

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ КРОВООБРАЩЕНИЯ В БАССЕЙНЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА p53⁺ В НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КОРЫ ТЕМЕННОЙ ДОЛИ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

Изучено в динамике влияние острого нарушения мозгового кровообращения в бассейне сонных артерий на активность проапоптотических процессов в нервных и глиальных клетках коры теменной доли полушарий головного мозга. В коре теменной доли полушарий головного мозга двусторонняя 20-минутная каротидная ишемия с последующей реперфузией снижает плотность расположения p53⁺-глиоцитов на 12-е сутки наблюдения, повышает процент p53⁺-нейронов и снижает процент p53⁺-глиоцитов как после одночасовой реперфузии, так и на 12-е сутки.

Каротидная ишемия-реперфузия в нейронах коры теменной доли увеличивает концентрацию белка p53⁺ в раннем ишемически-реперфузионном периоде и снижает ее в нейро- и глиоцитах – в позднем; нарушает морфометрические параметры p53⁺-нейроцитов в оба срока наблюдения, а глиоцитов – в позднем.

Ключевые слова: кора теменной доли, ишемия-реперфузия, апоптоз.

Введение. Глобальное распространение цереброваскулярных заболеваний, частое возникновение их в молодом возрасте, высокий процент инвалидизации и смертности определяют медико-социальную значимость изучения этой патологии [1].

На сегодняшний день имеется значительный объем информации касательно практически всех звеньев патологического процесса, которые запускаются при ишемическом повреждении головного мозга [2, 3], начиная от развития энергетического стресса [4], формирования явлений эксайтотоксичности [5] и заканчивая гибелью клеток путем некроза или апоптоза. В последние годы особую актуальность приобретают исследования, посвященные раскрытию молекулярно-генетических основ гибели нервных и глиальных клеток [6]. Выяснение того, какой вид клеточной смерти преобладает при развитии постреперфузионных поражений центральной нервной системы, во-первых, имеет важное практическое значение для разработки новых методов патогенетической терапии инсульта, поскольку регенераторный потенциал нейронов резко ограничен и потеря даже части клеток может закончиться фатально [7, 8]; во-вторых, эта информация позволит прогнозировать индивидуальную чувствительность различных отделов мозга при цереброваскулярных катастрофах.

В настоящее время изучено влияние ишемии-реперфузии на фрагментацию ДНК клеток соматосенсорной коры головного мозга крыс [9], однако степень реагирования на это вмешательство отдельных клеток (нейронов, глии) теменной доли, а также процессы апоптоза остаются неисследованными.

Цель работы. Исследовать влияние двусторонней 20-минутной каротидной ишемии с реперфузией различной продолжительности на содержание белка p53⁺ в различных клетках коры теменной доли полушарий лабораторных крыс.

Материалы и методы. Исследования выполнены на крысах-самцах трех групп: 1. Контрольные животные; 2. Крысы, которым моделировали 20-минутную двустороннюю каротидную ишемию с одночасовой реперфузией (ранний ишемически-реперфузионный период); 3. Крысы, которых выводили из эксперимента на 12-е сутки после моделирования 20-минутной ишемии (поздний ишемически-реперфузионный период).

Моделирование каротидной ишемии-реперфузии осуществляли под калипсоловым наркозом (75 мг/кг массы тела) путем 20-минутного пережатия обеих общих сонных артерий [10], после чего кровотоки по этим сосудам восстанавливали. Животных выводили из эксперимента декапитацией под калипсоловым наркозом. Пользуясь атласом стереотаксических координат [11] на холоде забирали кору теменной доли (КТД) 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, регидрацию в нисходящих концентрациях этанола и отмывание в 0,1 М фосфатном буфере. После обработки с моноклональными антителами срезы изучали в флуоресцентном микроскопе AXIOSKOP (Zeiss, Германия) методом иммунофлуоресценции. Исследовали плотность расположения и морфометрические параметры p53⁺ 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 исследования и их обсуждение. Результаты изучения плотности расположения и процентного соотношения p53⁺ нервных и глиальных клеток КТД полушарий головного мозга представлены в табл. 1. Обращает внимание тот факт, что в исследуемом отделе неокортекса интактных животных количество p53⁺-глиоцитов в 3,7 раза выше, чем p53⁺-нейроцитов, что, вероятно, обусловлено более интенсивным уровнем в них апоптотических процессов.

