митохондрии характеризовались меньшей чувствительностью к ишемии, причем степень их дисфункции достигала максимума только в позднем реперфузионном периоде [9].

Интенсивность гибели нейронов, вызванной кратковременной ишемией с последующей реперфузией резко нарастает через 48 ч с момента

Сведения об авторах:

Щербак Наталия Сергеевна (e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru), Институт сердечно-сосудистых заболеваний, кафедра факультетской терапии; *Юкина Галина Юрьевна* (e-mail: pipson@inbox.ru), *Томсон Владимир Викторович* (e-mail: nic.spb@mail.ru), Научно-исследовательский центр; *Баранцевич Евгений Робертович* (e-mail: professorerb@yandex.ru), кафедра неврологии и мануальной медицины Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8

Галагудза Михаил Михайлович (e-mail: galagoudza@mail.ru), *Шляхто Евгений Владимирович* (e-mail: Shlyakhto@inbox.ru), Институт экспериментальной медицины, Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, 197034, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

реперфузии, что объясняется отсроченной гибелью нейронов [14]. Очевидно, что в основе необратимого повреждения нейронов лежат глубокие нарушения энергетического обмена. Однако механизмы, связывающие нарушения энергетического метаболизма нейронов с характерной для феномена отсроченной гибели динамикой потери нейронов, остаются малоизученными. Результаты исследований показывают, что апоптоз нейронов может способствовать увеличению размера инфаркта головного мозга в отдаленном периоде после повреждения, вызванного как транзиторной, так и перманентной фокальной его ишемией [12, 18]. На гомогенатах различных зон гиппокампа у крысы было показано, что через 48 ч реперфузии после ишемии головного мозга утилизация кислорода была значимо снижена в поле СА1 гиппокампа, но при этом не отличалась от исходной в полях СА3 и СА4 [24].

Эндогенным механизмом, позволяющим снизить степень реперфузионного повреждения, может выступать ишемическое посткондиционирование (ИПостК), цитопротективный потенциал которого реализуется при выполнении коротких ишемических стимулов в раннем реперфузионном периоде после пролонгированной ишемии головного мозга. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению нейропротективных эффектов ИПостК, механизмы реализации его защитного эффекта остаются не до конца изученными [30]. Также остается неизученным влияние коротких ишемических стимулов, выполненных в раннем реперфузионном периоде, на энергетический метаболизм нейронов, обладающих различной чувствительностью к ишемическому повреждению.

Предполагается, что главным механизмом, лежащим в основе нейропротективного эффекта ИПостК, является воздействие ишемических стимулов на энергетический баланс клетки путем влияния на ключевые ферменты окислительно-восстановительных реакций. Недавно было показано влияние ИПостК на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в цитоплазме нейронов при глобальном ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга [4]. Однако остается неизученной роль митохондриальных окислительно-восстановительных ферментов при применении ИПостК. Одним из ключевых ферментов, участвующих в энергетическом метаболизме клетки, является сукцинатдегидрогеназа (СДГ), которая локализуется на внутренней мембране митохондрий, одновременно является ферментом цикла Кребса и входит в состав комплекса электрон-транспортной цепи [10]. Известно, что изменение активности СДГ используется как маркер динамики окислительно-восстановительных

реакций в клетках, а также как маркер стресса [3]. Роль СДГ в формировании толерантности головного мозга к реперфузионному повреждению при применении ИПостК в областях головного мозга с различной чувствительностью к ишемии — реперфузии остается неизученной.

Цель настоящей работы — исследование влияния ИПостК на жизнеспособность нейронов различных полей гиппокампа и активность СДГ в их цитоплазме при глобальной ишемии — реперфузии головного мозга у монгольских песчанок.

Материал и методы. Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями этических комитетов Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова и Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, а также в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья США № 85-23).

