

Роль АМРА-рецепторов в механизмах нейропротективного эффекта ишемического посткондиционирования головного мозга

Н. С. Щербак^{1,2}, М. М. Галагудза^{1,2}, Г. Ю. Юкина¹,
Е. Р. Баранцевич^{1,2}, В. В. Томсон¹, Е. В. Шляхто^{1,2}

¹ Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Щербак Наталия Сергеевна,
ФГБУ «СЗФМИЦ» Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Статья поступила в редакцию
10.11.14 и принята к печати 20.02.15.

Резюме

Цель исследования — изучить роль АМРА-рецепторов в реализации нейропротективного эффекта ишемического посткондиционирования (ИПостК) при обратимой глобальной ишемии переднего мозга у монгольских песчанок. **Материалы и методы.** Обратимую глобальную ишемию головного мозга моделировали двухсторонней окклюзией общих сонных артерий у монгольских песчанок в течение 7 минут. ИПостК было индуцировано тремя 15-секундными эпизодами реперфузии/реокклюзии. Антагонист АМРА-рецепторов NBQX вводили однократно внутривентрикулярно на второй минуте ишемии в дозе 30 мг/кг. В раннем и отдаленном реперфузионном периоде оценивали количество жизнеспособных нейронов в СА1, СА2, СА3 и СА4 полях гиппокампа. **Результаты.** Обратимая 7-минутная ишемия спустя 48 часов реперфузии приводила к значимому уменьшению числа жизнеспособных нейронов в полях СА1 и СА3 гиппокампа, в отдаленном реперфузионном периоде (7 суток) значимое уменьшение числа жизнеспособных нейронов отмечалось в полях СА1, СА3 и СА4. Применение ИПостК приводило к увеличению числа жизнеспособных нейронов в полях СА1 и СА3 гиппокампа в раннем реперфузионном периоде и в полях СА1, СА3 и СА4 — в позднем. Совместное применение ИПостК и антагониста АМРА-рецепторов NBQX сопровождалось ослаблением нейропротективного эффекта первого до уровня, сопоставимого по выраженности с эффектом отдельного применения антагониста АМРА-рецепторов NBQX для нейронов СА1 и СА3 полей гиппокампа. **Выводы.** В механизмы реализации нейропротективного эффекта ИПостК наряду с другими процессами вовлечена активация АМРА-рецепторов.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия, ишемическое посткондиционирование, АМРА-рецепторы, NBQX, головной мозг, гиппокамп, песчанки монгольские.

Для цитирования: Щербак Н. С., Галагудза М. М., Юкина Г. Ю., Баранцевич Е. Р., Томсон В. В., Шляхто Е. В. Роль АМРА-рецепторов в механизмах нейропротективного эффекта ишемического посткондиционирования головного мозга. Артериальная гипертензия. 2015;21(2):155–163.

The role of AMPA-receptors in mechanisms of neuroprotective effect of cerebral ischemic postconditioning

N. S. Shcherbak^{1,2}, M. M. Galagudza^{1,2}, G. Yu. Yukina¹,
E. R. Barantsevich^{1,2}, V. V. Thomson¹, E. V. Shlyakhto^{1,2}

¹ First Pavlov State Medical University of St. Petersburg,
St Petersburg, Russia

² North-West Federal Medical Research Centre, St Petersburg,
Russia

Corresponding author:

Natalia S. Shcherbak,
Institute of Experimental Medicine,
Federal North-West Medical Research
Centre, 2 Akkuratov st., St Petersburg,
197341 Russia.
E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Received 10 November 2014;
accepted 20 February 2015.

Abstract

Objective. The purpose of the study is to explore the role of AMPA receptors in the neuroprotective effect of ischemic postconditioning (IPost) in the model of reversible global forebrain ischemia in Mongolian gerbils. **Design and methods.** Reversible global cerebral ischemia was induced by bilateral occlusion of common carotid arteries in Mongolian gerbils for 7 minutes. IPost was induced by three 15-s episodes of reperfusion/reocclusion. Antagonist of AMPA receptors NBQX was administered intraperitoneally at 2nd minute of ischemia at a dose of 30 mg/kg. In the early and delayed reperfusion period, the number of viable neurons in the CA1, CA2, CA, and CA4 fields of the hippocampus was estimated. **Results.** Reversible 7 minutes ischemia followed by 48 hours of reperfusion resulted in a significant reduction in the number of viable neurons in the fields CA1 and CA3 of the hippocampus, while in the late reperfusion period a significant reduction in the number of viable neurons was observed in fields CA1, CA3 and CA4. Application of IPost has led to an increase in the number of viable neurons in fields CA1 and CA3 in the early reperfusion period and in fields CA1, CA3 and CA4 — in delayed period. AMPA receptor antagonist NBQX attenuated neuroprotective effect of IPost to a level comparable with the effect of a separate application of NBQX for neurons in the CA1 and CA3 fields of the hippocampus. **Conclusions.** Along with other mechanisms, the activation of AMPA receptors might be implicated in the mechanisms of cerebral IPost.

