

УДК 577.2:611-018.82.84|616.831-005.4

Т.І. КметьБуковинський державний медичний
університет, м. Чернівці**УМІСТ РНК У НЕРВОВИХ ТА ГЛІАЛЬНИХ
КЛІТИНАХ РІЗНИХ ЧАСТОК КОРИ
ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ЗА УМОВ НЕПОВНОЇ
ГЛОБАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ****Ключові слова:** головний мозок,
каротидна ішемія-реперфузія,
нейрони, глія, РНК.**Резюме.** Досліджено динаміку вмісту РНК у нейронах та гліальних клітинах різних часток кори великих півкуль по завершенні одностодинової реперфузії та на 12-ту добу після 20-хвилинної каротидної ішемії. Встановлено, що в ранньому ішемічно-реперфузійному періоді пошкодження головного мозку в корі лобової та скроневої часток кори великих півкуль змінюють концентрації РНК більш суттєво реагують нейрони, а в корі тім'яної частки - гліальні клітини. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в нейронах і гліальних клітинах кори лобової та скроневої часток концентрація РНК залишалася підвищеною стосовно контролю, а в корі тім'яної частки - знижувалася в нейронах та поверталася до контрольних значень - у гліальних клітинах.**Вступ**

Цереброваскулярна патологія є однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини, що зумовлено зростанням розповсюдженості судинних захворювань [7]. Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я констатовано, що інсульт є глобальною епідемією, яка загрожує життю і здоров'ю населення всього світу, оскільки за частотою дана патологія є другою причиною смертності, поступаючись лише ішемічній хворобі серця та передуючи онкологічним захворюванням [6]. Крім того, інсульт стає основною причиною інвалідизації і соціальної дезадаптації населення. Особливу увагу привертають ішемічні пошкодження головного мозку, з якими пов'язана більшість цереброваскулярної патології, що обумовлює медико-соціальне значення ішемії мозку [4]. Враховуючи значну розповсюдженість цієї нозології актуальним і важливим для сучасної медицини є поглиблене дослідження патогенетичних особливостей ішемічно-реперфузійного пошкодження різних відділів кори головного мозку.

Нервова тканина, на відміну від інших, характеризується дуже високим вмістом рибонуклеїнових кислот (РНК) [9]. Неадекватно тривале або надмірно високе функціональне навантаження на нейрони призводить до зниження вмісту РНК. Зменшення площі ядер і концентрації в них РНК свідчить про посилення її транспорту з ядра до цитоплазми, а також про переважання процесів розпаду над синтезом, що в подальшому зменшує забезпеченість мозку життєво важливими сполуками, створює передумови недостатності його функцій [1].

© Т.І. Кметь, 2014

Станом на сьогоднішній день достатньо вивчена динаміка морфофункціональних змін у корі різних часток півкуль головного мозку за умов ішемії-реперфузії [2], однак реакція РНК на дане втручання окремих клітин (нейронів, глії) залишається недослідженою.

Мета дослідження

Вивчити в динаміці вплив неповної глобальної ішемії- головного мозку з подальшою реперфузією різної тривалості на сумарний вміст та концентрацію РНК в нервових і гліальних клітинах кори лобової, тім'яної та скроневої часток великих півкуль мозку щурів.

Матеріал і методи

Дослідження проведені на шестимісячних білих нелінійних щурах-самцях трьох експериментальних груп: 1. Контрольні тварини (n=11); 2. Щури, яким моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію з одностодиновою реперфузією (n=11); 3. Щури, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії (n=11).

Усі тварини утримувалися на стандартному раціоні харчування віварію, при природній зміні дня і ночі. Експериментальні втручання здійснювали відповідно основним положенням GLP (1981 р.) Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Неповну глобальну ішемію мозку моделювали 20-хвилинним кліпсуванням загальних

сонних артерій [5], після чого кровотік по цих судинах відновлювали. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії мозку частину тварин виводили з експерименту через 1 годину по завершенні реперфузійного періоду, а відстрочених - на 12-ту добу. Моделювання каротидної ішемії та декапітацію здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг маси тіла). Мозок виймали на холоді, користуючись атласом стереотаксичних координат [8] забирали кору лобової, тім'яної та скроневої часток півкуль головного мозку, фіксували в 10 % розчині Буена впродовж 24 годин і після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Для виявлення РНК зрізи депарафінували, регідували в низхідних концентраціях етанолу та зафарбовували галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном. Аналіз гістологічних зрізів проводили в системі цифрового аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) в спектрі люмінесценції на флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP (Zeiss, Німеччина). У випадково відібраних зрізах кори досліджуваних часток півкуль головного мозку визначали загальний уміст РНК (в одиницях оптичної щільності, Оощ) та її концентрацію (Оощ на 1 мкм²) [3].