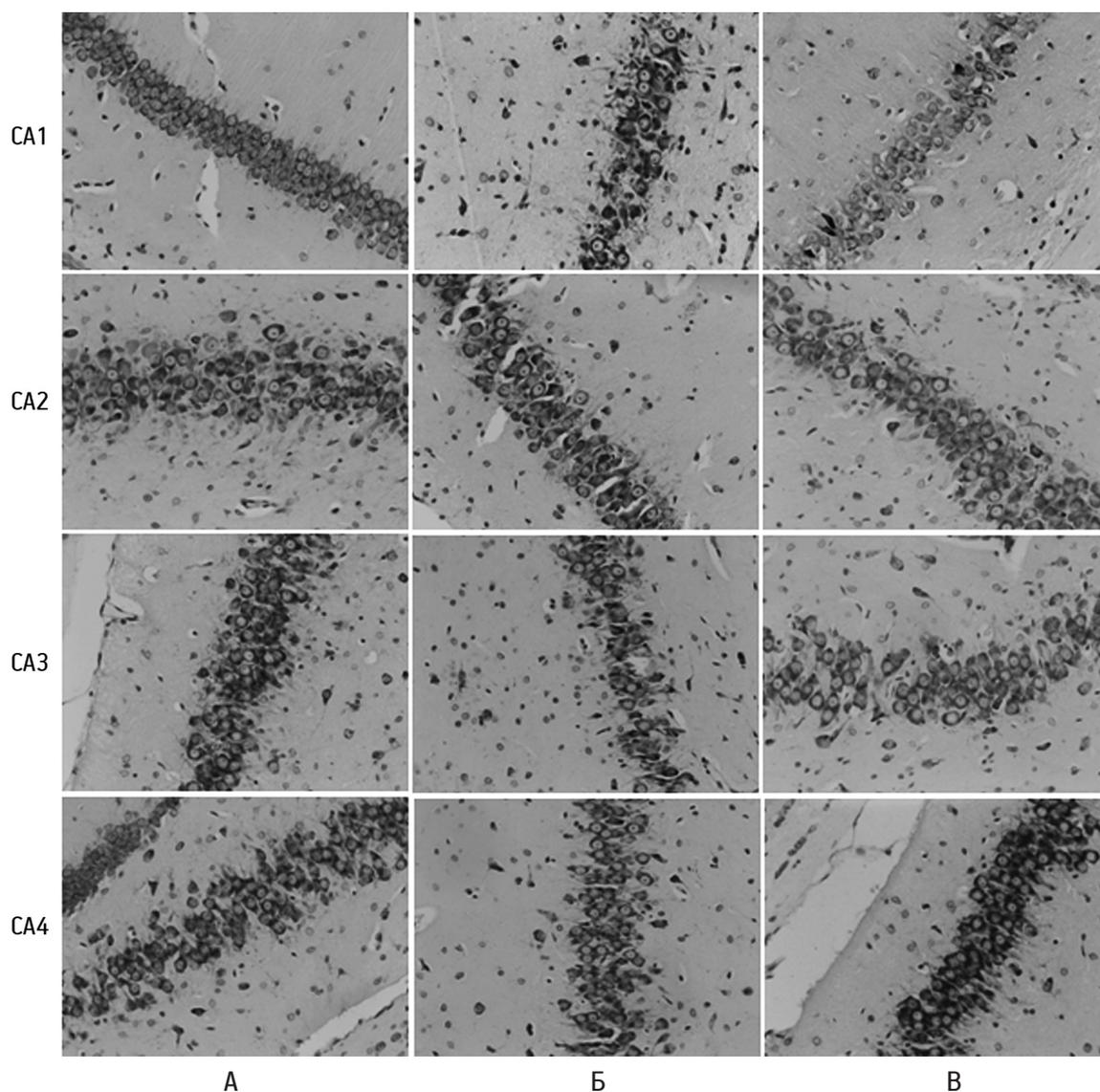
Исследование выполнено на песчанках-самцах (*Meriones unguiculatus*) массой 60–80 г, наркотизированных хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). В первой группе животных (Ишемия, $n=10$) моделировали обратимую глобальную ишемию головного мозга путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий на 7 мин с последующей реперфузией в течение 48 ч. Во второй группе песчанок (Ишемия+ИПостК, $n=10$) проводили ИПостК — 3 эпизода реперфузии/ишемии по 15 с/15 с, выполненных непосредственно после завершения 7-минутной ишемии. Третью группу составили ложнооперированные (ЛО) животные ($n=10$), которым выполняли все хирургические манипуляции, кроме окклюзии общих сонных артерий. Через 48 ч по 5 животных из каждой группы наркотизировали повторно, извлекали головной мозг (ГМ), выделяли части, содержащие гиппокамп, фиксировали 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) [19], 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 гиппокампа при увеличении 400 подсчитывали количество неизмененных пирамидных нейронов в полях СА1, СА2, СА3 и СА4. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм пирамидного слоя гиппокампа. Учитывали нейроны, содержащиеся в плоскости среза ядрышко [4, 14]. У остальных 5 животных каждой группы аналогичным образом выделяли части ГМ, содержащие гиппокамп, после чего их ступенчато замораживали, проводя через охлажденный изооктан в жидком азоте. На криостатных срезах толщиной 10 мкм количественно оценивали активность СДГ тетразолиевым методом [2]. Оптическую плотность продукта реакции определяли с помощью спектроцитофотометра (ЛОМО, Россия) плаг-методом при увеличении 280, площадь кончика зонда составляла 0,785 мкм², длина волны — 545 нм [1]. Результаты цитофотометрического анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности (D). Проводили по 50 измерений D в цитоплазме неизмененных нейронов пирамидного слоя полей СА1, СА2, СА3, СА4 на препарате у каждого животного.

