

Эффект ишемического посткондиционирования при экспериментальной глобальной ишемии ГОЛОВНОГО МОЗГА

Н.С. Щербак^{1,2}, М.М. Галагудза^{1,2}, Е.М. Нифонтов¹, Е.Р. Баранцевич^{1,2}, Е.В. Шляхто^{1,2}

¹ ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

² ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, Россия

Щербак Н.С. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии Института сердечно-сосудистых заболеваний ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» (СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова), ведущий научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития России (ФГУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»); Галагудза М.М. — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова», доцент кафедры патофизиологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Нифонтов Е.М. — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией неотложной кардиологии Института сердечно-сосудистых заболеваний СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Баранцевич Е.Р. — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой неврологии и мануальной медицины ФПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, заведующий НИО ангионеврологии Института сердца и сосудов ФГУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»; Шляхто Е.В. — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заслуженный деятель науки РФ, директор ФГУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова», заведующий кафедрой факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru (Щербак Наталия Сергеевна).

Резюме

Актуальность. Ишемическое посткондиционирование (ИПост) — эффективный механизм защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения, вызванного относительно кратковременной ишемией мозга. Тем не менее нейропротективный эффект посткондиционирования при продолжительной глобальной ишемии остается неизученным. **Цель исследования.** В нашей работе мы оценивали эффект ишемического посткондиционирования после продолжительной глобальной ишемии головного мозга у монгольских песчанок. **Материалы и методы.** Ишемию головного мозга моделировали двусторонней окклюзией общих сонных артерий. ИПост моделировали различным количеством эпизодов ишемии и реперфузии различной длительности, следующих за 30-минутной ишемией. Проводили оценку неврологических нарушений и летальности. **Результаты.** Было обнаружено, что моделирование эпизодов реперфузии/ишемии после 30-минутной глобальной ишемии мозга на исследуемой экспериментальной модели не оказывает нейропротективного эффекта независимо от длительности и количества посткондиционирующих стимулов. Более того, моделирование серии 2-минутных эпизодов реперфузии/ишемии после продолжительной ишемии приводит к нарастанию проявлений неврологического дефицита и к увеличению летальности. **Выводы.** ИПост неэффективно после достаточно продолжительной глобальной ишемии головного мозга у монгольских песчанок.

Ключевые слова: ишемическое посткондиционирование, глобальная ишемия, ишемия-реперфузия, головной мозг, монгольские песчанки.

Effect of ischemic postconditioning during experimental cerebral ischemia

N.S. Shcherbak^{1,2}, M.M. Galagudza^{1,2}, E.M. Nifontov¹, E.R. Barantsevitch^{1,2}, E.V. Shlyakhto^{1,2}

¹ Pavlov St Petersburg State Medical University, St Petersburg, Russia

² Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratov st., St Petersburg, Russia, 197341. E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru (Natalia S. Shcherbak, PhD of Biology science, Senior Researcher at Emergency Cardiology Laboratory of the Institution of Cardiovascular diseases at Pavlov St Petersburg State Medical University, Leading Researcher at Scientific Laboratory of Nanotechnology of the Experimental Medicine Institution at Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Background. Ischemic postconditioning (IPost) has been recognized as an effective mechanism of protection against ischemia-reperfusion cerebral injury. However, a neuroprotective effect of IPost against prolonged global cerebral ischemia-

reperfusion injury has not been studied yet. **Objective.** In the present study we investigated putative protective effect of IPost after prolonged global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. **Design and methods.** Cerebral ischemia was induced using bilateral carotid artery occlusion method. Ischemic postconditioning was elicited by different numbers of ischemic and reperfusion stimuli of different duration after 30-min. global cerebral ischemia. Neurologic deficit and mortality were analyzed. **Results.** We demonstrated that neuroprotective effect of IPost is not evident after prolonged global ischemia in Mongolian gerbils. Moreover, the use of 2-min. ischemia/reperfusion stimuli for IPost after prolonged ischemia results in enhanced manifestations of neurologic deficit and increased mortality. **Conclusion.** IPost is not effective after prolonged global cerebral ischemia in Mongolian gerbils.

Key words: ischemic postconditioning, global cerebral ischemia, ischemia-reperfusion, brain, Mongolian gerbils.

Статья поступила в редакцию: 05.03.11. и принята к печати: 11.03.11.

