

Кметь Т.И., Ткачук С.С.

Динамика изменений морфофункционального состояния p53-положительных клеток коры височной доли полушарий головного мозга крыс под влиянием каротидной ишемии-реперфузии

Буковинский государственный медицинский университет Минздрава Украины, 58002, Черновцы, Театральная площадь, 2

Исследовано влияние двусторонней 20-минутной каротидной ишемии с реперфузией различной продолжительности на активность апоптотических процессов в нейронах и глиальных клетках коры височной доли больших полушарий мозга крыс. Показано, что двусторонняя каротидная ишемия с одночасовой реперфузией увеличивает плотность расположения p53⁺-нейроцитов в указанном участке коры, а также повышает процент и плотность p53⁺-нервных клеток и снижает процент и плотность p53⁺-глиоцитов — на 12-е сут. постишемического периода. Ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга увеличивает концентрацию белка p53 в глиоцитах коры височной доли в раннем ишемически-реперфузионном периоде и снижает ее в нейро- и глиоцитах — в позднем.

Ключевые слова: кора височной доли; ишемия-реперфузия; апоптоз

Kmet T.I., Tkachuk S.S.

Dynamics of changes of p53-positive cells morphofunctional condition in the cerebral cortex of the temporal lobe in rats affected by carotid ischemia-reperfusion

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

The influence of bilateral 20-minute carotid ischemia with reperfusion of various duration upon the activity of apoptotic processes in the neurons and glia cells of the cerebral cortex in the temporal lobe of rats has been studied. Bilateral carotid ischemia with one-hour reperfusion has been indicated to increase the location density of p53⁺-neurocytes in this region of the cerebral cortex, increases percentage and density of p53⁺-nerve cells and reduces the percentage and density of p53⁺-glia cells on the 12th day of the post-ischemic period. Ischemic-reperfusion lesion of the brain increases the concentration of p53 protein in glia cells of the cerebral cortex in the temporal region in the early ischemic-reperfusion period and reduces it in nerve and glia cells in the late one.

Key words: cerebral cortex of the temporal lobe; ischemia-reperfusion; apoptosis

Острая цереброваскулярная недостаточность призна-на весомой медико-социальной проблемой, поскольку в структуре заболеваемости и смертности населения занимает второе место после сердечно-сосудистой патологии [1]. В спектре патологических состояний, обусловленных острым нарушением мозгового кровообращения, доминирующая роль принадлежит ишемическим поражениям, которые составляют более 85% всех случаев мозговых инсультов [2]. Развитие неполной глобальной ишемии головного мозга приводит к нарушению энергетики нейронов, глии и эндотелиальных клеток, инициирует ишемический каскад и повреждение клеток центральной нервной системы [3, 4]. Исследования последних лет открыли новые патогенетические механизмы гемодинами-

ческих, клеточных и молекулярных изменений при этой патологии, которые приводят в конечном итоге к гибели нервной ткани путем некроза или апоптоза [5, 6].

Одним из хорошо изученных молекулярных маркеров клеточного апоптоза является белок p53 [7]. Его экспрессия стимулируется при повреждениях генетического аппарата клеток, а также при любых стимулах, особенно в центральной нервной системе, которые могут привести к подобным повреждениям или являются сигналом о неблагоприятном состоянии клеток. Функция белка p53 состоит в удалении из пула реплицирующихся клеток, тех, которые повреждены или являются потенциально опасными для организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется [8].

В настоящее время хорошо изучены морфофункциональные изменения эндотелиальных клеток сосу-

Для корреспонденции: Кметь Тарас Игоревич, к.м.н., доцент каф. гигиены и экологии Буковинского государственного медицинского университета, г.Черновцы, e-mail: kmet.taras@bsmu.edu.ua

дов коры различных долей полушарий головного мозга в условиях ишемии-реперфузии [9], однако особенности экспрессии маркера апоптоза в нейронах и глиоцитах различных долей неокортекса при данной патологии остаются недостаточно исследованы.

Цель работы — изучение влияния в динамике неполной глобальной ишемии головного мозга с последующей реперфузией различной продолжительности на плотность расположения $\rho 53^+$ нейро- и глиоцитов коры височной доли (КВД) больших полушарий мозга крыс, а также содержание в них белка $\rho 53$.

Методика

Исследование проведено на самцах белых нелинейных крыс, из которых были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) контрольные крысы;
- 2) крысы, которым моделировали 20-минутную двустороннюю каротидную ишемию-реперфузию (ДКИ) с одночасовой реперфузией;
- 3) крысы, которых выводили из эксперимента на 12-е сут. после моделирования 20-минутной ДКИ.