Цифрові результати експериментальних досліджень опрацьовані на персональному комп'ютері у прикладних програмах "Statistica 6.0" та "SPSS 13". Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Обговорення результатів дослідження

Аналіз результатів з вивчення раннього впливу ішемії-реперфузії головного мозку на вміст РНК у нейронах, глії та апоптичних клітинах кори лобової частки півкуль неокортекса показав, що дане втручання підвищує сумарний уміст РНК на 67 %, 21 % та 22 % відповідно стосовно контролю (табл.). Більш суттєве збільшення вмісту РНК у нейронах може розглядатися як свідчення активації процесів біосинтезу білка, генів раннього реагування і як показник нейрональної пластичності, спрямованої на подолання наслідків ушкодження.

Концентрація РНК у деструктивно змінених клітинах у цей період дослідження достовірно зменшилася на 3 % ($p < 0,05$), а в нейронах та гліоцитах навпаки, зросла на 41 % та 21 % відповідно стосовно контрольної групи шурів.

У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді в корі тім'яної частки півкуль головного мозку спостерігалось зниження транскрипційної активності (за сумарним умістом РНК) нервових, гліальних та апоптичних клітин на 20 %, 12 % та 42 % відповідно стосовно контрольної групи тварин. Проте концентрація пулу нуклеїнових кислот зменшилася тільки в глії кори досліджуваної частки півкуль на 12 % відносно контролю. Зниження вмісту РНК у нейронах, глії та апоптично змінених клітинах відображає процеси ушкодження та порушення функції неокортекса тім'яної частки.

Дослідження вмісту РНК у корі клітин скроневої частки півкуль головного мозку в ранньому постішемічному періоді показало, що її концентрація підвищилася тільки в нейронах на 7 % стосовно контрольної групи шурів. Концентрація та сумарний уміст РНК в інших клітинах кори скроневої частки великих півкуль змін не зазнали.

У пізньому постішемічному періоді (12-та доба) у нервових клітинах кори лобової частки півкуль головного мозку концентрація РНК залишалася підвищеною на 25 % стосовно такої в контрольних шурів, проте зменшилася на 11 % стосовно показника в ранньому терміні спостереження. У свою чергу, сумарний уміст РНК у досліджуваному класі клітин вірогідно зменшився на 58 % відносно раннього періоду ішемії-реперфузії. Концентрація пулу нуклеїнових кислот гліальних клітин у даному терміні спостереження підвищилася на 11 % стосовно такої в контрольної групи тварин і зменшилася на 8 % стосовно раннього постішемічного періоду. Сумарний уміст РНК у цей період повертався до рівня контролю, проте зменшився на 11 % відносно раннього терміну спостереження.

У віддаленому періоді ішемічно-реперфузійного ураження кори лобової частки півкуль спостерігається підвищення концентрації РНК та сумарного її вмісту в апоптично змінених клітинах на 24 та 59 % відповідно щодо контролю і на 28 та 30 % - стосовно раннього терміну спостереження.

Аналіз результатів з вивчення відстрочених наслідків ішемії-реперфузії для кори тім'яної частки півкуль показав зниження концентрації РНК у нервових клітинах на 3 % ($p < 0,05$) стосовно контролю і на 5 % ($p < 0,05$) - стосовно раннього терміну спостереження. Її сумарний уміст знизився на 12 % відносно контрольної групи тварин і підвищився на 10 % - стосовно показника в ранньому терміні дослідження. У гліальних клітинах кори досліджуваної частки

Таблиця

Динаміка змін вмісту РНК (одиниці оптичної щільності, Оощ) у корі різних часток великих півкуль шурів за умов експериментального ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку ($M \pm m$)