Key words: ischemia-reperfusion, ischemic postconditioning, AMPA receptors, NBQX, brain, hippocampus, Mongolian gerbil.

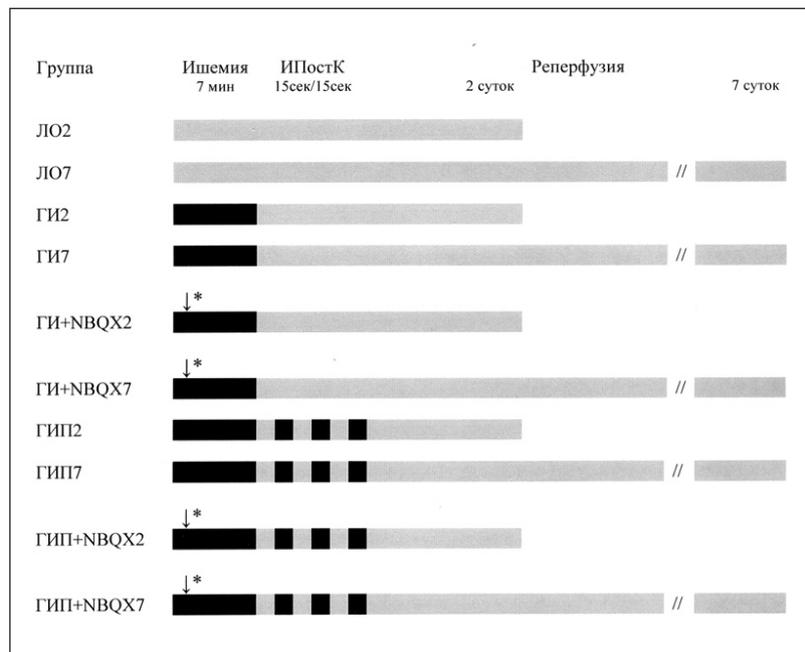
For citation: Shcherbak NS, Galagudza MM, Yukina GYu, Barantsevich ER, Thomson VV, Schlyakhto EV. The role of AMPA-receptors in mechanisms of neuroprotective effect of cerebral ischemic postconditioning. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2015;21(2):155–163.

Введение

Острые нарушения церебрального кровообращения остаются основной причиной инвалидизации и смертности, представляя серьезную медико-социальную проблему во всем мире. Несмотря на значительные успехи в понимании патогенеза ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга, применение стандартной терапии не всегда оказывается успешным. Поэтому поиск новых способов и подходов, направленных на огра-

ничение площади повреждения, представляется актуальным [1]. Одним из таких воздействий является ишемическое посткондиционирование (ИПостК) головного мозга, которое воспроизводится путем создания нескольких кратковременных эпизодов ишемии в раннем реперфузионном периоде после тестовой ишемии [2]. Сегодня активно изучаются механизмы формирования устойчивости нервной ткани к реперфузионному повреждению при применении ИПостК с целью дальнейшего внедрения

Рисунок. Схема протокола эксперимента, направленного на изучение роли AMPA-рецепторов в реализации нейропротективного эффекта ишемического посткондиционирования на модели глобальной ишемии-реперфузии переднего мозга у монгольских песчанок



Примечание: ИПостК — ишемическое посткондиционирование; ↓* — внутрибрюшинное введение NBQX в дозе 30 мг/кг; ЛО2 (n = 8) — группа ложнооперированных животных; длительность реперфузионного периода после проведения хирургических манипуляций составляла 2 суток; ЛО7 (n = 7) — ложнооперированные животные, длительность реперфузии — 7 суток; ГИ2 (n = 7) — ишемия + реперфузия в течение 2 суток + физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; ГИ7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; ГИ+NBQX2 (n = 8) — ишемия + реперфузия 2 суток + NBQX; ГИ + NBQX7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; ГИPI2 (n = 8) — ишемия + ИПостК + реперфузия в течение 2 суток + физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; ГИPI7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; ГИPI + NBQX2 (n = 7) — ишемия + ИПостК + реперфузия 2 суток + NBQX; ГИPI + NBQX7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток.

данного протективного воздействия в клиническую практику. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что одним из механизмов нейропротективного эффекта ИПостК может являться ослабление проявлений феномена эксайто-токсичности. Наряду с NMDA- и каинатными рецепторами, ключевая роль в реализации эксайто-токсичности принадлежит постсинаптическим рецепторам альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой кислоты (AMPA-рецепторам) [3]. Целый ряд работ свидетельствует о том, что применение блокаторов AMPA-рецепторов в периоде реперфузии способствует сохранению жизнеспособности нейронов [4–6]. При этом роль AMPA-рецепторов в механизмах формирования нейропротективного эффекта ИПостК головного мозга остается неизученной.