Моделирование ДКИ осуществляли под калипсоловым наркозом (75 мг/кг) путем пережатия обеих общих сонных артерий [10], после чего кровотоки по этим сосудам восстанавливали. Для изучения ранних последствий ишемии-реперфузии мозга часть животных выводили из эксперимента через 1 ч после завершения реперфузионного периода, а отсроченных — на 12-е сут. Животных выводили из эксперимента декапитацией под калипсоловым наркозом. При помощи атласа стереотаксических координат [11] на холоде забирали КВД полушарий головного мозга, в течение 24 ч фиксировали в растворе Буэна и заливали в парафин, готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм. Затем осуществляли депарафинизацию в ксилоле, регидратацию в нисходящих концентрациях этанола и отмывание в 0,1 М фосфатном буфере. Обработанные моноклональными антителами срезы изучали в флуоресцентном микроскопе AXIOSKOP (Zeiss, Германия). Исследовали плот-

ность расположения и морфометрические параметры $\rho 53^+$ -клеток с помощью компьютерной системы цифрового анализа VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок. Данные представлены в виде средних арифметических и стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Изучение серийных срезов КВД полушарий головного мозга контрольных животных показало (табл. 1), что количество $\rho 53^+$ -глиоцитов в исследуемой доле в 3,5 раза выше, чем $\rho 53^+$ -нейроцитов, что, вероятно, обусловлено более интенсивным уровнем апоптоза глиальных клеток.

Следует отметить, что 20-минутная ишемия с односторонней реперфузией привела к возрастанию плотности расположения $\rho 53^+$ -положительных нервных клеток в КВД на 34% относительно контроля. В позднем постишемическом периоде (12-е сутки) в нейронах наблюдалось более выраженное повышение исследуемого показателя (на 80% — относительно такового у контрольных крыс и на 35% — относительно раннего срока исследования), а в глиальных клетках, наоборот, произошло уменьшение данного параметра на 28 и 42% соответственно.

Процентное соотношение различных классов $\rho 53^+$ клеток КВД в раннем постишемическом периоде достоверно не изменилось. Однако на 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода процент $\rho 53^+$ -нейронов возрос более чем в 2 раза относительно показателя в контроле и на 64% — относительно раннего срока наблюдения, а процент глиальных клетках, наоборот, уменьшился на 27 и 22% соответственно.

Изучения последствий раннего воздействия ишемии-реперфузии головного мозга на концентрацию и содержание $\rho 53^+$ -ИРМ (иммунореактивного материала) в КВД показало (табл. 2), что содержание белка $\rho 53$ в глиоцитах достоверно возросло на 4 и 5% соответственно по сравнению с контрольной группой животных, а в нейронах — не изменилось. В условиях позднего

Таблица 1

Плотность расположения и процентное соотношение $\rho 53^+$ -нейроцитов и глиоцитов в коре височной доли полушарий крыс с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга (на 1 мм²) ($M \pm m$)

Группа наблюдения	Количество $\rho 53^+$ -нейроцитов на 1 мм ²	Количество $\rho 53^+$ -глиоцитов на 1 мм ²
Контроль (n = 11)	20,39 ± 3,02	72,23 ± 7,70
	20,15 ± 2,58	79,85 ± 2,58
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 ч (n = 11)	27,23 ± 1,66*	89,90 ± 4,86
	25,35 ± 1,68	74,65 ± 1,68
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n = 11)	36,73 ± 4,10*^	51,74 ± 4,82*^
	41,51 ± 3,27*^	58,49 ± 3,27*^

Примечание. В числителе — суммарная плотность различных классов клеток на 1 мм² коры височной доли полушарий головного мозга; в знаменателе — процент различных классов клеток; вероятность различий по сравнению с: * — контролем; ^ — ишемией-реперфузией 20 мин / 1 ч

срока наблюдения имело место снижение концентрации белка р53 в нервных клетках на 8% относительно показателя в раннем сроке исследования, а глиальных клеток — на 3% относительно контроля и на 7% — относительно раннего ишемически-реперфузионного периода. На 12-е сутки наблюдения отмечалось повышение только общего содержания белка р53 в глиоцитах на 9% — относительно показателя у контрольных крыс.

ДКИ с одночасовой реперфузией вызвала в исследуемой части неокортекса усиление дисперсии распределения р53⁺-ИРМ в глиоцитах на 8% относительно контрольной группы животных. На 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода данный параметр в нейронах возрос на 19% относительно контроля и на 12% — относительно раннего срока наблюдения, а в глиоцитах — на 11% по сравнению с контролем.