Введение

Ишемическое повреждение является одним из наиболее неблагоприятных патогенных факторов, вызывающих необратимые изменения в органах и тканях. Изучение эндогенных протективных механизмов, направленных на защиту тканей от ишемического и реперфузионного повреждения, может способствовать разработке новых медицинских технологий, направленных на уменьшение необратимого поражения органа, подвергшегося длительной ишемии. Необходимость таких исследований обусловлена тем, что сохранение жизнеспособности и функциональной полноценности ишемизированных органов за счет своевременного восстановления кровотока во многих случаях оказывается неосуществимым. К настоящему моменту ни один из исследованных лекарственных препаратов с доказанной в эксперименте нейропротективной активностью не получил общепризнанного применения в клинической практике [1]. Не изучены механизмы и возможности эндогенной нейропротекции, информация о защитном потенциале которой на сегодняшний день может быть получена преимущественно в экспериментальных исследованиях.

К эндогенным способам протекции тканей от ишемического и реперфузионного повреждения, то есть к способам защиты, заложенным в самих тканях в процессе эволюции, относят ишемическое прекодиционирование (ИПрек) и ишемическое посткодиционирование (ИПост). Впервые ИПрек было открыто Murry С.Е. et al. в 1986 г. при моделировании регионарной ишемии миокарда у собак [2]. Впоследствии эффекты ИПрек были обнаружены в экспериментах с ишемией головного мозга песчанок и крыс. Согласно современным представлениям, ИПрек подразумевает применение кратковременных ишемических стимулов, предшествующих длительной ишемии и способствующих мобилизации генетически детерминированных механизмов повышения устойчивости ткани к ишемии-реперфузии. Еще одним эндогенным способом защиты тканей от ишемического и реперфузионного повреждения является ИПост. Этот защитный феномен был открыт в 2003 г., когда было показано, что короткие повторные периоды ишемии миокарда по 30 секунд в период ранней реперфузии, выполненные после эпизода длительной ишемии, обеспечивают существенный кардиопротективный эффект [3]. Это явление было обнаружено во многих экспериментальных исследованиях на моделях ишемии-реперфузии миокарда [4]. Механизмы реперфузионного повреждения

сложны и включают метаболические нарушения, невосстановление кровотока (no-reflow), внутриклеточный отек и другие изменения, приводящие в итоге к некрозу и апоптозу клеток [5]. Протективная концепция ИПост основывается на том, что ткани могут быть защищены от реперфузионного повреждения посредством коротких эпизодов ишемии и реперфузии, выполненных в раннем реперфузионном периоде после длительной ишемии.

В экспериментальных исследованиях установлено, что реализация протективного потенциала эндогенных способов защиты тканей от ишемического и реперфузионного повреждения может зависеть от многих факторов: от продолжительности повреждающей ишемии, от частоты и длительности ишемических стимулов, предшествующих или следующих за продолжительной ишемией, от полноценности реперфузии, от минимального порогового времени ишемии до начала реперфузии, а также от видовой принадлежности, внутривидовой (индивидуальной) вариабельности и возраста. Механизмы эндогенных способов защиты миокарда в эксперименте изучены достаточно хорошо, и феномены ИПрек и ИПост уже сегодня находят применение в кардиохирургической практике [6]. Однако защитные феномены, повышающие устойчивость тканей головного мозга к ишемическому и реперфузионному повреждению, в экспериментальных исследованиях изучены недостаточно, а существующие результаты зачастую противоречат друг другу. Во многом это связано с функциональными особенностями высокоорганизованной нервной ткани, со сложным строением головного мозга, с использованием различных экспериментальных моделей ишемии, а также с видовой принадлежностью объекта экспериментального исследования и индивидуальной устойчивостью к острой гипоксии и последующей реперфузии. Только всестороннее исследование эндогенных способов защиты головного мозга в эксперименте позволит экстраполировать полученные результаты на человека и принять решение о возможности их применения в клинической практике.

В настоящей работе рассматривается вопрос об эффективности применения ИПост в отношении неврологических нарушений и смертности после относительно продолжительной глобальной ишемии переднего мозга у монгольских песчанок. Данная модель в силу уникальных анатомических особенностей кровоснабжения головного мозга песчанок позволяет создать обратимую ишемию переднего мозга и воспроизводит ситуацию резкого общего снижения перфузии головного мозга, наблюдаемую, в частности, при асфиксии новорожденных, которая за-

нимает одно из ведущих мест в структуре перинатальной заболеваемости и смертности, является одной из главных причин перинатальных поражений центральной нервной системы плода и новорожденного и инвалидизации и имеет огромное влияние на дальнейшее развитие ребенка и качество его жизни. Глубокая глобальная ишемия мозга может развиваться при операциях на открытом сердце в условиях искусственного кровообращения. Риск глубокой продолжительной ишемии повышен и у больных с распространенным атеросклеротическим поражением сосудов головного мозга.