Установлено, что 20-минутная каротидная ишемия с одночасовой реперфузией не привела к достоверным изменениям плотности расположения p53⁺-положительных нервных и глиальных клеток КТД. Однако на 12-е сутки постинфарктного периода в исследуемой части коры наблюдалось достоверное снижение плотности расположения p53⁺-глиоцитов в 4,7 раза по сравнению с таковой у контрольных крыс и в 4,3 раза – относительно показателя в раннем постишемическом периоде.

Анализ процентного соотношения различных классов p53⁺ клеток КТД показал, что в раннем постишемическом периоде произошло достоверное увеличение на 29 % количества p53⁺-нейроцитов и уменьшение на 10 % количества глиоцитов относительно соответствующих показателей в контрольной группе крыс. На 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода процент p53⁺ нейронов возрос в 3,3 раза относительно показателя в контроле и в 2,5 раза – по сравнению с показателем в раннем сроке наблюдения, а процент глиальных клеток, наоборот, уменьшился в 4,1 и 3,7 раза соответственно.

По результатам оценки раннего воздействия ишемии-реперфузии головного мозга на концентрацию белка p53⁺ установлено (табл. 2), что данный показатель в нейронах повысился на 19 % по отношению к показателю у контрольных животных, а в глиоцитах изменений не зафиксировано. В условиях позднего постишемического периода исследуемый параметр в нервных клетках уменьшился в 2 раза по отношению к контролю и в 2,4 раза – по сравнению с ранним сроком исследования, а в глиальных клетках - на 16 и 18 % соответственно.

В условиях раннего ишемически-реперфузионного повреждения КТД полушарий головного мозга в нейронах наблюдалось достоверное возрастание общего содержания

белка р53⁺ на 4 % относительно контроля, а на 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода этот показатель повысился на 13 % по отношению к таковому у контрольной группы крыс и на 9 % – по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В оба периода ишемически-реперфузионного повреждения КТД не обнаружено достоверных изменений содержания белка р53⁺ в глиальных клетках.

20-минутная ишемия с одночасовой реперфузией вызвала в исследуемой части неокортекса снижение дисперсии распределения белка р53⁺ в нервных и глиальных клетках на 25 и 23 % соответственно относительно показателя контрольной группы животных. Однако на 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода данный параметр в нейронах и глиоцитах возрос на 92 и 78 % соответственно относительно контрольной группы животных и на 157 и 130% соответственно – по сравнению с ранним сроком наблюдения.

Анализ изменений морфометрических параметров клеток КТД в раннем постишемическом периоде показал, что площадь р53⁺-нейро- и глиоцитов изменений не претерпела. Однако в позднем постишемическом периоде отмечалось достоверное увеличение площади р53⁺-глиоцитов на 29 % по отношению к показателю у контрольных крыс и на 26 % – относительно раннего срока наблюдения, а исследуемый показатель нервных клеток возрос в оба периода на 310 %.

Каротидная ишемия с одночасовой реперфузией привела к росту коэффициентов формы и элонгации р53⁺-нервных

клеток на 7 и 5 % соответственно относительно контроля, а данные показатели р53⁺-глиальных клеток изменений не претерпели.

В позднем периоде ишемически-реперфузионного повреждения КТД обнаружено, что коэффициенты формы и элонгации р53⁺ нервных клеток достоверно уменьшились на 18 и 6 % соответственно по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Однако по отношению к контрольной группе животных имело место снижение только коэффициента формы на 12 %. В свою очередь, коэффициенты формы и элонгации р53⁺-глиальных клеток снизились на 3 % и 4 % соответственно относительно как контроля, так раннего срока наблюдения.

Выводы: 1. В коре теменной доли полушарий головного мозга двусторонняя 20-минутная каротидная ишемия с последующей реперфузией снижает плотность расположения р53⁺-глиоцитов на 12-е сутки наблюдения, повышает процент р53⁺-нейронов и снижает процент р53⁺-глиоцитов как после одночасовой реперфузии, так и на 12-е сутки.