Результаты обрабатывали статистически с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки. Значимость различий между группами оценивали с помо-

щью t-критерия Стьюдента с использованием программы «STATISTICA 6.0». Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. В группе ЛО-животных мелкие клетки пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа располагались в 4–5 слоев. Для поля СА2 гиппокампа было характерно более рыхлое расположение клеток в 3–4 слоя, тела пирамидных нейронов были несколько крупнее, чем в поле СА1. Пирамидный слой поля СА3 гиппокампа характеризовался наличием крупных нейронов, рыхло расположенных в 4–5 слоев. В поле СА4 пирамидный слой был представлен крупными нейронами, расположенными очень рыхло в 5–6 слоев (*рисунок*). Плотность расположения нейронов в различных полях гиппокампа представлена в *табл. 1*.

При морфологическом изучении гиппокампа в группе ЛО-животных не наблюдалось дистрофических изменений или уменьшения количества неизмененных пирамидных нейронов. Через 48 ч после моделирования глобальной ишемии во всех полях гиппокампа отмечались перичеселлюлярный отек и наличие клеток с морфологическими изменениями. В поле СА1 происходила более значительная гибель нейронов. Число неизмененных нейронов в данном поле уменьшалось на 76% ($P < 0,01$) по сравнению с таковым в группе ЛО животных (см. табл. 1). Обратимая ишемия приводила к уменьшению количества нейронов в поле СА2 на 6% по сравнению с их числом в группе ЛО. В поле СА3 количество неизмененных нейронов было на 46% меньше, чем в группе ЛО-животных ($P < 0,01$) (см. табл. 1). К концу 2-х суток реперфу-



Пирамидный слой полей СА1, СА2, СА2, СА2 гиппокампа монгольской песчанки.

А — после операции; Б — после ишемии; В — после ишемии и посткондиционирования. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Об. 40, ок. 10

Таблица 1

Количество неизмененных нейронов в различных полях гиппокампа у песчанки монгольской после моделирования ишемии головного мозга с последующим ишемическим посткондиционированием ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Экспериментальная группа	Поля гиппокампа			
	CA1	CA2	CA3	CA4
Ложная операция	352±10	216±11	201±8	135±9
Ишемия	85±11*	203±8	110±7*	116±10
Ишемия + ИПостК	186±11**	207±10	177±10**	124±10

* Различия значимы по сравнению с показателями в группе ложнооперированных животных; ** по сравнению с показателями в группе после ишемии при $P < 0,01$.