Цель исследования — изучить роль AMPA-рецепторов в реализации нейропротективного эффекта ИПостК при обратимой глобальной ишемии переднего мозга у монгольских песчанок.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этических комитетов ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России и ФГБУ «СЗФМИЦ» Минздрава России, а также в соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных и уходу за ними» (публикация Национального Института Здоровья США № 85–23).

Исследование выполнено на самцах монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) массой 60–80 г, наркотизированных хлоралгидратом (450 мг/кг, внутрибрюшинно). Обратимую глобальную ишемию переднего мозга моделировали двухсторонней окклюзией общих сонных артерий на 7 минут с последующей реперфузией в течение 48 часов или 7 суток (рис.). Протокол ИПостК включал 3 эпизода реперфузии-ишемии по 15/15 секунд, выполненных непосредственно после завершения 7-минутной ишемии. Антагонист AMPA-рецепторов NBQX (2,3-дигидрокси-6-нитро-7-сульфамоил-бензо (Ф) ксиноксалин, Abcam, США)

вводили однократно внутривенно на второй минуте от начала ишемии в дозе 30 мг/кг. Животные были случайным образом разделены на следующие экспериментальные группы: 1) ЛО2 (n = 8) — в группу входили ложнооперированные животные; длительность реперфузионного периода после проведения хирургических манипуляций составляла 2 суток. Животным внутривенно вводили физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; 2) ЛО7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток; 3) ГИ2 (n = 7) — ишемия + реперфузия в течение 2 суток + физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; 4) ГИ7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток; 5) ГИ+NBQX2 (n = 8) — ишемия + реперфузия 2 суток + NBQX; 6) ГИ + NBQX7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток; 7) ГИП2 (n = 8) — ишемия + ИПостК + реперфузия в течение 2 суток + физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; 8) ГИП7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток; 9) ГИП + NBQX2 (n = 7) — ишемия + ИПостК + реперфузия 2 суток + NBQX; 10) ГИП + NBQX7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии составляла 7 суток.

Температура тела животных поддерживалась на уровне $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После завершения реперфузионного периода животных повторно наркотизировали и декапитировали, извлекали мозг из полости черепа, выделяли его сегменты, содержащие гиппокамп, фиксировали их в 10-процентном нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Для морфометрической оценки фронтальные срезы толщиной 3 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу монгольской песчанки (*bregma* $-1,7 \pm 0,2$ мм) [7], окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля; под световым микроскопом DM750 (Leica, Германия) на нескольких срезах гиппокампа при увеличении $\times 400$ подсчитывали количество сохранивших жизнеспособность пирамидных нейронов в полях СА1, СА2, СА3 и СА4 гиппокампа. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм пирамидного слоя гиппокампа. Учитывались клетки, сохранившие жизнеспособность и содержащиеся в площади среза ядрышко [8]. Жизнеспособность нейронов оценивали в соответствии со следующими критериями: четко очерченное ядро эллипсоидной или округлой формы; ясно различимые ядрыш-

ки, расположенные в центре ядра; ядро немного темнее, чем окружающий нейропил; цитоплазма нейронов четко отграничена от окружающего нейропила [9].

Результаты обрабатывались статистически с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки. Поскольку распределение анализируемых величин является нормальным, значимость различий между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента с использованием программы «Statistica 6.0». Различия учитывались как значимые при $p < 0,05$.

Результаты

При изучении морфологических особенностей нейронов гиппокампа в группах ложнооперированных песчанок (ЛО2 и ЛО7) не наблюдалось дистрофических изменений или потери жизнеспособности пирамидных нейронов в анализируемых полях гиппокампа. Через 48 часов после моделирования глобальной ишемии переднего мозга в группе ГИ2 в различных полях гиппокампа отмечались нейроны с морфологическими изменениями и перикалликулярный отек. При этом в полях СА1 и СА3 отмечалась наибольшая редукция числа морфологически неизмененных пирамидных нейронов. Число жизнеспособных нейронов в полях СА1 и СА3 снижалось на 75,1% ($p < 0,001$) и 45,1% ($p < 0,01$) соответственно при сравнении с группой ЛО2 (табл.). В полях СА2 и СА4 гиппокампа ишемия и реперфузия в течение 48 часов приводила к менее выраженному повреждению, так как число жизнеспособных нейронов в этих полях при сравнении с группой ЛО2 уменьшалось на 1,8 и 9,8% соответственно ($p > 0,05$) (табл.). Увеличение реперфузионного периода до 7 суток (группа ГИ7) приводило к нарастанию редукции числа жизнеспособных нейронов гиппокампа. В наибольшей степени страдали нейроны полей СА1, СА3 и СА4, в которых число жизнеспособных нейронов уменьшалось на 80,3% ($p < 0,001$), 55,6% ($p < 0,01$) и 21,7% ($p < 0,05$) соответственно. При этом уменьшение числа жизнеспособных нейронов в поле СА2 было статистически незначимым ($p > 0,05$) (табл.).