Феномен ИПост теоретически может быть использован для профилактики возникновения неврологических нарушений при проведении хирургических операций на сосудах головы и шеи, но клинические исследования, посвященные этому вопросу, в настоящее время единичны. Во многом это связано с возникающими этическими трудностями из-за необходимости создания дополнительных эпизодов ишемии, а также с риском возникновения атероземболии при повторном пережатии сонных артерий.

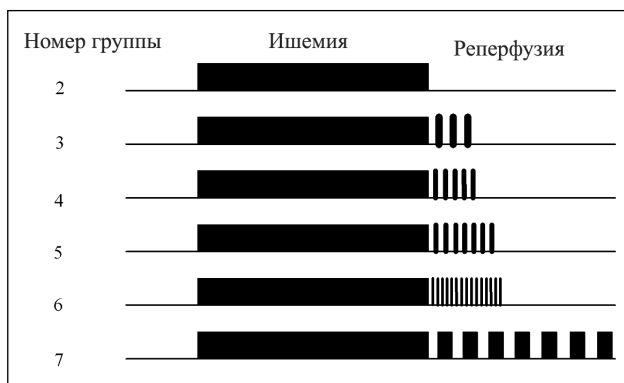
В единичных экспериментальных работах показано, что создание эпизодов ишемии-реперфузии оказывает протективный эффект при 5–15-минутной глобальной ишемии мозга [7]. Между тем в клинике чаще встречается более пролонгированная ишемия, а исследований об эффективности посткондиционирования при длительной ишемии нет. Неясно также, какое количество и какая продолжительность посткондиционирующих стимулов обеспечивает наилучший нейропротективный эффект.

Таким образом, целью нашего исследования стало изучение эффектов применения различных протоколов ИПост при моделировании 30-минутной обратимой глобальной ишемии переднего мозга у монгольских песчанок.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья, США № 85–23) и были одобрены локальным этическим комитетом. Исследование проводилось на монгольских песчанках — самцах (*Meriones unguiculatus*) массой 60–80 г («Ленинградский Зооло-

Рисунок 1. Протокол эксперимента



гический парк», Санкт-Петербург), содержащихся в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получавших стандартный корм. До начала экспериментов всех животных в течение нескольких дней приучали к рукам. Животных наркотизировали хлоралгидратом (450 мг/кг, внутривенно). Глобальную ишемию (ГИ) головного мозга моделировали двусторонней окклюзией общих сонных артерий, не затрагивая прилежащих нервных стволов и сплетений, с последующей 48-часовой реперфузией. ИПост моделировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на сонные артерии в раннем реперфузионном периоде согласно выбранному протоколу эксперимента, далее операционная рана послойно ушивалась. Животные были случайным образом разделены на следующие экспериментальные группы (рис. 1): 1) «Группа 1» — ложнооперированные животные, которым проводили все хирургические манипуляции, кроме окклюзии общих сонных артерий, n = 7; 2) «Группа 2» (контрольная группа) — 30-минутная ГИ с последующей 48-часовой реперфузией, n = 12; 3) «Группа 3» — 30-минутная ГИ с последующими 3 эпизодами реперфузии/реокклюзии по 30/30 сек., n = 7; 4) «Группа 4» — 30-минутная ГИ с последующими 5 эпизодами реперфузии/реокклюзии по 10 сек./10 сек., n = 7; 5) «Группа 5» — 30-минутная ГИ с 7 эпизодами реперфузии/реокклюзии по 10 сек./10 сек., n = 11; 6) «Группа 6» — 30-минутная ГИ с 15 эпизодами реперфузии/реокклюзии по 5/5 сек., n = 8; 7) «Группа 7» — 30-минутная ГИ с 7 эпизодами реперфузии/реокклюзии по 2/2 мин., n = 7.