зии в поле CA4 количество нейронов уменьшалось на 14%, что значимо не отличалось от такового в группе ЛО (см. табл. 1). В группе животных с применением ИПостК отмечалось значимое ($P < 0,01$) увеличение числа неизмененных нейронов в полях гиппокампа CA1 (в 2,2 раза) и CA3 (в 1,6 раза) по сравнению с таковым в группе после ишемии. В поле CA2 и CA4 имелась тенденция к проявлению протективного эффекта ИПостК в виде сохранения количества неизмененных нейронов. Их число в поле CA2 и CA4 было на 1,5 и 6,9% выше, чем в группе после ишемии ($P > 0,05$) (см. рис. 1, табл. 1).

В группе ЛО-животных активность СДГ в цитоплазме пирамидных нейронов была различной в зависимости от поля гиппокампа. Самая высокая активность СДГ была зарегистрирована в цитоплазме нейронов поля CA3. Активность СДГ в цитоплазме нейронов поля CA1 была на 17,6% меньше, чем в нейронах поля CA3 и значимо ниже ($P < 0,05$), чем в нейронах остальных полей гиппокампа (табл. 2). Таким образом, активность СДГ в цитоплазме нейронов у ЛО-животных зависела от принадлежности нейрона к определенному полю гиппокампа и распределялась в следующем порядке: CA3 > CA2 > CA4 > CA1.

В группе животных после ишемии активность СДГ значимо нарастала во всех полях гиппокампа по сравнению с таковой в группе ЛО (см. табл. 2). Однако увеличение активности фермента имело неоднородный характер. Самое существенное повышение активности СДГ на 45,3%

наблюдалось в цитоплазме нейронов поля CA2 и было значимо выше, чем в других полях гиппокампа после обратимой ишемии (см. табл. 2). В цитоплазме нейронов поля CA1 активность СДГ увеличивалась на 38,3%. Активность СДГ в нейронах поля CA4 также значимо повышалась на 15,4% ($P < 0,01$), а в поле CA3 — только на 12,3% (см. табл. 2). Через 48 ч после моделирования 7-минутной обратимой ишемии активность СДГ в цитоплазме пирамидных нейронов распределялась в следующем порядке: CA2 > CA3 > CA1 > CA4.

Применение ИПостК приводило к уменьшению активности СДГ во всех полях гиппокампа по сравнению с таковой в группе после ишемии (см. табл. 2). В цитоплазме нейронов поля CA1 гиппокампа активность СДГ при применении ИПостК значимо ($P < 0,05$) понижалась на 15% по сравнению с ее активностью в группе после ишемии и оставалась значимо выше по сравнению с таковой в группе ЛО. В цитоплазме нейронов поля CA2 активность СДГ понижалась на 22% по сравнению с активностью в группе после ишемии, но также оставалась значимо выше при сравнении с таковой в группе ЛО (см. табл. 2). Активность СДГ в цитоплазме нейронов полей CA3 и CA4 понижалась на 7,8 и 15% соответственно по сравнению с активностью в группе после ишемии и была неотличима от таковой в группе ЛО. При применении ИПостК после обратимой 7-минутной ишемии активность СДГ в цитоплазме пирамидных нейронов распределялась в следующем порядке: CA2 > CA3 > CA1 > CA4, т. е. сохранялось

Таблица 2

Активность сукцинатдегидрогеназы в цитоплазме пирамидных нейронов различных полей гиппокампа у песчанки монгольской после моделирования ишемии головного мозга с последующим ишемическим посткондиционированием ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, усл. ед.)

Экспериментальная группа	Поля гиппокампа			
	CA1	CA2	CA3	CA4
Ложная операция (ЛО)	0,469±0,012*	0,532±0,015	0,568±0,011*	0,517±0,017
Ишемия	0,652±0,022 [#]	0,773±0,020* [#]	0,644±0,015 [#]	0,602±0,017* [#]
Ишемия + ИПостК	0,554±0,018 ^{α, β}	0,595±0,023* ^{α, β}	0,594±0,018 ^α	0,506±0,019* ^α

* Различия значимы по сравнению с показателями в других полях гиппокампа при $P < 0,05$; по сравнению с группой ЛО животных: [#] при $P < 0,01$; ^β при $P < 0,05$; ^α по сравнению с группой после ишемии при $P < 0,005$.