Применение антагониста AMPA-рецепторов NBQX приводило к увеличению числа жизнеспособных пирамидных нейронов в полях СА1 и СА3 гиппокампа. Так, в группе ГИНBQX2 отмечалось увеличение числа жизнеспособных нейронов в поле СА1 и СА3 на 46,9% ($p < 0,01$) и 15,5% ($p < 0,05$) соответственно при сравнении с группой ГИ2 (табл.). В полях СА2 и СА4 применение NBQX не приводило к существенному изменению числа жизне-

**КОЛИЧЕСТВО ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ НЕЙРОНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ПОЛЯХ ГИППОКАМПА
МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУППАХ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ
И АНТАГОНИСТА АМРА-РЕЦЕПТОРОВ NBQX ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Экспериментальная группа	Количество жизнеспособных нейронов/мм			
	поле гиппокампа			
	CA1	CA2	CA3	CA4
ЛО2	354,4 ± 8,8	210,2 ± 10,4	212,4 ± 9,8	128,4 ± 11,3
ЛО7	348,8 ± 10,4	214,4 ± 10,8	206,4 ± 9,4	136,3 ± 9,8
ГИ2	87,7 ± 10,4**	206,4 ± 9,6	116,8 ± 9,7*	115,8 ± 11,4
ГИ7	68,7 ± 10,8 ^{aaa}	204,8 ± 10,7	91,6 ± 9,6 ^{aa}	106,7 ± 9,6 ^a
ГИ + NBQX2	128,9 ± 11,7 [#]	208,7 ± 11,4	134,9 ± 8,9 [#]	114,6 ± 10,4
ГИ + NBQX7	104,5 ± 10,6 ^{op}	209,4 ± 9,4	123,4 ± 9,9 ^{op}	108,9 ± 8,6
ГИП2	179,7 ± 9,8 ^{###}	209,8 ± 11,6	177,6 ± 10,7 ^{##}	122,7 ± 10,6
ГИП7	136,4 ± 11,2 ^{op}	211,5 ± 10,6	138,7 ± 9,8 ^{op}	124,8 ± 10,6 ^o
ГИП + NBQX2	118,6 ± 9,8 ^{#, p}	207,6 ± 9,8	133,9 ± 11,6 ^{#, p}	120,4 ± 9,2
ГИП + NBQX7	97,6 ± 10,4 ^{**}	205,9 ± 11,4	119,8 ± 10,6 [*]	126,1 ± 11,4 ^{** v}

Примечание: ЛО2 (n = 8) — группа ложнооперированных животных; длительность реперфузионного периода после проведения хирургических манипуляций составляла 2 суток; ЛО7 (n = 7) — ложнооперированные животные, длительность реперфузии — 7 суток; ГИ2 (n = 7) — ишемия + реперфузия в течение 2 суток + физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; ГИ7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; ГИ+NBQX2 (n = 8) — ишемия + реперфузия 2 суток + NBQX; ГИ + NBQX7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; ГИП2 (n = 8) — ишемия + ИПостК + реперфузия в течение 2 суток + физиологический раствор в объеме, соответствующем объему анализируемого вещества; ГИП7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; ГИП + NBQX2 (n = 7) — ишемия + ИПостК + реперфузия 2 суток + NBQX; ГИП + NBQX7 (n = 7) — то же, что и в предыдущей группе, но длительность реперфузии — 7 суток; * — p < 0,01 при сравнении с группой ЛО2; ** — p < 0,001 при сравнении с группой ЛО2; ^a — p < 0,05 при сравнении с группой ЛО7; ^{aa} — p < 0,01 при сравнении с группой ЛО7; ^{aaa} — p < 0,001 при сравнении с группой ЛО7; [#] — p < 0,05 при сравнении с группой ГИ2; ^{##} — p < 0,01 при сравнении с группой ГИ2; ^{###} — p < 0,001 при сравнении с группой ГИ2; ^o — p < 0,05 при сравнении с группой ГИ7; ^{op} — p < 0,01 при сравнении с группой ГИ7; ^p — p < 0,01 при сравнении с группой ГИП2; ^{*} — p < 0,05 при сравнении с группой ГИП7; ^{**} — p < 0,01 при сравнении с группой ГИП7; ^v — p < 0,05 при сравнении с группой ГИ + NBQX7.

способных нейронов при сравнении с группой ГИ2 (p > 0,05) (табл.). В отдаленном реперфузионном периоде, а именно через 7 суток после реперфузии, при применении NBQX в полях CA1 и CA3 также отмечалось существенное увеличение числа жизнеспособных нейронов. Так, число жизнеспособных пирамидных нейронов в группе ГИНBQX7 в полях CA1 и CA3 было выше на 52,1% (p < 0,01) и 34,7% (p < 0,01) соответственно, чем в группе ГИ7 (табл.). При этом в полях гиппокампа CA2 и CA4 отмечалось увеличение числа жизнеспособных нейронов только на 2,2 и 2,1% соответственно, при сравнении с группой ГИ7 (p > 0,05) (табл.).