Таблица 1

ШКАЛА ОЦЕНКИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК (*MERIONES UNGUICULATUS*) (MCGRAW C.P., 1977) С МОДИФИКАЦИЯМИ (OHNO K. ET AL., 1984)

| № | Неврологический симптом | Индекс повреждения, баллы |
|----|---|---------------------------|
| 1. | Взъерошенность волосяного покрова или тремор | 1 |
| 2. | Притупление чувствительности, вялость, замедленность движений | 1 |
| 3. | Изменения слуха (прижатие ушей) | 1 |
| 4. | Запрокидывание головы | 3 |
| 5. | Птоз | 2 |
| 6. | Парез конечностей | 3 |
| 7. | Манежные движения | 3 |
| 8. | Судороги или двигательная гиперактивность | 3 |
| 9. | Коматозное состояние | 6 |

Все хирургические вмешательства проводились на термостатируемом операционном столе при температуре 37 °С. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла. Для оценки неврологических нарушений, вызванных глобальной ишемией головного мозга, применяли метод оценки неврологического дефицита по шкале оценки инсульта (stroke-index) McGraw [8] с модификациями, предложенными К. Ohno et al. в 1984 г. (табл. 1). Итоговый балл высчитывали как сумму баллов, оценивающих отдельные неврологические симптомы. При этом значение итогового балла 23 свидетельствовало о максимальной выраженности неврологических нарушений, а 0 баллов — об их отсутствии. Также проводили оценку влияния различных протоколов ИПост на общую летальность животных к концу первых и вторых суток после моделирования ишемии. Общую летальность вычисляли как отношение количества невыживших животных к концу первых или вторых суток эксперимента к общему числу животных в каждой группе, использованных в эксперименте.

Статистический анализ. Данные представлены как медиана (М) и размах между минимумом и максимумом

(min-max). Достоверность различий оценивали при помощи точного критерия Фишера и U критерия Манна-Уитни с использованием программы «Statistica 6.0». Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

В группе ложнооперированных все животные успешно перенесли хирургическую операцию и в 100 % случаев выжили к 48 часам после операции. В первые сутки после хирургической операции при оценке неврологических отклонений только у одной песчанки из ложнооперированной группы наблюдались умеренные неврологические нарушения в виде вялости и замедленности движений, которые ко вторым суткам исчезли.

После ишемии, вызванной 30-минутной окклюзией общих сонных артерий практически у всех животных контрольной группы и у животных экспериментальных групп с применением ИПост в различных вариантах протокола возникали признаки неврологического нарушения в виде вялости, тремора, птоза, прижатия ушей, постшемической двигательной гиперактивности, парезов, судорог, резкого ограничения подвижности, коматозного состояния (табл. 2).

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ ДЕФИЦИТ (ПО ШКАЛЕ MCGRAW С.Р., 1977, С МОДИФИКАЦИЯМИ OHNO К. ET AL., 1984) У МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК (MERIONES UNGUICULATUS) НА 1-Е И 2-Е СУТКИ ПОСЛЕ 30-МИНУТНОЙ ОБРАТИМОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

| Неврологический симптом | Экспериментальная группа | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------------|-------|-----------------------------|--------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------|
| | «Группа 1» n = 7 (%) | | «Группа 2» n = 12 (%) | | «Группа 3» n = 7 (%) | | «Группа 4» n = 7 (%) | | «Группа 5» n = 11 (%) | | «Группа 6» n = 8 (%) | | «Группа 7» n = 7 (%) | |
| | 24 ч. | 48 ч. | 24 ч. | 48 ч. | 24 ч. | 48 ч. | 24 ч. | 48 ч. | 24 ч. | 48 ч. | 24 ч. | 48 ч. | 24 ч. | 48 ч. |
| Взъерошенность волосяного покрова или тремор | 0 | 0 | 5/12 41,7 | 7/11 63,6 | 4/7 57,1 | 1/4 25,0 | 4/7 57,1 | 2/4 50,0 | 6/11 54,5 | 4/9 44,4 | 3/8 37,5 | 4/7 57,1 | 2/7 28,6 | — |
| Притупление чувствительности, вялость, замедленность движений | 1/7 14,3 | 0 | 5/12 41,7 | 7/11 63,6 | 4/7 57,1 | 1/4 25,0 | 3/7 42,9 | 2/4 50,0 | 5/11 45,7 | 3/9 33,3 | 3/8 37,5 | 4/7 57,1 | 2/7 28,6 | — |
| Изменения слуха (прижатие ушей) | 0 | 0 | 0 | 2/11 18,2 | 2/7 28,6 | 1/4 25,0 | 1/7 14,3 | 0 | 2/11 18,2 | 2/9 22,2 | 1/8 12,5 | 1/7 14,3 | 1/7 14,3 | — |
| Запрокидывание головы | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/7 14,3 | 1/4 25,0 | 1/7 14,3 | 1/4 25,0 | 1/11 9,1 | 1/9 11,1 | 0 | 0 | 1/7 14,3 | — |
| Птоз | 0 | 0 | 6/12 50,0 | 6/11 54,5 | 3/7 42,9 | 2/4 50,0 | 4/7 57,1 | 3/4 75,0 | 4/11 36,4 | 4/9 44,4 | 4/8 50,0 | 4/7 57,1 | 2/7 28,6 | — |
| Парез конечностей | 0 | 0 | 3/12 25,0 | 3/11 27,3 | 1/7 14,3 | 1/4 25,0 | 2/7 28,6 | 1/4 25,0 | 3/11 27,3 | 3/9 33,3 | 2/8 25,0 | 2/7 28,6 | 0 | — |
| Маневренные движения | 0 | 0 | 0 | 1/11 9,1 | 1/7 14,3 | 1/4 25,0 | 1/7 14,3 | 1/4 25,0 | 3/11 27,3 | 3/9 33,3 | 1/8 12,5 | 1/7 14,3 | 1/7 14,3 | — |
| Судороги или двигательная гиперактивность | 0 | 0 | 4/12 33,3 | 5/11 45,5 | 2/7 28,6 | 2/4 50,0 | 2/7 28,6 | 1/4 25,0 | 2/11 18,2 | 2/9 22,2 | 2/8 25,0 | 2/7 28,6 | 1/7 14,3 | — |
| Коматозное состояние | 0 | 0 | 1/12 8,3 | 2/11 18,2 | 2/7 28,6 | 1/4 25,0 | 1/7 14,3 | 1/4 25,0 | 2/11 18,2 | 3/9 33,3 | 1/8 12,5 | 1/7 14,3 | 2/7 28,6 | — |

Таблица 3

ИНДЕКС НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА (ПО ШКАЛЕ MCGRAW С.Р., 1977, С МОДИФИКАЦИЯМИ ОННО К. ET AL., 1984) НА 1-Е И 2-Е СУТКИ У МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК (*MERIONES UNGUICULATUS*) ПРИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА С ПРИМЕНЕНИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

| | Экспериментальная группа M _c (min-max) | | | | | | |
|-----------|--|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | «Группа 1» n = 7 | «Группа 2» n = 12 | «Группа 3» n = 7 | «Группа 4» n = 7 | «Группа 5» n = 11 | «Группа 6» n = 8 | «Группа 7» n = 7 |
| 1-е сутки | 0,14 (0–1) | 4,5 (3–8) | 10,8* (8–14) | 10,0* (7–13) | 6,7** (4–10) | 4,9 (4–8) | 14,0* (14–14) |
| 2-е сутки | 0 | 7,4 (6–10) | 14,0* (12–16) | 9,3** (8–10) | 12,4* (10–13) | 7,6 (7–11) | – |

Примечание: * — значимые различия ($p < 0,01$) при сравнении с «Группой 2»; ** — значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении с «Группой 2».

Таблица 4

ОБЩАЯ ЛЕТАЛЬНОСТЬ (%) ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ОБРАТИМОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК (*MERIONES UNGUICULATUS*) С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОКОЛОВ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

| | Экспериментальная группа | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | «Группа 1» n = 7 | «Группа 2» n = 12 | «Группа 3» n = 7 | «Группа 4» n = 7 | «Группа 5» n = 11 | «Группа 6» n = 8 | «Группа 7» n = 7 |
| Общая летальность на 1-е сутки | 0/0 (0) | 1/12 (8,3) | 3/7 (42,9) | 3/7 (42,9) | 2/11 (18,2) | 1/8 (12,5) | 5/7* (71,4) |
| Общая летальность на 2-е сутки | 0 (0) | 3/12 (25,0) | 5/7 (71,4) | 4/7 (57,1) | 6/11 (54,5) | 3/8 (37,5) | 7/7** (100) |

Примечание: * — значимые различия ($p = 0,095$) при сравнении с «Группой 2»; ** — значимые различия ($p = 0,0024$) при сравнении с «Группой 2».