то же соотношение активности СДГ в разных полях гиппокампа, что и в группе после ишемии, но уровни активности СДГ довольно равномерно понижались под действием ИПостК.

Обсуждение полученных данных. Структура полей гиппокампа монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) типична для головного мозга грызунов [14, 18, 29]. В нашем исследовании анализ активности СДГ в различных полях гиппокампа у ЛО-животных выявил, что наименьшая активность фермента характерна для нейронов поля СА1. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями при изучении гиппокампа песчанок [16]. Поскольку активность СДГ коррелирует с уровнем продукции в клетке высокоэнергетических фосфатов, было высказано предположение о том, что низкая активность ферментов электрон-транспортной цепи в нейронах поля СА1 может играть ключевую роль в запуске их отсроченной гибели при реперфузии и объяснять их низкую толерантность к ишемии—реперфузии [16]. Однако при исследовании активности СДГ в различных полях гиппокампа кроликов такой закономерности обнаружить не удалось [23]. При иммуногистохимическом анализе пирамидного слоя гиппокампа у крыс было установлено, что в поле СА1 интенсивность реакции пируватдегидрогеназного комплекса ниже, чем в поле СА3 [6]. При исследовании локальной утилизации глюкозы в гиппокампе у крыс также была обнаружена наименьшая ее интенсивность в поле СА1, а наивысшая — в поле СА3 [27]. Исходя из результатов данной работы, а также ряда других исследований [6, 16, 24] можно предположить, что самый низкий уровень энергетического метаболизма характерен для нейронов поля СА1 гиппокампа, а самый высокий — для нейронов поля СА3.

Обратимая глобальная ишемия приводила к повреждению нейронов пирамидного слоя гиппокампа, при этом количество неизмененных нейронов к концу 2-х суток реперфузионного периода существенно варьировало в зависимости от поля гиппокампа. Наибольшей чувствительностью к действию ишемии—реперфузии обладали нейроны полей СА1 и СА3. Пирамидные нейроны поля СА4 также демонстрировали довольно высокую чувствительность к ишемии, но их гибель была меньше, чем в полях СА1 и СА3. С другой стороны — практически все нейроны поля СА2 сохраняли жизнеспособность к концу 2-х суток реперфузионного периода. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований, в которых было установлено, что наибольшей чувствительностью к действию обратимой ишемии—реперфузии обладают нейроны полей СА1 и СА3. В этих областях гиппокампа гибель ней-

ронов наблюдалась при длительности ишемии от 5 мин [15, 21]. Также имеются ряд исследований, в которых показано, что нейроны поля СА1 являются более чувствительными к действию ишемии, чем нейроны поля СА3 [5, 20]. Можно предположить, что в разных полях гиппокампа неодинаковая устойчивость нейронов к ишемии обусловлена различными нейроно-глиальным индексом пирамидного слоя, степенью васкуляризации, а также разной интенсивностью функциональной нагрузки, приходящейся на то или иное поле гиппокампа. Нами установлено, что наибольшей чувствительностью к действию ишемии—реперфузии обладают нейроны с самой высокой и самой низкой активностью СДГ в группе ЛО-животных, а также, что ишемия с последующей реперфузией способствует увеличению активности СДГ в цитоплазме нейронов, сохранивших жизнеспособность, во всех полях гиппокампа. При этом максимальное увеличение активности наблюдается в цитоплазме нейронов полей СА1 и СА2, хотя они в данных полях обладают различной устойчивостью к действию ишемии—реперфузии. В исследовании, проведенном ранее на монгольских песчанках, было показано некоторое незначительное понижение активности СДГ в пирамидном слое гиппокампа поля СА1 после 5-минутной ишемии к концу 2-х суток ишемии [16]. В другом исследовании при изучении митохондрий нейронов и активности СДГ после травмы ГМ у крыс было обнаружено увеличение размеров митохондрий и активности СДГ через 24 ч после повреждения [8]. В нашем исследовании обнаружено повышение активности СДГ в нейронах пирамидного слоя во всех полях гиппокампа через 48 ч после моделирования обратимой глобальной ишемии ГМ, причем степень повышения активности существенно варьировала в зависимости от поля гиппокампа. Не исключено, что эффект активации СДГ нарастает параллельно со временем реперфузии, поскольку при исследовании активности 4 комплексов электрон-транспортной цепи несинаптических митохондрий, выделенных из нейронов гиппокампа крыс после 10-минутной глобальной ишемии к концу 1-х суток реперфузии, значимого изменения активности комплексов при сравнении с ЛО-животными обнаружено не было [11]. Известно, что транзиторная ишемия—реперфузия, не приводящая к гибели клетки, может играть адаптивную роль и приводить к повышению экспрессии ряда цитопротективных белков, включая белки теплового шока, циклооксигеназу-2, супероксиддисмутазу и др. Возникающее в результате этого через 24–48 ч повышение устойчивости клетки к последующей продолжительной ишемии—реперфузии получило название позднего прекодиционирования или

