



© Коллектив авторов, 2014 г.
УДК 616.831-005.4-001

**Н. С. Щербак, М. М. Галагудза,
Д. А. Овчинников, Е. О. Щербакова,
Г. Ю. Юкина, Е. Р. Баранцевич,
В. В. Томсон, Е. В. Шляхто**

ВЛИЯНИЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В НЕЙРОНАХ РАЗЛИЧНЫХ СЛОЕВ НЕОКОРТЕКСА

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия головного мозга (ГМ) представляет собой сложный патологический процесс, начинающийся с формирования острого энергодифицита в нейронах с последующим запуском реакций «ишемического каскада», приводящий, в итоге, к нарастанию объема необратимо поврежденной нервной ткани [12]. Восстановление перфузии головного мозга, в свою очередь, приводит к усугублению нарушений энергетического обмена в ранее ишемизированной ткани, что обозначают понятием реперфузионного повреждения [15]. Понимание механизмов метаболических нарушений, возникающих в клетках нервной ткани при постишемической реперфузии, может способствовать разработке новых нейропротективных воздействий, направленных на уменьшение выраженности реперфузионного повреждения ГМ. Критическое снижение напряжения кислорода в ткани при глубокой ишемии ГМ приводит к активации анаэробного пути образования энергии в клетке. Несмотря на успехи, достигнутые в понимании механизмов повреждения нейронов при ишемии ГМ, важной задачей остается изучение изменений энергетического обмена в нейронах различных структур ГМ с учетом феномена отсроченной гибели нейронов в периоде реперфузии [10]. В исследованиях, посвященных изучению метаболических нарушений в нервной ткани при ишемии, в качестве маркеров повреждения используют концентрацию либо активность таких ферментов класса оксидоредуктаз, как лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Однако следует отметить, что в проведенных экспериментальных и клинических исследованиях проводился анализ уровня/активности СДГ в культуре нейронов или в гомогенате ГМ, а также в сы-

воротке крови или в спинно-мозговой жидкости; при этом результаты опубликованных исследований немногочисленны и противоречивы [7, 13]. Применение указанных подходов не позволяет определить активность СДГ в отдельных структурах ГМ, а также оценить уровень и интенсивность протекания окислительно-восстановительных реакций в цитоплазме нейронов.

Целью исследования являлось изучение изменения активности СДГ в цитоплазме нейронов различных слоев коры ГМ в раннем и отдаленном реперфузионном периоде после глобальной ишемии ГМ у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этических комитетов ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова и ФМИЦ им. В. А. Алмазова, а также в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (публикация Национального Института Здоровья США № 85 – 23).

Моделирование ишемического повреждения. Исследование проводилось на крысах-самцах Wistar массой 220 – 250 г (питомник «Рапшолово»), содержащихся в условиях 12/12-часового светотемнового режима и получавших стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Животных наркотизировали хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). Обратимую полную глобальную ишемию ГМ моделировали окклюзией плечевого ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии на 10 минут по ранее описанной методике при искусственной вентиляции легких (SAR-830, США) [4] с последующей реперфузией, длительность которой составляла 2 либо 7 суток, после чего проводилось гистоэнзимологическое исследование ГМ. При проведении ложной операции осуществляли аналогичные манипуляции, но без наложения микрохирургических зажимов на артерии. Животные были случайным образом разделены на следующие экспериментальные группы:

1) ЛО2 – ложнооперированные животные, у которых производили гистохимическое исследование ГМ через 2-е суток после операции (n = 8);

2) ЛО7 – ложнооперированные животные, которых выводили из эксперимента через 7 суток после операции (n = 7);

3) ИР2 – 10-минутная глобальная ишемия (ГИ) с последующей реперфузией в течение 2-х суток (n = 10);

4) ИР7 – то же, что и в предыдущей группе, но с реперфузией в течение 7 суток (n = 10).

Все хирургические вмешательства проводились на термостатируемом операционном столе (TCAT-2LV Controller; *Physitemp Instruments Inc.*, Clifton, NJ,

USA) при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла.

Гистоэнзимологический анализ. После завершения периода реперфузии животных повторно наркотизировали, извлекали мозг из полости черепа и нарезали на сегменты, используя фронтальную матрицу для ГМ мелких грызунов (WPI, США). Выделяли сегменты ГМ, после чего их ступенчато замораживали через охлажденный изоктан в жидком азоте. С помощью криостата при -20°C готовили срезы мозга во фронтальной плоскости толщиной 10 мкм, соответствующие стереотаксическим координатам ГМ крысы (bregma — $3,6 \pm 0,2\text{ мм}$) [14] и количественно оценивали активность СДГ тетразолиевым методом [2]. Оптическую плотность продукта реакции определяли на спектроцифотометре (ЛОМО) плаг-методом при увеличении $\times 280$, площадь зонда составляла $0,785\text{ мкм}^2$, длина волны — 545 нм [1]. Результаты цитофотометрического анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности. Проводили по 50 измерений в цитоплазме жизнеспособных нейронов трех слоев коры ГМ: в слое II (наружном зернистом), в слое III (наружных пирамидальных нейронов) и в слое V (внутреннем пирамидальном) на препарате у каждого животного.