Група спостереження	Нейрони		Гліальні клітини		Апоптичні клітини	
	Уміст РНК на 1 мкм ²	Сумарний уміст РНК	Уміст РНК на 1 мкм ²	Сумарний уміст РНК	Уміст РНК на 1 мкм ²	Сумарний уміст РНК
Кора лобової частки						
Контроль	0,195±0,001	19,31±0,23	0,261±0,004	4,98±0,08	0,619±0,007	17,08±1,08
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	0,274±0,002 $p_1 < 0,001$	32,19±0,53 $p_1 < 0,001$	0,316±0,004 $p_1 < 0,001$	6,01±0,10 $p_1 < 0,001$	0,599±0,004 $p_1 < 0,05$	20,90±1,25 $p_1 < 0,05$
Ішемія-реперфузія (12 діб)	0,243±0,003 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	18,76±0,42 $p_2 < 0,001$	0,290±0,006 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	5,33±0,16 $p_2 < 0,01$	0,768±0,007 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	27,10±0,70 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$
Кора тім'яної частки						
Контроль	0,178±0,001	14,35±0,20	0,235±0,004	4,37±0,07	0,702±0,001	20,42±0,82
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	0,181±0,001	11,45±0,16 $p_1 < 0,001$	0,207±0,005 $p_1 < 0,001$	3,86±0,09 $p_1 < 0,001$	0,668±0,025	11,98±0,86 $p_1 < 0,001$
Ішемія-реперфузія (12 діб)	0,173±0,002 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	12,60±0,18 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	0,232±0,005 $p_2 < 0,01$	4,56±0,11 $p_2 < 0,001$	0,734±0,017 $p_2 < 0,01$	15,17±0,96 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$
Кора скроневої частки						
Контроль	0,223±0,002	22,57±0,35	0,281±0,004	5,22±0,08	0,633±0,006	20,88±1,22
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	0,239±0,002 $p_1 < 0,001$	21,55±0,32	0,275±0,004	5,23±0,09	0,638±0,007	20,22±1,19
Ішемія-реперфузія (12 діб)	0,288±0,004 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	21,76±0,58	0,327±0,007 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	6,30±0,19 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	0,767±0,006 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	29,37±0,70 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примітка. – вірогідність різниці порівняно з: p_1 - контролем; p_2 - ішемією-реперфузією (20 хв / 1 год)

півкуль концентрація та сумарний уміст пулу рибонуклеїнових кислот підвищився на 12 та 18 % відповідно стосовно раннього періоду ішемії-реперфузії. У деструктивно змінених клітинах кори тім'яної частки півкуль мало місце зниження сумарного вмісту РНК на 26 % стосовно контролю і зростання вмісту РНК та її концентрації на 26 % та 10 % відповідно стосовно раннього терміну спостереження.

У пізньому постішемічному періоді (12-та доба) у нервових, гліальних, апоптичних клітинах кори скроневої частки півкуль головного мозку спостерігалось зростання концентрації нуклеїнових кислот на 29, 16, 21 % відповідно щодо контрольної групи тварин і на 21, 19 та 20 % відповідно - стосовно раннього терміну спос-

тереження. Сумарний уміст РНК у корі досліджуваної частки півкуль підвищився в гліальних та апоптично змінених клітинах на 21 % та 41 % відповідно відносно контролю і на 20 % та 45 % - стосовно раннього періоду ішемії-реперфузії. Зростання вмісту РНК свідчить про посилення транскрипційних та трансляційних процесів у досліджуваних класах клітин за умов ішемії.

Таким чином, вивчення гомеостазу нуклеїнових кислот у різні терміни ішемії-реперфузії показало залежність виявлених змін від локалізації патологічного процесу і строків його розвитку. Отримані дані можуть послужити основою для розробки патогенетично виправданих підходів до фармакологічної корекції розладів нуклеїнового гомеостазу. Основою порушень функції головного

мозку при ішемії-реперфузії є структурні зміни, зумовлені метаболічними розладами, в першу чергу - синтезу білка. Оскільки перенос інформації реалізується від нуклеїнових кислот на білок, логічно думати, що розлади нуклеїнового гомеостазу можуть виявитися однією з причин індукції патологічних процесів у мозку, пов'язаних із загальнобіологічною дією її фрагментів, на які вона розпадається під впливом ендонуклеаз.

Висновки

1. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді пошкодження головного мозку в корі лобової та скроневої часток півкуль зміною концентрації РНК більш суттєво реагують нейрони, а в корі тім'яної частки - гліальні клітини.

2. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду в нейронах і гліальних клітинах кори лобової та скроневої часток концентрація РНК залишалася підвищеною стосовно контролю, а в корі тім'яної частки - знижувалася в нейронах та поверталася до контрольних значень - у гліальних клітинах.

Перспективи подальших досліджень

Будуть продовжені дослідження ранніх і відстрочених змін вмісту РНК у нервових і гліальних клітинах кори різних часток великих півкуль головного мозку щурів за умов поєднаної дії цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку.

Література. 1. Андріюк Л. В. Актуальні аспекти застосування луцетама при порушеннях нуклеїнового гомеостазу у хворих на дисциркуляторну енцефалопатію / Л.В. Андріюк // Ліки України. - 2010. - №9 (145). - С. 147-152. 2. Кметь Т.І. Особливості змін сумарної щільності гліальних клітин різних часток кори великих півкуль, індукованих неповною глобальною ішемією головного мозку в самців-щурів зі стрептозотциновим цукровим діабетом / Т.І. Кметь // Сучасні тенденції розвитку медичної науки та медичної практики : міжнар. наук.-практ. конф.: тези доповідей. - Львів, 2013. - С. 119-121. 3. Пирс Э. Гистохимия. - М. - 1962. - 961 с. 4. Скворцова В. И. Ишемический инсульт / В. И. Скворцова, М. А. Евзельман. - Орел, 2006. - 404 с. 5. Скибо Г. Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г. Г. Скибо // Патология. - 2004. - Т. 1, № 1. - С. 22-30. 6. Donnan G. Stroke / G. Donnan, M. Fisher, M. Macleod [et al.] // The Lancet. - 2008. - Vol. 371, №9624. - P. 1612 - 1623. 7. Hachinski V. World Stroke Day: Little strokes, big troubles /

V. Hachinski // Stroke. - 2008. - № 39. - P.2407-2408. 8. Konig J.F. The rat brain. A stereotaxis atlas of forebrain and lower part of the brain stem / J.F. Konig, P.A. Klippel. - Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1963. - 162 p. 9. Winick M. Changes in nucleic acid and protein content of the human brain during growth / M. Winick // Pediatr. Res. - 1998. - №2. - P. 352-355.

СОДЕРЖАНИЕ РНК В НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КОРЫ РАЗНЫХ ДОЛЕЙ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ПРИ НЕПОЛНОЙ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Т.И. Кметь

Резюме. Исследована динамика содержания РНК в нейронах и глиальных клетках различных долей коры больших полушарий по завершении односторонней реперфузии и на 12-е сутки после 20-минутной каротидной ишемии. Установлено, что в раннем ишемически-реперфузионном периоде повреждения головного мозга в коре лобной и височной долей коры больших полушарий изменением концентрации РНК более существенно реагируют нейроны, а в коре теменной доли - глиальные клетки. На 12-е сутки ишемически-реперфузионного периода в нейронах и глиальных клетках коры лобной и височной долей концентрация РНК оставалась повышенной по отношению к контролю, а в коре теменной доли - снижалась в нейронах и возвращалась к контрольным значениям в глиальных клетках.

Ключевые слова: головной мозг, каротидная ишемия-реперфузия, нейроны, глия, РНК.

RNA CONTENT IN THE NERVOUS AND GLIAL CELLS OF VARIOUS AREAS IN THE CEREBRAL HEMISPHERES UNDER CONDITIONS OF INCOMPLETE GLOBAL ISCHEMIA-REPERFUSION OF THE BRAIN

T.I. Kmet

Abstract. The dynamics of RNA content in neurons and glial cells of various areas of the cerebral hemispheres on completion of a one-hour reperfusion and on the 12th day after 20-minute carotid ischemia was examined. The neurons were found to react more considerably to the changes of RNA concentrations during early cerebral injuries in the frontal and temporal areas of the cortex, and glial cells - in the parietal area. On the 12th day of ischemic-reperfusion period RNA concentration was increased in the neurons and glial cells of the frontal and temporal lobes of the cortex as compared with the control, and in the parietal lobe it was lower in the neurons and returned to the control indices in the glial cells.

Key words: brain, carotid ischemia-reperfusion, neurons, glia, RNA.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.13, №3 (49). - P.87-90.

Надійшла до редакції 01.08.2014

Рецензент – проф. Ткачук С.С., 2014

© Т.І. Кметь, 2014