«второго окна защиты» [7]. Хотя ферменты митохондрий, являющиеся компонентами дыхательной цепи, не относятся к классическим эффекторам позднего прекодиционирования, определенные предпосылки позволяют предполагать, что их экспрессия и/или активность могут возрастать в результате ишемического прекодиционирования. Так, например, на модели ишемии—реперфузии миокарда мыши было показано сохранение либо повышение активности НАДН-дегидрогеназы, СДГ и цитохром с-оксидазы после применения ишемического прекодиционирования [17]. Таким образом, повышение активности СДГ в цитоплазме нейронов, сохранивших жизнеспособность к моменту окончания реперфузии, может иметь компенсаторный характер.

Применение ИПостК приводило к увеличению числа неизмененных нейронов в полях СА1 и СА3. В областях гиппокампа, наиболее чувствительных к выбранному режиму ишемии—реперфузии, использованный протокол ИПостК оказывал нейропротективное действие. Этот факт согласуется с результатами ряда исследований, в которых на различных экспериментальных моделях было показано, что применение ИПостК дает цитопротективный эффект в отдельных структурах ГМ [4, 29, 30]. При анализе активности СДГ в цитоплазме пирамидных нейронов гиппокампа было обнаружено, что активность СДГ при применении ИПостК понижалась по сравнению с активностью, наблюдаемой к концу реперфузии в неизмененных нейронах всех полей гиппокампа, а в полях СА3 и СА4 — не отличалась от таковой, регистрируемой в группе ЛО-животных. Следовательно, применение ИПостК способствовало уменьшению активации СДГ, вызванной ишемией—реперфузией.

В ряде исследований с использованием различных экспериментальных моделей ишемии нервной ткани было показано, что ингибирование СДГ небольшими дозами 3-нитропропионовой кислоты приводило к формированию толерантности к последующей аноксии/ишемии [25, 26]. Это связано с наступлением умеренного клеточного энергодефицита в результате подавления окислительного фосфорилирования и переключения клетки на анаэробную продукцию АТФ, что подтверждается возрастанием содержания лактата в культуральной среде или плазме крови животного [13, 28]. В исследовании с использованием этой же экспериментальной модели было установлено, что применение аналогичного протокола ИПостК приводит к увеличению активности ЛДГ в цитоплазме нейронов поля СА1 гиппокампа [4]. Можно предположить, что выполнение дополнительных кратковременных эпизодов ишемии—реперфузии после завершения тестовой 7-минут-

ной ишемии способствует многократному «переключению» клеток с аэробного на анаэробный путь образования энергии, что и запускает механизмы повышенной толерантности к реперфузионному повреждению. Основываясь на результатах настоящей работы, мы не можем ответить на вопрос, какие изменения активности СДГ и других митохондриальных ферментов предшествуют гибели нейронов в ходе реперфузионного периода. Однако, если принять, что степень активации СДГ в сохранивших жизнеспособность нейронах коррелирует с тяжестью ишемического—реперфузионного повреждения гиппокампа, можно сделать вывод, что ИПостК эффективно ослабляет выраженность данного феномена.