В группе контроля средний балл неврологического дефицита в первые сутки наблюдений составил 4,5 (min 3 — max 8) и ко вторым суткам он значимо повысился до 7,4 (min 6 — max 10) (Uэмп. = 8,5; $p < 0,01$) (табл. 3). При сравнении среднего балла неврологического дефицита, регистрируемого в первые и вторые сутки наблюдений, между контрольной группой и группами с применением ИПост были обнаружены следующие закономерности. Так, в первые сутки в группах 3, 4, 5 и 7 применение ИПост в различных вариантах протокола приводило к значимому увеличению неврологического дефицита при сравнении с контрольной группой (Uэмп. = 0,5, $p < 0,01$; Uэмп. = 1,0, $p < 0,01$; Uэмп. = 2,0, $p < 0,05$ и Uэмп. = 0, $p < 0,01$ соответственно). Ко вторым суткам наблюдений статистически значимые различия в выраженности неврологических нарушений сохранились между группой контроля и группами 3, 4 и 5 (Uэмп. = 0; $p < 0,01$; Uэмп. = 3,5; $p < 0,05$; Uэмп. = 0,5; $p < 0,01$ соответственно). В то же время в группе 6 применение 15 эпизодов ИПост по 5/5 сек. не приводило к увеличению неврологического дефицита ни в первые сутки наблюдений (Uэмп. = 32,5; $p > 0,05$), ни во вторые (Uэмп. = 22,5; $p > 0,05$) (табл. 3).

К концу первых суток в контрольной группе общая летальность составляла 8,3 % и к концу вторых суток она

увеличилась почти в 3 раза, составив 25,0 % ($p > 0,05$). Применение различных протоколов ИПост приводило к увеличению летальности во всех экспериментальных группах (табл. 4). Степень увеличения летальности зависела от протокола применения ишемических и реперфузионных стимулов, следующих за продолжительной ишемией. Так, при сравнении с контрольной группой наиболее значимое увеличение летальности наблюдалось при применении 7 эпизодов реперфузии/реокклюзии по 2/2 мин. как в первые сутки ($p = 0,0095$), так и через 48 часов после 30-минутной глобальной ишемии мозга ($p = 0,0024$).

По степени нарастания индекса неврологического дефицита группы распределились следующим образом: 2, 6, 4, 5, 3, 7. Сходным образом группы распределились по мере нарастания показателя летальности: 2, 6, 5, 4, 3, 7. Группы 4 и 5, различающиеся только количеством посткондиционирующих стимулов (5 и 7 соответственно), не продемонстрировали различий ни по выраженности неврологического дефицита, ни по показателю летальности.

Таким образом, применение посткондиционирующих стимулов на данной модели после глобальной 30-минутной ишемии мозга приводит к возрастанию неврологического дефицита и летальности. Эти пока-

затели возрастают с увеличением продолжительности посткондиционирующих стимулов.

Обсуждение

Обратимая продолжительная ишемия, вызванная одномоментной билатеральной окклюзией общих сонных артерий у монгольских песчанок, в нашем исследовании приводила к развитию неврологического дефицита различной степени выраженности у всех особей, использованных в данном исследовании. Различная степень проявления неврологических симптомов во многом зависит от индивидуальной чувствительности каждого животного к острой ишемии. Известно, что у всех млекопитающих кровоснабжение головного мозга осуществляется посредством двух коллатеральных систем: виллизиева круга (большой объем кровоснабжения) и лептоменингеальных анастомозов. Животные, имеющие видовую принадлежность к *Meriones unguiculatus*, имеют особенность — незамкнутый виллизиев круг, поэтому при окклюзии общих сонных артерий кровоснабжение переднего мозга прекращается и развивается острая ишемия. Впервые использование монгольских песчанок для моделирования ишемии головного мозга было предложено в 1966 г. [10].

В группе с моделированием 30-минутной обратимой окклюзии общих сонных артерий ко вторым суткам наблюдалось увеличение количества животных с нарастающим неврологическим симптомом, возрастание индекса неврологического дефицита и увеличение летальности. Такое нарастание проявлений повреждения в позднем постишемическом периоде может объясняться феноменом «отсроченной гибели нейронов» («delayed neuronal death»), впервые обнаруженным Т. Kirino в 1982 г. в экспериментах на песчанках. Было показано, что обратимая глобальная ишемия приводит к гибели клеток гиппокампа, которая нарастает к 48 часам после ишемии [11]. Позднее это явление отсроченной гибели нейронов было подтверждено в многочисленных исследованиях на песчанках, крысах, кроликах [7].