Применение ИПостК ко вторым суткам реперфузии в группе ГИП2 способствовало увеличению числа жизнеспособных нейронов при сравнении с группой ГИ2 (табл.). При этом наибольшее увеличение жизнеспособных нейронов было характерно для полей CA1 и CA3 гиппокампа, а именно на 104,9% (p < 0,001) и 52,1% (p < 0,01) соответственно, а для полей CA2 и CA4 — только

на 1,6% (p > 0,05) и 5,9% (p > 0,05) соответственно при сравнении с группой ГИ2 (табл.). В отдаленном реперфузионном периоде после применения посткондиционирующих стимулов существенное сокращение редукции жизнеспособных нейронов отмечалось уже в трех полях гиппокампа — CA1, CA3 и CA4 на 98,5% (p < 0,01), 51,4% (p < 0,01) и 16,9% (p < 0,05) соответственно; при этом в поле CA2 увеличение числа жизнеспособных нейронов при сравнении с группой ГИ7 было незначимым (табл.).

Совместное применение антагониста АМРА-рецепторов NBQX и ИПостК при морфометрическом анализе спустя 48 часов реперфузионного периода обнаруживало увеличение числа жизнеспособных нейронов в полях CA1 и CA3 на 35,2% (p < 0,01) и 14,6% (p < 0,05) соответственно, в сравнении с группой ГИ2 и существенно меньше — на 51,5% (p < 0,01) и 32,6% (p < 0,01) соответственно, чем в группе ГИП2, а также статистически неразличимо при сравнении с группой ГИ + NBQX2 (p > ,05).

Количество жизнеспособных нейронов полей CA2 и CA4 гиппокампа в группе ГИП + NBQX2 значимо не отличалось от аналогичных показателей при сравнении с группами ГИ2, ГИП2 и ГИ + NBQX2 ($p > 0,05$) (табл.).

В отдаленном реперфузионном периоде совместное применение антагониста AMPA-рецепторов NBQX и ИПостК в полях CA1 и CA3 гиппокампа способствовало увеличению числа морфологически неизмененных нейронов на 42,1% ($p < 0,01$) и 30,8% ($p < 0,01$) соответственно при сравнении с группой ГИ7; уменьшению на 28,4% ($p < 0,01$) и 13,6% ($p < 0,05$) при сравнении с группой ГИП7 и значимо не отличалось от показателей в группе ГИ + NBQX7 ($p > 0,05$) (табл.). Количество жизнеспособных нейронов в поле CA2 в группе ГИП + NBQX7 значимо не отличалось от аналогичных показателей при сравнении с группами ГИ7, ГИП7 и ГИ + NBQX7 ($p > 0,05$) (табл.). В поле CA4 совместное применение ИПостК и NBQX в отдаленном реперфузионном периоде приводило к значимому увеличению жизнеспособных нейронов на 18,2% ($p < 0,01$) при сравнении с группой ГИ7, при этом показатель в группе ГИП + NBQX7 был на 13,6% ($p < 0,05$) выше, чем в группе ГИ + NBQX7, и статистически не отличался от показателя в группе ГИП7 ($p > 0,05$) (табл.).

Обсуждение

Обратимая 7-минутная ишемия переднего мозга у монгольских песчанок приводила к интенсивной гибели нейронов в полях CA1 и CA3 гиппокампа. Известно, что нейроны этих областей являются наиболее уязвимыми к повреждающему действию ишемии/реперфузии [10]. Выраженные морфологические изменения нейронов и редукция числа жизнеспособных нейронов отмечались ко вторым суткам с последующим нарастанием клеточной гибели к 7-м суткам реперфузионного периода. Нарастание проявлений повреждения в постишемическом периоде объясняется феноменом отсроченной гибели нейронов [8]. Блокада AMPA-рецепторов веществом NBQX, введенным на второй минуте обратимой ишемии переднего мозга у монгольских песчанок, предотвращала гибель нейронов полей CA1 и CA3 гиппокампа как в раннем, так и в отдаленном реперфузионном периоде. При этом нейропротективный эффект для нейронов поля CA4 не был установлен. Полученные нами результаты согласуются с результатами исследований, полученных ранее с использованием различных экспериментальных моделей ишемии головного мозга у грызунов, в которых было показано, что введение NBQX в реперфузионном

периоде способствует выживанию нейронов [5, 6, 11]. Однако следует отметить, что в ранее проведенных исследованиях NBQX вводили в различные сроки реперфузионного периода после обратимой ишемии головного мозга, и эти сроки реперфузии в ряде исследований существенно разнятся [4–6, 11]. Наличие нейропротективного эффекта NBQX для нейронов CA1 и CA3 гиппокампа и отсутствие такового для нейронов поля CA4 может объясняться различной чувствительностью областей гиппокампа к действию ишемии-реперфузии, использованной дозой, а также проявлением пластичности нейронов гиппокампа, поскольку известно, что блокада AMPA-рецепторов влияет на нейротрансмиссию и синаптическую пластичность в гиппокампе [12].