Таким образом, полученные результаты подтверждают положение о том, что нейроны пирамидного слоя разных полей гиппокампа обладают неодинаковой устойчивостью к действию ишемии—реперфузии. Наиболее чувствительны к ишемии нейроны полей СА1 и СА3 гиппокампа. Обратимая ишемия способствует увеличению активности СДГ в неизмененных нейронах всех полей гиппокампа. Примененный протокол ИПостК приводил к уменьшению гибели нейронов полей СА1 и СА3 гиппокампа, а также вызывал снижение активации СДГ, индуцированной ишемией—реперфузией, в сохранивших жизнеспособность нейронах гиппокампа. Полученные результаты необходимо учитывать при разработке способов фармакологического посткондиционирования ГМ, а также рекомендаций по применению ИПостК в клинической практике.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7) и гранта РФФИ № 13-04-00793 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлева Т. Б. и Прочуханов Р. А. Введение в количественную гистохимию ферментов. М., Медицина, 1978.
2. Лойда З., Госсрау Р. и Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., Мир, 1982.
3. Мартынюк В. С. и Ислямов Р. И. Влияние комбинированного действия слабого низкочастотного магнитного поля и гипокинезии на активность НАДН-дегидрогеназ и сукцинатдегидрогеназы в различных отделах головного мозга крыс. Физика живого, 2009, т. 17, № 2, с. 89–93.
4. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Кузьменков А. Н. и др. Морфофункциональные изменения поля СА1 гиппокампа у монгольских песчанок при применении ишемического посткондиционирования. Морфология, 2012, т. 142, вып. 5, с. 12–16.
5. Araki T., Kato H., Kogure K. and Kanai Y. Long-term changes in gerbil brain neurotransmitter receptors following transient cerebral ischaemia. Br. J. Pharmacol., 1992, v. 107, № 2, p. 437–42.
6. Bagley P. R., Tucker S. P., Nolan C. et al. Anatomical mapping of glucose transporter protein and pyruvate dehydrogenase in rat brain: an immunogold study. Brain Res., 1989, v. 499, № 2, p. 214–224.