Изучение морфометрических параметров клеток КВД показало, что площадь р53⁺-нейронов в раннем и позднем ишемически-реперфузионном периодах не изменилась. Однако площадь р53⁺-глиальных клеток в раннем постишемическом периоде увеличилась на 5% относительно контроля, а в позднем постишемическом периоде зафиксирован рост данного показателя на 32% относительно контрольных крыс и на 18% — относительно раннего срока наблюдения. ДКИ с одночасовой реперфузией привела к снижению коэффициента элонгации р53⁺-нервных клеток на 8% относительно контроля, а коэффициент формы в данном сроке наблюдения не изменился. В позднем периоде ишемически-реперфузионного повреждения КВД полушарий головного мозга обнаружено, что коэффициент формы р53⁺нейроцитов воз-

рос на 13%, а коэффициент элонгации, наоборот, уменьшился на 7% относительно контроля. Данные морфометрические показатели р53⁺-глиальных клеток в оба периода наблюдения не изменились.

Результаты исследования показали, что двусторонняя каротидная ишемия-реперфузия в КВД полушарий головного мозга увеличивает плотность расположения р53⁺-нейроцитов в раннем постишемическом периоде, повышает процент и плотность р53⁺-нервных клеток и снижает процент и плотность р53⁺-глиоцитов — в позднем. Ишемически-реперфузионное повреждение головного мозга увеличивает концентрацию белка р53 в глиоцитах КВД в раннем ишемически-реперфузионном периоде и снижает ее в нейро- и глиоцитах — в позднем.

Белок р53 стабилизируется и его уровни возрастают в ответ на различные стрессы, такие как повреждение ДНК, гипоксия или аноксия. Литературные источники указывают на то, что накопление белка р53 начинается при уровне 0,2% кислорода, при котором происходит остановка репликации ДНК, хотя поврежденный нуклеиновых кислот, наличие которых можно было бы установить лабораторно, еще нет. В этих условиях имеет место АТФ-зависимое фосфорилирование р53, что стабилизирует этот белок [7]. Фосфорилирования N конца р53 специальными киназами стабилизирует его, поскольку делает невозможным связывание с белками Mdm2 и дальнейшую протеасомного деградацию [12]. Кроме того, фосфорилирование позволяет коактиваторам Р300 и РСАФ связываться с белком р53 и ацетилировать его C-конец, следствием чего являются конформационные изменения последнего и экспозиция ДНК-связываю-

Таблица 2

Содержание белка р53 и морфометрические параметры р53⁺ нервных и глиальных клеток коры височной доли полушарий крыс с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга (M ± m)

Группа наблюдения	Концентрация р53-ИРМ E _{иф}	Содержание р53-ИРМ E _{иф}	Дисперсия распределения р53-ИРМ	Площадь, мкм ²	Коэффициент формы	Коэффициент элонгации
Нервные клетки						
Контроль (n = 11)	0,383 ± 0,012	2,315 ± 0,042	52,24 ± 2,59	108,16 ± 10,22	0,500 ± 0,028	0,658 ± 0,017
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 ч (n = 11)	0,394 ± 0,004	2,244 ± 0,019	55,48 ± 1,14	90,08 ± 4,89	0,533 ± 0,013	0,604 ± 0,010 p ₁ <0,01
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n = 11)	0,364 ± 0,005 p ₂ <0,001	2,288 ± 0,030	61,98 ± 1,57 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	102,72 ± 6,89	0,567 ± 0,018 p ₁ <0,05	0,615 ± 0,014 p ₁ <0,05
Глиальные клетки						
Контроль (n = 11)	0,342 ± 0,002	1,207 ± 0,019	50,22 ± 1,38	9,07 ± 0,44	0,806 ± 0,009	0,669 ± 0,008
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 ч (n = 11)	0,356 ± 0,002 p ₁ <0,001	1,264 ± 0,011 p ₁ <0,05	54,25 ± 0,68 p ₁ <0,05	10,15 ± 0,25 p ₁ <0,05	0,806 ± 0,005	0,669 ± 0,004
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n = 11)	0,332 ± 0,003 p ₁ <0,05 p ₂ <0,001	1,314 ± 0,026 p ₁ <0,01	55,63 ± 1,23 p ₁ <0,01	11,93 ± 0,69 p ₁ <0,001 p ₂ <0,05	0,789 ± 0,012	0,649 ± 0,010