2. Каротидная ишемия-реперфузия в нейронах коры теменной доли увеличивает концентрацию белка р53⁺ в раннем ишемически-реперфузионном периоде и снижает ее в нейро- и глиоцитах – в позднем; нарушает морфометрические параметры р53⁺-нейроцитов в оба срока наблюдения, а глиоцитов – в позднем.

Таблица 1 - Количество р53⁺-нейроцитов и глиоцитов в коре теменной доли полушарий крыс с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга (на 1 мм²) (M±m)

Группа наблюдения	Количество р53 ⁺ -нейроцитов на 1 мм ²	Количество р53 ⁺ -глиоцитов на 1 мм ²
Контроль (n=11)	<u>21,00±1,20</u> 24,88±1,80	<u>78,64±4,92</u> 75,12±1,81
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 час (n=11)	<u>25,69±2,67</u> 32,16±2,10*	<u>72,64±7,26</u> 67,83±2,10*
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n=11)	<u>19,69±1,93</u> 81,75±3,16 [^]	<u>16,72±3,16[^]</u> 18,25±3,16 [^]

Примечание: в числителе - суммарная плотность различных классов клеток на 1 мм² коры теменной доли полушарий головного мозга; в знаменателе - процент различных классов клеток; вероятность разницы по сравнению с * - контролем; ^ - ишемией-реперфузией (20 мин / 1 час)

Таблица 2 - Содержание белка р53 и морфометрические параметры р53⁺ нервных и глиальных клеток коры теменной доли полушарий крыс с ишемически-реперфузионным повреждением головного мозга (M ± m)

Группа наблюдения	Концентрация р53 ИРМ Е _{иф}	Содержание р53 ИРМ Е _{иф}	Дисперсия распределения р53ИРМ	Площадь, мкм ²	Коэффициент формы	Коэффициент элонгации
Нервные клетки						
Контроль (n=11)	0,452±0,006	2,269±0,019	31,26±1,09	77,88±3,65	0,648±0,013	0,620±0,011
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 час (n=11)	0,539±0,007 p ₁ <0,001	2,349±0,018 p ₁ <0,01	23,41±0,68 p ₁ <0,001	76,99±3,30	0,694±0,012 p ₁ <0,01	0,652±0,011 p ₁ <0,05
Ишемия-реперфузия (12 суток) (n=11)	0,228±0,014 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	2,554±0,035 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	60,09±1,17 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	241,45±18,55 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	0,574±0,018 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	0,618±0,014 p ₂ <0,05
Глиальные клетки						
Контроль (n=11)	0,395±0,003	1,275±0,011	31,91±0,59	9,36±0,24	0,814±0,005	0,675±0,005
Ишемия-реперфузия 20 мин / 1 час (n=11)	0,403±0,003	1,290±0,012	24,69±0,39 p ₁ <0,001	9,55±0,25	0,821±0,005	0,674±0,005
Ишемия-	0,332±0,003	1,315±0,027	56,67±1,23	12,07±0,73	0,793±0,012	0,653±0,010

реперфузия (12 суток) (n=11)	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001		p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	p ₁ <0,001 p ₂ <0,01	p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
------------------------------------	--	--	--	---	--	--