7. Bolli R., Li Q. H., Tang X. L. et al. The late phase of preconditioning and its natural clinical application — gene therapy. *Heart Fail Rev.*, 2007, v. 12, № 3–4, p. 189–199.
8. Borges N., Cerejo A., Santos A. et al. Changes in rat cerebral mitochondrial succinate dehydrogenase activity after brain trauma. *Int. J. Neurosci.*, 2004, v. 114, № 2, p. 217–227.
9. Cafe C., Torri C., Gatti S. et al. Changes in non-synaptosomal and synaptosomal mitochondrial membrane-linked enzymatic activities after transient cerebral ischemia. *Neurochem. Res.*, 1994, v. 19, p. 1551–1555.
10. Chalmers G. R., Roy R. R. and Edgerton V. R. Adaptability of the oxidative capacity of motoneurons. *Brain Res.*, 1992, v. 570, № 1–2, p. 1–10.
11. Dave K. R., Saul I., Busto R. et al. Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2001, v. 21, № 12, p. 1401–1410.
12. Du C., Hu R., Csernansky C. A. et al. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1996, v. 16, p. 195–201.
13. Jenkins B. G., Brouillet E., Chen Y. I. et al. Non-invasive neurochemical analysis of focal excitotoxic lesions in models of neurodegenerative illness using spectroscopic imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1996, v. 16, p. 450–461.
14. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, 1982, v. 239, p. 57–69.
15. Kuhmonen J., Pokorný J., Miettinen R. et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *Anesthesiology*, 1997, v. 87, № 2, p. 371–377.
16. Kuroiwa T., Terakado M., Yamaguchi T. et al. The pyramidal cell layer of sector CA 1 shows the lowest hippocampal succinate dehydrogenase activity in normal and postischemic gerbils. *Neurosci. Lett.*, 1996, v. 206, № 2–3, p. 117–120.
17. Li Y., Cai M., Xu Y. et al. Late phase ischemic preconditioning preserves mitochondrial oxygen metabolism and attenuates post-ischemic myocardial tissue hyperoxygenation. *Life Sci.*, 2011, v. 88, p. 57–64.
18. Linnik M., Miller J., Sprinkle-Cavallo J. et al. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995, v. 32, p. 116–124.
19. Loskota W. J., Lomax P. and Verity M. A. A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain. *Ann Arbor, Ann Arbor Science Publishers.*, 1974.
20. O'Neill M. J. and Clemens J. A. Rodent models of global cerebral ischemia. *Curr Protoc. Neurosci.*, 2001, p. 9.5.1–9.5.25.
21. Radenovic L., Selakovic V., Janac B. and Andjus P. R. Neuroprotective efficiency of NMDA receptor blockade in the striatum and CA3 hippocampus after various durations of cerebral ischemia in gerbils. *Acta Physiol. Hung.*, 2011, v. 98, № 1, p. 32–44.
22. Schinder A. F., Olson E. C., Spitzer N. C. and Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 1996, v. 16, p. 6125–6133.
23. Shimizu N., Morikawa N. and Ishi Y. Histochemical studies of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase of the rabbit brain, with special reference to the results in the paraventricular structures. *J. Comp. Neurol.*, 1957, v. 108, № 1, p. 1–21.
24. Sims N. R. and Pulsinelli W. A. Altered mitochondrial respiration in selectively vulnerable brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurochem.*, 1987, v. 49, p. 1367–1374.
25. Sugino T., Nozaki K., Takagi Y. and Hashimoto N. 3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus in vivo. *Neurosci. Lett.*, 1999, v. 259, p. 9–12.
26. Wiegand F., Liao W., Busch C. et al. Respiratory Chain Inhibition Induces Tolerance to Focal Cerebral Ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1999, v. 19, p. 1229–1237.
27. Wree A., Schleicher A., Zilles K. and Beck T. Local cerebral glucose utilization in the Ammon's horn and dentate gyrus of the rat brain. *Histochemistry*. 1988, v. 88, № 3–6, p. 415–426.
28. Zeevalk G. D., Derr Yellin E. and Nicklas W. J. Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995, v. 275, p. 1124–1130.
29. 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.
30. 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 15.04.2013

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF THE PYRAMIDAL NEURONS IN VARIOUS HIPPOCAMPAL AREAS AFTER THE ISCHEMIC POSTCONDITIONING

N. S. Shcherbak, M. M. Galagudza, 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 (IP) on the viability of neurons in various hippocampal areas as well as on cytoplasmic activity of succinate dehydrogenase (SDH) in these cells in 30 male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Ischemic brain injury was induced by bilateral common carotid artery occlusion for 7 min. IP protocol comprised 3 cycles of 15 s of reperfusion/15 s of ischemia. After reperfusion for 48 h, the morphometric analysis was conducted, and SDH cytoplasmic activity was assessed using quantitative histochemistry in the pyramidal neurons of the hippocampal areas CA1, CA2, CA3, CA4. The experiment has demonstrated that 7-minute-long ischemia resulted in a significant decrease in the number of viable neurons in CA1 area (up to 24%) and in the CA3 (to 56%) of the hippocampus; besides, it led to the elevation of SDH activity in the cytoplasm of the neurons in all the hippocampal areas as compared to that in sham-operated animals. The application of IP significantly increased the number of viable neurons in CA1 (up to 52.9%, $P < 0.01$) and in CA3 areas of the hippocampus (up to 88%, $P < 0.05$), and it was accompanied by reduction of SDH activity in surviving neurons in all the hippocampal areas.

Key words: *hippocampus, succinate dehydrogenase, ischemia-reperfusion, 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