Примечание. — вероятность различий по сравнению: p₁ — с контролем (p<0,05, p<0,01, p<0,001); p₂ — с ишемией-реперфузией 20 мин / 1 ч (p<0,05, p<0,01, p<0,001)

щего домена, что позволяет взаимодействовать с определенными генами, активируя или подавляя их [13]. Таким образом, возрастание концентрации белка p53 в глиоцитах после 20-минутной ишемии-одночасовой реперфузии можно объяснить гипоксической активацией, а его снижение на 12-е сутки может быть следствием гибели глиоцитов вследствие усиления апоптоза, о чем свидетельствуют полученные нами данные о снижении процента и плотности расположения p53⁺-глиоцитов в данном периоде наблюдения.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности сравнительного исследования динамики апоптотических изменений клеток коры различных долей больших полушарий головного мозга крыс.

Список литературы

1. Попов А.В., Максимов Н.Н., Бывальцев А.С. Анализ и прогноз показателей заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии у городских и сельских жителей. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014; 16 (5, Suppl. 2): 927 — 9.
2. Bolacos J.P., Moro M.A., Lizasoain I. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61(14): 1299-15.
3. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3): 289-309.
4. Mathers C., Boerma T., D.M. Global and regional causes of death. *Brit. Med. Bull.* 2009; 92: 7-32.
5. Chomova M., Tatarikova Z., Dobrota D. et al. Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochem. Res.* 2012; 37 (5): 965-76.
6. Vaseva A.V., Marchenko N.D., Ji K. et al. P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012; 149: 1536-48.
7. Hammond E.M., Giaccia A.J. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 718-25.
8. Chen C.H., Jiang Z., Yan J.H. et al. The involvement of programmed cell death 5 (PDCD5) in the regulation of apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury. *CNS Neurosci Ther.* 2013; 19(8): 566-76.
9. Бойчук Т.Н., Кметь Т.И. Регионарные особенности реакции эндотелиальных клеток различных функциональных отделов коры больших полушарий крыс со стрептозототин-индуцированным диабетом, осложненным ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2013; 5 (1): 64 — 7.
10. Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга. *Патология*. 2004; 1(1): 22-30.
11. König J.F., Klippel P.A. *The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963. 162 p.
12. Vahteristo P., Taminen A., Karvinen P. et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer. Res.* 2001; 61: 5718-22.
13. Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P. et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ. Res.* 2008; 102 (6): 703-10.

Поступила 05.05.15

References

1. Popov A.V., Maksimov N.N., Byval'cev A.S. Analysis and forecasting the indicators of incidences and mortality from cardiovascular pathology at urban and rural population. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2014; 16 (5, Suppl. 2): 927 — 9. (in Russian)
2. Bolacos J.P., Moro M. A., Lizasoain I. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61(14): 1299-15.
3. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*. 2008; 55(3): 289-309.
4. Mathers C., Boerma T., Fat D.M. Global and regional causes of death. *Brit. Med. Bull.* 2009; 92: 7-32.
5. Chomova M., Tatarikova Z., Dobrota D. et al. Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochem Res.* 2012; 37(5): 965-76.
6. Vaseva A.V., Marchenko N.D., Ji K. et al. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 2012; 149: 1536-48.
7. Hammond E.M., Giaccia A.J. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 718-25.
8. Chen C.H., Jiang Z., Yan J.H. et al. The involvement of programmed cell death 5 (PDCD5) in the regulation of apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury. *CNS Neurosci Ther.* 2013; 19(8): 566-76.
9. Bojchuk T.N., Kmet' T.I. Regional characteristics of response of endothelial cells of certain function areas of the cerebral cortex in rats with streptozocin-induced diabetes complicated by ischemia-reperfusion damage of brain. *Vesnik Kazhaskogo nacional'nogo medicinskogo universiteta*. 2013; 5(1): 64 — 7. (in Russian)
10. Skibo G.G. The use of various experimental models to study cellular mechanisms of cerebral ischemic lesions. *Patologija*. 2004; 1(1): 22-30. (in Russian)
11. König J.F., Klippel P.A. *The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1963.
12. Vahteristo P., Taminen A., Karvinen P. et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer. Res.* 2001; 61: 5718-22.
13. Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P. et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ. Res.* 2008; 102 (6): 703-10.

Received 05.05.15

Сведения об авторах:

Ткачук Светлана Сергеевна, д.м.н., проф., зав. каф. физиологии им. Я.Д. Киршенבלата Буковинского государственного медицинского университета