AMPA-рецепторы опосредуют быструю возбуждающую синаптическую передачу сигналов в центральной нервной системе и представляют собой гетеротетрамерные комплексы, формируемые комбинацией четырех субъединиц 1–4 (GluR1–GluR4) [13]. AMPA-рецепторы пирамидных нейронов гиппокампа преимущественно состоят из GluR1, GluR2 и GluR3 субъединиц [14]. Известно, что феномен эксайтотоксичности занимает ключевое место среди ранних механизмов необратимого ишемического повреждения нейронов центральной нервной системы [15]. Ишемическая деполяризация нейронов вызывает интенсивное высвобождение глутамата из глутаматэргических терминалей в синаптическую щель, который активирует AMPA-рецепторы, в результате чего происходит открытие натриевых каналов, резкое увеличение концентрации ионов натрия в цитоплазме нейронов и развитие внутриклеточного отека [15]. Результаты недавних исследований предполагают наличие дополнительного механизма повреждения, вызванного неконтролируемой активацией AMPA-рецепторов. Изначально предполагалось, что AMPA-рецепторы являются непроницаемыми для Ca^{2+} , но результаты исследования Hollmann M. и соавторов [16] установили, что в некоторых случаях AMPA-рецепторы могут обладать значительной проницаемостью для Ca^{2+} , причем это зависит от состава субъединиц в тетрамерной структуре AMPA-рецептора. AMPA-рецепторы, содержащие GluR2 субъединицу, обладают низким уровнем проницаемости для Ca^{2+} , в то время как AMPA-рецепторы, не содержащие в своей структуре GluR2, являются гораздо более проницаемыми для Ca^{2+} [16, 17]. Во взрослом мозге почти 100% митохондриальной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), кодирующей GluR2, редактируется в Q/R сайте, соответствующем 607 остатку, в результате чего геномный глутамин (Q 607) пре-

образуется в кодон аргинина (R) [17]. Субъединица GluR2 (R) формирует Ca^{2+} -непроницаемые каналы, в то время как субъединица GluR2 (Q) формирует каналы, проницаемые для Ca^{2+} . Таким образом, AMPA-рецепторы в большинстве нейронов взрослого гиппокампа являются гетеромерными структурами, содержат GluR2 субъединицу и обладают низкой проницаемостью для Ca^{2+} [18]. Известно, что глобальная ишемия головного мозга снижает уровень мРНК GluR2 в нейронах поля CA1 гиппокампа [6]. Эти сведения привели к возникновению «GluR2 гипотезы», которая предполагает, что отсутствие GluR2 субъединицы способствует повышению проницаемости AMPA-рецепторов для Ca^{2+} и определяет селективную гибель нейронов после ишемии [19].

Применение ИПостК приводило к увеличению числа жизнеспособных нейронов в полях CA1 и CA3 в раннем реперфузионном периоде и в полях CA1, CA3 и CA4 в отдаленном реперфузионном периоде. Этот факт согласуется с результатами ряда исследований, в которых на различных экспериментальных моделях было показано, что применение ИПостК приводит к цитопротективному эффекту для отдельных структур головного мозга [20].

Результаты нашего исследования показали, что совместное применение ИПостК и антагониста AMPA-рецепторов NBQX приводило к некоторому ослаблению нейропротективного эффекта ИПостК как в раннем, так и в отдаленном периоде реперфузии только для полей CA1 и CA3 гиппокампа. При этом для поля CA4 такой закономерности обнаружить не удалось. В другом исследовании на модели глобальной ишемии головного мозга у крыс было установлено, что после 20-минутной ишемии в зоне CA1 гиппокампа наблюдается существенное понижение уровня внеклеточного Ca^{2+} с параллельным повышением внутриклеточного Ca^{2+} . При этом наибольшая степень сдвигов отмечалась при продолжительности реперфузии от 2 до 6 часов, а уровень изменения существенно коррелирует со степенью повреждения поля CA1 к седьмому дню реперфузионного периода. При этом применение NBQX полностью устраняло эти сдвиги [21]. Таким образом, активация AMPA-рецепторов способствует повышению внутриклеточного Na^+ и Ca^{2+} в постишемическом периоде. Можно предположить, что короткие ишемические стимулы, выполненные в раннем реперфузионном периоде, способствуют адаптации потенциалзависимых кальциевых каналов в периоде реперфузии, а полная блокировка AMPA-рецепторов способствует