Примечание. - вероятность разницы по сравнению с: p₁ - контролем (p<0,05, p<0,01, p<0,001); p₂ - ишемией-реперфузией (20 мин / 1 час) у контрольных животных (p<0,05, p<0,01, p<0,001)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Woodruff T. M., Thundyil J., Tang S.-C. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2011. – V. 6, № 11. – P. 1750-1766.
- Шляхто Е.В., Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 2 // *Вестник РАМН*. – 2012. – № 7. – С. 20-29.
- Chavez J.C., Hurko O., Barone F.C., Feuerstein G.Z. Pharmacologic interventions for stroke: looking beyond the thrombolysisologic interventions for stroke: looking beyond the thrombolysis // *Stroke*. – 2009. – V. 40, № 10. – P. 558-563.
- Nakka V.P., Gusain A., Raghur R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats // *Neurotox. Res.* – 2010. – V. 17, № 2. – P. 189-202.
- Dongxu Zhai, Kyle Chin, Min Wang, Fang Liu. Disruption of the nuclear p53-GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage // *Molecular Brain*. – 2014. – V. 7, № 20. – P.1-12.
- Шетова И. М. Роль полиморфных вариантов генов-регуляторов апоптоза: поли(адф-рибозы) полимеразы-1, апоптозиндуцирующего фактора и p53 в патогенезе ишемического инсульта : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.13. – Москва, 2005. – 146 с.
- Knight R., Melino G. Cell death in disease: from 2010 onwards // *Cell Death Dis.* – 2011. – V. 2, № 9 – P. 1-6.
- Favaloro B., Allocati N., Graziano V. Role of Apoptosis in disease // *Aging*. – 2012. – V. 4, № 5. – P. 330-349.
- Семененко А.И., Хоодаківський О.А., Черешнюк І.Л. [та ін.] Вплив інфузійних розчинів на фрагментацію ДНК клітин соматосенсорної кори при ішемії-реперфузії головного мозку у щурів // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. – 2014. – № 3. – С. 14-18.
- Скибо Г. Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга // *Патология*. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22-30.
- Konig 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.

T.I. KMET

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

INFLUENCE OF ACUTE CIRCULATION DISORDER IN THE CAROTID ARTERIES POOL UPON p53⁺PROTEIN CONTENT IN THE NERVOUS AND GLIA CELLS OF THE CEREBRAL CORTEX IN THE PARIETAL LOBE OF LABORATORY RATS

Resume: The influence of acute cerebral circulation in the carotid arteries pool up on the activity of proapoptotic processes in the nervous and glia cells of the cerebral cortex in the parietal lobe are studied in dynamics. 20-minute carotid ischemia with further reperfusion decreases the density of p53⁺-gliocytes in the cerebral cortex of the parietal lobe on the 12th day of observation, increases percentage of p53⁺-neurons and reduces the percentage of p53⁺-gliocytes both after one-hour reperfusion and on the 12th day.

Carotid ischemia-reperfusion in the cerebral cortex neurocytes of the parietal lobe increases p53⁺ protein concentration in the early ischemic-reperfusion period and decreases it in the neuro- and gliocytes – in the late period; morphometric parameters of p53⁺-neurocytes are disturbed in both periods of observation, and gliocytes – only in the late one.

Keywords: cerebral cortex of the parietal lobe, ischemia-reperfusion, apoptosis.

УДК 581.6:634:631.526.32(574.3)

М.К. КУДАЙБЕРГЕНОВА, Ж. ХАКИМЖАНОВА, Л. КИЕКБАЕВА, Н.З. АХТАЕВА, А.Т. МАМУРОВА,
У.М. ДАТХАЕВ, Г.Ш. БУРАШЕВА

*Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова
Казахский национальный университет имени аль-Фараби*

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТЕНИЯ ECHINOPS ALBICAULIS

Впервые изучен компонентный состав основных групп биологически активных веществ растения рода Мордовник (*Echinops albicaulis*). В плодах обнаружены витамины, флавоноиды, органические и фенолокислоты. Определен количественный состав аминокислот – и жирных кислот растения. В растении *Echinops albicaulis* в достаточном количестве обнаружены олеиновая кислота (79,9%), 19 аминокислот, из которых в наибольшем количестве содержатся глутаминовая (2255 мг/г) и аспаргиновая (1229 мг/г) кислоты, аланин (966 мг/г).

Ключевые слова: фитохимия, растения *Echinops albicaulis*, исследование.

Echinops albicaulis Kar.et Kir. (сем. Asteraceae) мордовник белостебельный - многолетнее растение высотой 40-80 см. Корень деревянистый, вертикальный. Стебель одиночный,

вверху иногда коротко-ветвистый, гранистый, по всей длине плотно и густо-беловойлочный, без железистого опушения. Листья кожистые, сверху зеленовато-серые от рыхлого