После достаточно длительной ишемии, приводящей к гибели нейронов, последующая реперфузия обладает дополнительным повреждающим действием. Известно, что реперфузионный синдром часто встречается в клинической практике, например, при пересадке органов, после реконструктивных операций на сосудах, экстренных чрескожных коронарных вмешательств, успешной реанимации и при других состояниях. При исследовании ИПост на миокарде было установлено, что ИПост ослабляет вызванную реперфузией дисфункцию эндотелия окклюзированной коронарной артерии [3]. Многие исследователи отмечают определенное сходство ИПрек и ИПост вне зависимости от органа и ткани, в которых они реализуются. Известно, что короткие ишемические стимулы, предшествующие перманентной ишемии, не способны вызвать защитный эффект в силу того, что стимуляция клеточного цитопротективного ответа не предотвращает наступления ишемического некроза, а только замедляет его формирование. Существует одна работа по изучению нейропротекторного эффекта ИПост

в зависимости от длительности предшествующей ишемии головного мозга. Исследование было проведено на модели постоянной фокальной ишемии головного мозга у крыс. Так, после постоянной окклюзии средней мозговой артерии и билатеральной окклюзии общих сонных артерий на 15, 30 и 60 мин. применяли 4 эпизода 20-секундной окклюзии с 30-секундными эпизодами реперфузии сонных артерий. Было обнаружено, что применение ИПост уменьшало площадь повреждения на 80 % при 15-минутной ишемии, на 51 % при 30-минутной ишемии и на 17 % при 60-минутной окклюзии общих сонных артерий [5]. Необходимо уточнить, что в вышеуказанной работе фокальная ишемия моделировалась путем постоянной окклюзии средней мозговой артерии, кровоснабжающей в основном только кору головного мозга, а ишемические стимулы производились при помощи окклюзии общих сонных артерий. Таким образом, нейропротекторное действие ИПост реализовалось фактически в зоне пенумбры, а ишемическим стимулам подвергалась часть головного мозга, кровоснабжающаяся из общих сонных артерий. Экспериментальных исследований, направленных на исследование возможных защитных эффектов ИПост при продолжительной глобальной ишемии головного мозга, на сегодняшний момент не существует.

Эффективность применения ИПост ограничена жесткими временными рамками. Так, при исследовании кардиопротективного эффекта ИПост первый ишемический стимул моделируется уже через 10–30 сек. реперфузии, а продолжительность ишемического стимула составляет от 10 до 30 сек. [12]. С другой стороны, общепринятого протокола индукции ИПост не существует, и каждый коллектив исследователей вырабатывает протокол, базируясь на собственных данных. В нашей работе применялись различные варианты протокола. Первый ишемический стимул после 30-минутной глобальной ишемии головного мозга монгольской песчанки применяли спустя 5, 10 и 30 сек. и 2 мин., причем число ишемических стимулов было различным. Ни один из примененных протоколов ИПост не обладал нейропротективным действием. Более того, индекс неврологического дефицита возрастал во всех исследуемых группах пропорционально длительности посткондиционирующих стимулов, увеличивался и показатель летальности. В наибольшей степени исследуемые показатели ухудшались в группе 7 при применении протокола ИПост, где первый ишемический стимул применялся после 2 мин. реперфузии и далее следовали 7 эпизодов реперфузии/реокклюзии по 2 мин. Объяснением наблюдаемого нарастающего повреждающего эффекта при применении ИПост могут служить два обстоятельства: во-первых, длительность времени от момента окончания ишемии до начала первого ишемического стимула, возможно, играет ключевую роль при реализации защитного эффекта ИПост, во-вторых, суммарное дополнительное время ишемии при этом составило 14 мин., что само по себе привнесло дополнительный повреждающий ишемический эффект. Так, в исследовании на модели постоянной фокальной ишемии с применением ИПост путем окклюзии двух общих сонных артерий у крыс