разбалансировке процесса, что в конечном итоге приводит к частичной потере нейропротективного эффекта от применения ИПостК. Вторым возможным механизмом, способствующим ослаблению нейропротективного эффекта ИПостК на фоне блокады AMPA-рецепторов для нейронов полей CA1 и CA3, может служить следующее предположение. Несмотря на то, что ишемия резко активизирует глутаматные рецепторы и провоцирует NMDA-рецептор-зависимую гибель нейронов, в нейронах полей гиппокампа CA1 и CA3, а также в нейронах Girus dentate при ишемии наблюдается понижение активности и пониженная регуляция NMDA и AMPA/каинатных рецепторов [22]. Можно предположить, что ишемические стимулы поддерживают уровень активности AMPA/каинатных рецепторов на определенном уровне, которая стимулирует или способствует запуску других цитопротективных механизмов. Такое предположение выдвинуто на основе данных других исследователей, которые изучали вклад AMPA/каинатных рецепторов в нейрогенез в нормальном и ишемизированном гиппокампе у монгольских песчанок [23]. Было установлено, что нейрогенез имеет место после глобальной ишемии, а также блокады глутаматных рецепторов у нормальных животных, и было выдвинуто предположение, что глобальная ишемия приводит к хронической даун-регуляции глутаматных рецепторов, которая стимулирует нейрогенез и синаптогенез. Авторы, основываясь на своих результатах, предположили, что антагонисты глутаматных рецепторов предотвращают нейрогенез и синаптогенез после глобальной ишемии путем блокирования хронической даун-регуляции глутаматных рецепторов [23].

Также необходимо отметить, что к эндогенным способам формирования толерантности нейронов головного мозга к повреждающему действию ишемии/реперфузии относится ишемическое прекодиционирование (ИПреК). Некоторые авторы выдвигают предположение, что в основе формирования толерантности нейронов при ИПостК и ИПреК могут лежать сходные механизмы [24]. Однако результаты, полученные нами по ослаблению нейропротективного эффекта ИПостК при совместном применении с антагонистом AMPA-рецепторов, отличаются от результатов, полученных другими авторами при совместном применении ИПреК также с антагонистами AMPA-рецепторов [25]. Так, при моделировании обратимой глобальной ишемии переднего мозга у монгольских песчанок совместное применение ИПреК и таких антагонистов AMPA-рецепторов, как LY293558 и LY300164, не оказывало эффекта

на индукцию ишемической толерантности. При этом авторы сделали вывод, что AMPA-рецепторы не вовлечены в формирование ишемической толерантности нейронов при применении ИПреК [25]. Необходимо отметить, что различия в полученных результатах в первую очередь могут быть объяснены различиями в использованных антагонистах. Также следует принять во внимание, что ИПреК в первую очередь способствует формированию устойчивости к повреждающему действию ишемии, в то время как применение ИПостК направлено на уменьшение тяжести реперфузионного повреждения, поэтому индукторы и триггеры данных процессов могут существенно отличаться, в то время как механизмы формирования конечных эффектов могут быть сходными. Например, при применении ИПреК и ИПостК было показано сходство в уровнях экспрессии белков, вовлеченных в механизмы апоптоза, в результате чего авторы сделали вывод о том, что оба способа эндогенной нейропротекции имеют одинаковые антиапоптотические эффекты при ишемии-реперфузии [26].

Таким образом, в нашем исследовании было установлено, что ИПостК при ишемии-реперфузии головного мозга обладает выраженным нейропротективным эффектом, который проявляется в сохранении жизнеспособности нейронов CA1, CA3 и CA4 полей гиппокампа. Нейропротективный эффект от применения антагониста AMPA-рецепторов NBQX выявлялся только для нейронов наиболее чувствительных к действию ишемии-реперфузии областей гиппокампа — поля CA1 и CA3. Совместное применение ИПостК и антагониста AMPA-рецепторов NBQX сопровождалось ослаблением нейропротективного эффекта первого до уровня, сопоставимого по выраженности с эффектом отдельного применения антагониста AMPA-рецепторов NBQX для нейронов CA1 и CA3 полей гиппокампа. Проведенное исследование позволяет предположить, что в механизмы реализации нейропротективного эффекта ИПостК, наряду с другими факторами, вовлечена активация AMPA-рецепторов. Однако данное предположение нуждается в дальнейшем подтверждении с использованием различных протоколов ИПостК на различных моделях ишемии-реперфузии головного мозга, а также с использованием иных фармакологических «инструментов», позволяющих модулировать активность AMPA-рецепторов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Financial support

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-1611.2014.7) и гранта РФФИ № НК 13–04–00793/14. / The study was supported by the Grant of President of Russian Federation for the leading scientific schools (SS-1611.2014.7) and grant of Russian Fundamental Research Foundations 13–04–00793/14.