Статистический анализ. Результаты обрабатывались статистически с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки. После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы «Statistica 6.0». Различия учитывались как значимые при $p < 0,05$.

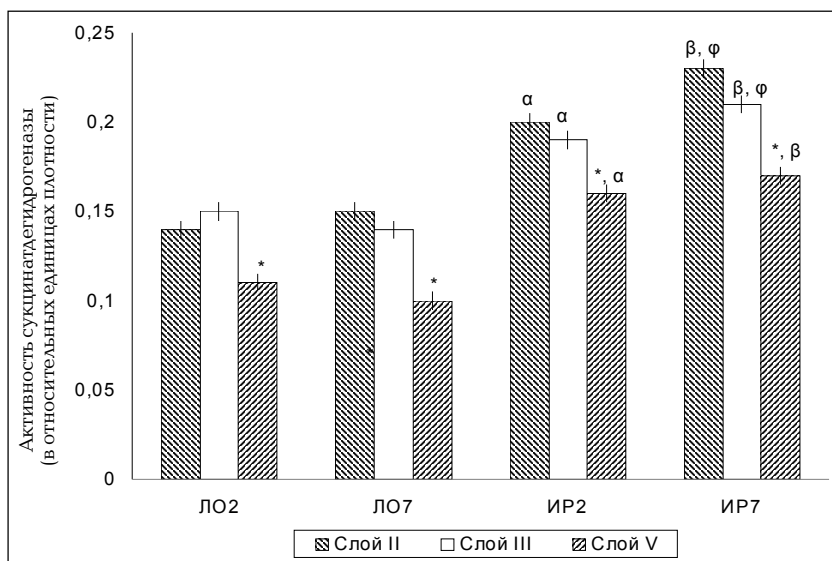
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе активности СДГ в нейронах коры ГМ было установлено, что активность СДГ, регистрируемая в цитоплазме нейронов II, III и V слоев коры ГМ, не различалась между двумя группами ложнооперированных животных ЛО2 и ЛО7, содержащихся после ложной операции в течение 2 и 7 дней соответственно (рисунок). При этом в обеих группах активность СДГ в цитоплазме нейронов слоя V была достоверно ниже ($P < 0,01$) по сравнению с нейронами других слоев. Таким образом, активность СДГ в цитоплазме нейронов животных ложнооперированных групп зависела от принадлежности нейрона к определенному слою коры и распределялась в следующем порядке: II слой и III слой $>$ V слой ($P < 0,01$). Активность СДГ в цитоплазме сохранивших жизнеспособность нейронов различных слоев коры по-разному изменялась в за-

висимости от длительности реперфузионного периода (рисунок). В цитоплазме нейронов наружного зернистого слоя II коры ГМ ко 2-му дню реперфузионного периода наблюдалось значимое повышение активности СДГ до $0,20 \pm 0,006$ отн. ед. по сравнению с активностью, регистрируемой в группе ЛО2 (на 42,9 %, $P < 0,01$); к 7-м суткам реперфузионного периода ферментативная активность СДГ в группе ИР7 увеличивалась до $0,23 \pm 0,009$ отн. ед. и была на 15 % выше по сравнению с группой ИР2 ($P < 0,05$) и на 53,3 % по сравнению с группой ЛО7 ($P < 0,01$). В цитоплазме нейронов слоя III ко 2-м суткам реперфузии наблюдалось значимое повышение ферментативной активности СДГ до $0,19 \pm 0,004$ у. е. при сравнении с ЛО2 (на 26,7 %, $P < 0,01$); к 7-м суткам реперфузионного периода ферментативная активность составляла $0,21 \pm 0,005$ отн. ед. и была ниже на 50 % ($P < 0,01$) по сравнению с группой ЛО7 и на 10,5 % ($P < 0,05$) по сравнению с группой ИР2 (рисунок). Изменение активности СДГ в нейронах слоя V ко 2-м суткам реперфузии характеризовалось существенным повышением активности СДГ до $0,16 \pm 0,004$ отн. ед. (на 45,5 %, $P < 0,01$) по сравнению с активностью, регистрируемой в группе ЛО2, которое также имело место в группе ИР7. Уровень активности СДГ в жизнеспособных нейронах после глобальной ишемии и реперфузии распределялся в следующем порядке: II слой $>$ III слой $>$ V слой ($P < 0,05$) и существенным образом не зависел от длительности реперфузионного периода. Однако наблюдались различия в степени увеличения активности СДГ в зависимости от длительности реперфузионного периода внутри каждого слоя (рисунок).

В нашем исследовании для анализа изменения активности ферментов энергетического обмена в цитоплазме нейронов в различных слоях коры воспроизводилось ишемическое и реперфузионное повреждение ГМ с использованием экспериментальной модели полной глобальной ишемии/реперфузии ГМ у крыс [4]. Данная модель позволяет воспроизводить ситуации резкого общего снижения перфузии ГМ различной длительности с последующей реперфузией, которые могут возникать в клинической практике при асфиксии новорожденных, глобальной ишемии мозга при операциях на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения, операциях на сосудах головы и шеи, гемодинамически значимых нарушениях ритма, состоянии шока и клинической смерти. Результаты экспериментальных исследований с использованием этой модели можно экстраполировать в клиническую практику при изучении механизмов ишемического и реперфузионного повреждения, а также при разработке способов нейропротекции.

У животных ложнооперированных групп в цитоплазме нейронов анализируемых слоев коры ГМ



Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в жизнеспособных нейронах коры при полной глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс в различных экспериментальных группах: * $p < 0,01$ — при сравнении с другими слоями коры; ^α $p < 0,01$ — при сравнении с группой ЛО2; ^β $p < 0,01$ — при сравнении с группой ЛО7; ^φ $p < 0,05$ — при сравнении с группой ИР2

активность СДГ была различной. Обнаруженный факт указывает на различный метаболизм нейронов и уровень протекания в них окислительно-восстановительных реакций в зависимости от принадлежности к определенному слою коры. Неоднородность уровня активности СДГ в нейронах различных слоев коры ГМ может объясняться особенностями цитоархитектоники, нейроглиальными взаимоотношениями, функциональными задачами конкретной области и физиологическим состоянием организма. В нашем исследовании было установлено, что наименьшая активность СДГ характерна для нейронов слоя V коры при сравнении со слоями II и III ГМ у крыс ложнооперированных групп. Полученные нами результаты согласуются с результатами, полученными ранее при исследовании активности СДГ в различных слоях коры ГМ у монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) [5, 6]. Следует отметить, что, несмотря на видовые особенности кровообращения ГМ монгольских песчанок и крыс [3, 11], у животных этих двух видов отмечаются единые закономерности распределения активности СДГ — в нейронах коры ГМ.

В исследовании было установлено, что активность СДГ в нейронах различных слоев коры ГМ имеет неодинаковую динамику изменения ферментативной активности в ходе реперфузии. Характер изменения активности СДГ в реперфузионный период существенным образом не отличается от результатов, полученных в исследованиях, где объектом экспериментального исследования выступали монгольские песчанки, однако степень

изменения для отдельных слоев коры ГМ несколько варьирует, что может объясняться различными видовыми механизмами формирования адаптации отдельных слоев коры ГМ к повреждающему действию ишемии/реперфузии [6]. Также полученные нами результаты подтверждаются результатами другого исследования, в котором при изучении митохондрий нейронов и активности СДГ после травмы ГМ у крыс было обнаружено увеличение размеров митохондрий и активности СДГ через 24 часа после повреждения [7]. СДГ локализуется на внутренней мембране митохондрий и одновременно является ферментом цикла Кребса и комплексом электрон-транспортной цепи [8]. Исходя из результатов исследования активности 4-х комплексов электрон-транспортной цепи несинаптических

митохондрий, выделенных из гиппокампа крыс после 10-минутной глобальной ишемии к концу первых суток реперфузии, в котором не было обнаружено достоверного изменения активности комплексов при сравнении с ложнооперированными животными, можно предположить, что эффект активации СДГ нарастает параллельно со временем реперфузии [9].

В нашем исследовании впервые получены сведения об активности СДГ в цитоплазме нейронов разных слоев коры при глобальной ишемии ГМ у крыс в различные сроки реперфузионного периода. Полученные результаты позволяют судить о сдвигах энергетического обмена, происходящих непосредственно в нейронах различных слоев коры. Таким образом, в ходе исследования получены фундаментальные данные об изменении аэробного и анаэробного метаболизма нейронов в различные сроки реперфузии, которые помогут расширить имеющиеся представления о патогенетических механизмах ишемического повреждения ГМ в реперфузионном периоде с последующей возможностью поиска способов нейропротективных воздействий от такого социально значимого заболевания, как ишемический инсульт.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-1611.2014.7) и гранта РФФИ № НК 13-04-00793/14.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлева Т. Б., Прочуханов Р. А. Введение в количественную гистохимию ферментов. — М.: Медицина, 1978.

2. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М.: Мир, 1982.
3. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы. — СПб.: Лань, 2001.
4. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Кузьменков А. Н. и др. Новый способ моделирования обратимой глобальной ишемии головного мозга у крыс // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. — 2011. — № 152 (11). — С. 592–595.
5. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Овчинников Д. А. и др. Активность лактатдегидрогеназы в коре головного мозга и гиппокампе монгольских песчанок при ишемическом и реперфузионном повреждении // Росс. физиолог. журн. им. И. М. Сеченова. — 2012. — № 98 (2). — С. 186–193.
6. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Овчинников Д. А. и др. Активность сукцинатдегидрогеназы в неокортексе и гиппокампе монгольских песчанок при ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. — 2013. — № 155 (1). — С. 17–20.
7. Borges N., Cerejo A., Santos A. et al. Changes in rat cerebral mitochondrial succinate dehydrogenase activity after brain trauma // Int. J. Neurosci. — 2004. — № 114 (2). — P. 217–227.
8. Chalmers G. R., Roy R. R., Edgerton V. R. Adaptability of the oxidative capacity of motoneurons // Brain. Res. — 1992. — № 570 (1–2). — P. 1–10.
9. 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. — № 21 (12). — P. 1401–1410.
10. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // Brain Res. — 1982. — № 239. — P. 57–69.
11. Levine S., Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) // Exp. Neurol. — 1966. — № 16 (3). — P. 255–262.
12. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. — 1999. — № 79 (4). — P. 1431–1568.
13. Parakh N., Gupta H. L., Jain A. Evaluation of enzymes in serum and cerebrospinal fluid in cases of stroke // Neurol. India. — 2002. — № 50. — P. 518–526.
14. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. — N.-Y.: Academic Press, 1998.
15. Zhao H., Ren C., Chen X., Shen J. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia // Curr. Drug Targets. — 2012. — № 13. — P. 173–187.

РЕЗЮМЕ

Н. С. Щербак, М. М. Галагудза, Д. А. Овчинников, Е. О. Щербаклова, Г. Ю. Юкина, Е. Р. Баранцевич, В. В. Томсон, Е. В. Шлякто

Влияние глобальной ишемии-реперфузии головного мозга на активность сукцинатдегидрогеназы в нейронах различных слоев неокортекса

Целью исследования являлось изучение изменения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в цитоплазме нейронов различных слоев коры головного мозга (ГМ) в раннем и отдаленном реперфузионном периоде после глобальной ишемии ГМ у крыс. Обратимую полную глобальную ишемию ГМ моделировали окклюзией плечевого ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии на 10 минут, с последующей реперфузией, длительность которой составляла 2 либо 7 суток. Гистоэнзимологически определяли активность СДГ в цитоплазме нейронов II, III и V слоев коры ГМ. Показано, что активность СДГ в нейронах изученных слоев коры ГМ характеризовалась повышением ко 2-м суткам реперфузионного периода с последующим нарастанием активности к 7-м суткам периода реперфузии. Изменение активности СДГ в цитоплазме нейронов коры ГМ зависит от принадлежности к слою коры и продолжительности постшемической реперфузии.

Ключевые слова: головной мозг, ишемия/реперфузия, сукцинатдегидрогеназа.

SUMMARY

N. S. Shcherbak, M. M. Galagoudza, D. A. Ovchinikov, E. O. Shcherbakova, G. U. Yukina, E. R. Barantsevich, V. V. Thomson, E. V. Shlyakhto

Influence of cerebral global ischemia-reperfusion on succinate dehydrogenase activity in neurons of different neocortical layers

The aim of the study was to investigate changes in activity of succinate dehydrogenase (SDH) in cytoplasm of neurons of different cortical layers in early and late reperfusion period after global cerebral ischemia in rats. Reversible global cerebral ischemia was modeled by occlusion of the brachiocephalic trunk, left subclavian artery and left common carotid artery for 10 minutes and following reperfusion during 2 or 7 days. The SDH activity in cytoplasm of neurons of II, III and V cortical layers was determined histoenzymatically. It is shown that the SDH activity in neurons of the studied cortical layers was characterized by the increased reperfusion period to the 2 days with a subsequent increased activity of the reperfusion period to the 7 days. The change in the SDH activity in cytoplasm of cortical neurons depends on the particular cerebral layer and duration of postischemic reperfusion.

Key words: cerebrum, ischemia/reperfusion, succinate dehydrogenase.