было установлено, что 3 эпизода, 30 сек. реперфузия/10 сек. окклюзия, а не 10 эпизодов реперфузии/ишемии обладали нейропротекторным действием, в то время как 10 эпизодов по 10 сек. реперфузии/10 сек. реокклюзии, а не 3 эпизода обладали инфаркт-лимитирующей способностью [13]. Применение стимулов ишемии/реперфузии после 3 мин. реперфузии, следующей за ишемией, приводило к потере нейропротекторного действия ИПост [13]. В другом исследовании при моделировании 10-минутной глобальной ишемии ГМ у крыс было установлено, что протокол с применением ишемических стимулов после 60 сек. реокклюзии не обладал нейропротективным эффектом [14]. В исследовании на кроликах было обнаружено, что ИПост с одномоментной реокклюзией после одномоментной реперфузии защищает спинной мозг от ишемического повреждения [15]. В исследованиях на сердце было установлено: чем меньше животное, тем меньше соответственно и размер сердца, тем короче должны быть ишемические стимулы, а на экспериментальных моделях, где используются более крупные животные, имеющие более низкую скорость метаболических процессов, необходимо использовать более продолжительные стимулы [4]. Таким образом, мы предполагаем, что различные животные для достижения нейропротекторного эффекта нуждаются в различной стратегии применения реперфузии/реокклюзии.

Кардиопротективный эффект ИПост был обнаружен в экспериментальных исследованиях, проведенных на собаках, свиньях, кроликах, крысах, мышах, и в клинических наблюдениях на пациентах с острым инфарктом миокарда. Несмотря на то, что нейропротективный эффект ИПост доказан в достаточном количестве экспериментальных исследований, остаются сложности применения его в клинической практике. Будущие исследования должны быть направлены на изучение фундаментальных защитных механизмов, изучение продолжительности времени терапевтического окна на различных экспериментальных моделях животных различных видов, полов и возрастов.

Таким образом, в экспериментах на выбранной нами модели установлено, что моделирование эпизодов ишемии/реперфузии после 30-минутной глобальной ишемии мозга не только не оказывает нейропротективного эффекта независимо от длительности и количества посткондиционирующих стимулов, но способствует нарастанию неврологического дефицита и увеличивает летальность. Очевидно, что ключевыми факторами, определяющими эффективность ИПост, является продолжительность предшествующей ишемии. По-видимому, критическое превышение продолжительности глобальной ишемии сопряжено с возникновением необратимого ишемического повреждения нейронов в зоне ишемии и определяет неэффективность последующего ишемического посткондиционирования.

Литература

1. Sandercock P., Berge E., Dennis M. et al. A systematic review of the effectiveness, cost-effectiveness and barriers to implementation of thrombolytic and neuroprotective therapy for acute ischaemic stroke in the NHS // *Health Technol. Assess.* — 2002. — Vol. 6, № 26. — P. 1–112.

2. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation.* — 1986. — Vol. 74, № 5. — P. 1124–1136.
3. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2003. — Vol. 285, № 2. — P. H579–H588.
4. Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q., Zatta A.J. et al. Postconditioning — a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury // *Basic Res. Cardiol.* — 2005. — Vol. 100, № 4. — P. 295–310.
5. Zhao H., Sapolsky R.M., 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. — Vol. 26, № 9. — P. 1114–1121.
6. Rezkalla S.H., Kloner R.A. Preconditioning in humans // *Heart Fail. Rev.* — 2007. — Vol. 12, № 3–4. — P. 201–206.
7. Mitani A., Kataoka K. Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study // *Neuroscience.* — 1991. — Vol. 42, № 3. — P. 661–670.
8. McGraw C.P. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils // *Arch. Neurol.* — 1977. — Vol. 34, № 6. — P. 334–336.
9. Ohno K., Ito U., Inaba Y. Regional cerebral blood flow and stroke index after left carotid artery ligation in the conscious gerbil // *Brain Res.* — 1984. — Vol. 297, № 1. — P. 151–157.
10. Levine S., Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) // *Exp. Neurol.* — 1966. — Vol. 16, № 3. — P. 255–262.
11. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // *Brain Res.* — 1982. — Vol. 239, № 1. — P. 57–69.
12. Boengler K., Buechert A., Heinen Y. et al. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice // *Circ. Res.* — 2008. — Vol. 102, № 1. — P. 131–135.
13. Gao X., Ren C., Zhao H. Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning // *J. Neurosci. Res.* — 2008. — Vol. 86, № 11. — P. 2505–2511.
14. Wang J., Shen J., Gao Q. et al. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats // *Stroke.* — 2008. — Vol. 39, № 3. — P. 983–990.
15. Jiang X., Shi E., Nakajima Y., Sato S. Postconditioning, a series of brief interruptions of early reperfusion, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia // *Ann. Surg.* — 2006. — Vol. 244, № 1. — P. 148–153.