Список литературы / References

1. Шляхто Е. В., Баранцевич Е. Р., Щербак Н. С., Галагудза М. М. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1. Вестник РАМН. 2012;(6):42–50. [Shlyakhto EV, Barantsevich ER, Shcherbak NS, Galagudza MM. Molecular mechanisms of development of cerebral tolerance to ischemia. Part 1. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2012; (6):42–50. In Russian].
2. Zhao H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(5):873–85.
3. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin.* 2006;24(1):1–21.
4. Sheardown MJ, Suzak PD, Nordholm L. AMPA but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil ischemia, even when delayed 24 h. *Eur J Pharmacol.* 1993; 236(3):347–53.
5. Kawasaki-Yatsugi S, Yatsugi S, Koshiya K, Shimizu-Sasamata M. Neuroprotective effect of YM90K, an AMPA-receptor antagonist, against delayed neuronal death induced by transient global cerebral ischemia in gerbils and rats. *Jpn J Pharmacol.* 1997;74(3):253–260.
6. Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MV et al. Global ischemia induces downregulation of GluR2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci.* 1997; 17(16):6179–88.
7. Loskota WJ, Lomax P, Verity MA. A stereotaxic atlas of the mongolian gerbil brain. Ann Arbor Science Publishers. Ann Arbor, Mich. USA. 1974.
8. Kirino T, Tamura A, Sano K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. *Stroke.* 1986;17(3):455–459.
9. Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke.* 1994;25(9):1862–1869.
10. Radenovic L, Selakovic V, Janac B, Andjus PR. Neuroprotective efficiency of NMDA receptor blockade in the striatum and CA3 hippocampus after various durations of cerebral ischemia in gerbils. *Acta Physiol Hung.* 2011; 98 (1):32–44.
11. Buchan AM, Li H, Cho S, Pulsinelli WA. Blockade of the AMPA receptor prevents CA I hippocampal injury following severe but transient forebrain ischemia in adult rats. *Neurosci Lett.* 1991;132(2):255–258.
12. Chittajallu R, Braighwaite SP, Clarke VR, Henley JM. Kainate receptors: units, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20 (1):26–35.
13. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:31–108.
14. Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, Niedzielski AS. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci.* 1996;16 (6):1982–1989.

15. Hazell AS. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int.* 2007;50(7–8):941–953.

16. Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 1991;252(5007):851–853.

17. Burnashev N. Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1996;6(3):311–317.

18. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron.* 1995;15(1):193–204.

19. Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron.* 2006;49(5):719–733.

20. Щербак Н. С., Галагудза М. М., Кузьменков А. Н., Овчинников Д. А., Юкина Г. Ю., Баранцевич Е. Р. Морфофункциональные изменения зоны CA1 гиппокампа у монгольских песчанок при применении ишемического посткондиционирования. *Морфология.* 2012;142(5):12–16. [Shcherbak NS, Galagudza MM, Kuz'menkov AN, Ovchinnikov DA, Yukina GYu, Barantsevich ER. Morpho-functional changes of hippocampal CA1 area in Mongolian gerbils after ischemic postconditioning. *Morfologiya.* 2012;142(5):12–16. In Russian]

21. Andine P, Jacobson I, Hagberg H. Enhanced calcium uptake by CA1 pyramidal cell dendrites in the posts ischemic phase despite subnormal evoked field potentials: Excitatory amino acid receptor dependency and relationship to neuronal damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12(5):773–783.

22. Aoyagi A, Saito H, Abe K, Nishiyama N. Early impairment and late recovery of synaptic transmission in the rat dentate gyrus following transient forebrain ischemia in vivo. *Brain Res.* 1998;799:130–137.

23. Bernabeu R, Sharp FR. NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(12):1669–1680.

24. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol.* 2009;8:398–412.

25. Bond A, Lodge D, Hicks CA, Ward MA, O'Neill MJ. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 1999;380(2–3):91–99.

26. Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, Lu XJ, Lin YC, Geng YJ et al. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):6089–6101.

Информация об авторах:

Щербак Наталия Сергеевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института сердечно-сосудистых заболеваний ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России;

Юкина Галина Юрьевна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией патоморфологии Научно-исследовательского центра ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России;

Баранцевич Евгений Робертович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой неврологии и мануальной медицины ФПО ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России, заведующий научно-исследовательским отделом ангионеврологии ФГБУ «СЗФМИЦ» Минздрава России;

Томсон Владимир Викторович — доктор медицинских наук, профессор, директор научно-исследовательского центра ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России;

Шляхто Евгений Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «СЗФМИЦ» Минздрава России, заведующий кафедрой факультетской терапии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России.

Author information:

Natalia S. Shcherbak, MD, PhD, Senior Researcher, Institute of Cardiovascular Diseases, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Leading Researcher, Laboratory of Nanotechnology, Institute of Experimental Medicine, Federal North-West Medical Research Centre;

Michael M. Galagudza, MD, PhD, Head, Institute of Experimental Medicine, Federal North-West Medical Research Centre, Professor, Department of Pathophysiology First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Galina Yu. Yukina, PhD, Head, Laboratory of Pathomorphology Research Center, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg;

Eugene R. Barantsevich, MD, PhD, Professor, Head, Department of Neurology and Manual Medicine FPO, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Head, Research Department of Angioneurology, Federal North-West Medical Research Centre;

Vladimir V. Thomson, MD, PhD, Professor, Director of Research Center, Federal North-West Medical Research Centre;

Eugene V. Shlyakhto, MD, PhD, Professor, Academician of RAS, General Director, Federal North-West Medical Research Centre, Head, Department of Internal Diseases #1, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg.