

медицинский наногидроксиапатит. *Стоматология*. 2016; 95 (4): 34–36. [Makeeva I.M., Polyakova M.A., Avdeenko O.E. et al. Evaluation of the effectiveness of prolonged use of Appadent Total Care toothpaste containing medical nano-hydroxyapatite. *Stomatologiya*. 2016; 95 (4): 34–36. (In Russ.)] DOI: 10.17116/stomat201695434-36.

5. Жаркова О.А. Реминерализирующая терапия с использованием GC TOOTH MOUSSE. *Проблемы стоматол.* 2012; (1): 33–37. [Zharkova O.A. Remineralizing therapy with the use of GC TOOTH MOUSSE. *Problemy stomatologii*. 2012; (1): 33–37. (In Russ.)]

6. Агафонов Ю.А., Ронь Г.И. Лечение гиперестезии дентина при потере твердых тканей зуба. *Проблемы стоматол.* 2007; (6): 36–38. [Agafonov Yu.A., Ron' G.I. Treatment of hyperesthesia of dentin with loss of hard tooth tissues. *Problemy stomatologii*. 2007; (6): 36–38. (In Russ.)]

7. Кузьмина Э.М., Васина С.А., Смирнова Т.А. Результаты применения зубных паст с наногидроксиапатитом у пациентов с повышенной чувствительностью зубов. *Dental forum*. 2014; (2): 34–37. [Kuz'mina E.M., Vasina S.A., Smirnova T.A. Results of nano-hydroxyapatite toothpastes application in patients with teeth hypersensitivity. *Dental forum*. 2014; (2): 34–37. (In Russ.)]

8. Булкина Н.В., Пудовкина Е.А., Акулович А.В., Захаревич А.М. Изменение морфологии поверхности дентина после обработки пастами с гидроксиапатитом и с наногидроксиапатитом кальция. *Стоматология*. 2014; (1): 11–15. [Bulkina N.V., Pudovkina E.A., Akulovich A.V., Zakharevich A.M. Changes in morphology of the dentin surface after treatment with pastes with hydroxyapatite and calcium nanohydroxyapatite. *Stomatologiya*. 2014; (1): 11–15. (In Russ.)]

9. Соловьёва Ж.В., Фаттал' Р.К., Кириш К.Д. Оценка эффективности современных лечебно-профилактических паст на основе наногидроксиапатита. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2016; 18 (2): 66–70. [Solovyeva Zh.V., Fattal' R.K., Kirsh K.D. The effectiveness of modern treatment-and-prophylactic pastes based on nano-hydroxyapatite. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2016; 18 (2): 66–70. (In Russ.)]

10. Полякова М.Я., Пилягина А.А., Хон Я.А. Применение наногидроксиапатита при гиперестезии у пациентов с клиновидными дефектами зубов. *Фарматека*. 2015; (s2–15): 7–8. [Polyakova M.Ya., Pilyagina A.A., Khon Ya. A. Application of nanohydroxyapatite in patients with wedge-shaped defects of teeth and hyperesthesia. *Farmateka*. 2015; (s2–15): 7–8. (In Russ.)]

УДК 612.084: 577.121.7

© 2017 Дроздова Г.А. и соавторы

ПОСТГИПОКСИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ АСТРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Галина Александровна Дроздова¹, Айгуль Фидратовна Самигуллина^{2*},
Елена Александровна Нургалева², Гульнар Анузовна Байбурина²,
Алексей Александрович Сорокин³

¹Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия;

²Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

³Республиканский кардиологический центр, г. Уфа, Россия

Поступила 09.10.2017; принята в печать 15.11.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-984

Цель. Изучить характер реактивных изменений астроцитарной глии и окислительный метаболический статус в зрительной коре головного мозга экспериментальных животных после острой остановки кровообращения.

Методы. Серия экспериментов выполнена на 47 половозрелых самцах неинбредных белых крыс с массой тела 150–180 г. Под эфирным наркозом моделировали 5-минутную аноксию интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией и наблюдением за динамикой общего состояния животных в течение 5 нед после оживления. Изучали морфометрические характеристики реактивного астроглиоза с исследованием нейроспецифического белка (глиофибрилярного кислого протеина) методом иммуногистохимии. Оценивали процессы свободнорадикального окисления в гомогенатах головного мозга путём определения продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, и методом хемилюминесцентного анализа. Состояние антиоксидантной системы в исследуемых тканях определяли с помощью регистрации активности супероксиддисмутазы и уровня восстановленного глутатиона.

Результаты. Со стороны астроглиального звена зарегистрирована значительная экспрессия глиального фибриллярного кислого белка на протяжении всего периода наблюдения с максимальной интенсификацией к 21-м суткам эксперимента. В ранние сроки и на 2-й неделе после оживления отмечено нарастание светосуммы железоиндуцированной хемилюминесценции с последующим длительным накоплением вторичных метаболитов перекисного окисления липидов. Исследуемый уровень супероксиддисмутазы достоверно повышался не только на 1–3-и сутки, но и на 2-й неделе постреанимационного периода. При оценке уровня восстановленного глутатиона достоверное повышение его содержания было отмечено в первые 3 сут после оживления.

Вывод. Выявленная активация синтеза нейроспецифического белка с предшествующими сдвигами в про- и антиоксидантных системах указывает на гиперреактивный характер астроглиоза, формирующийся в структурах головного мозга, на фоне непрерывного окислительного стресса, нарушающего функционирование нейронных сетей в области зрительной коры экспериментальных животных.

Ключевые слова: нейродегенерация, астроглия, зрительная кора, окислительный стресс, эксперимент.

POST-HYPOXIC REACTION OF ASTROCYTES OF THE VISUAL CORTEX IN THE EXPERIMENT

G.A. Drozdova¹, A.F. Samigullina², Ye.A. Nurgaleeva², G.A. Bayburina², A.A. Sorokin³
¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;

²Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;

³Republican Cardiology Center, Ufa, Russia

Aim. To study the nature of reactive changes in astrocytic glia and oxidative metabolic status in the visual cortex of experimental animals after acute circulatory arrest.

Methods. A series of experiments was performed on 47 mature males of noninbred white rats weighing 150–180 g. Under general ethereal anesthesia, a 5-minute anoxia was modelled by intrathoracic clamping of the vascular bundle of the heart followed by resuscitation and observation of the general state dynamics of the animals within 5 weeks after revitalization. Morphometric characteristics of reactive astrogliosis were studied with evaluation of a neurospecific protein (glial fibrillary acidic protein) by immunohistochemistry. The processes of free radical oxidation in brain homogenates were evaluated by determination of products reacting with thiobarbituric acid and by chemiluminescence analysis. The state of antioxidant system in the studied tissues was determined by recording the activity of superoxide dismutase and the level of reduced glutathione.

Results. Regarding astroglial link, significant expression of glial fibrillar acidic protein was recorded throughout the observation period with maximum intensification on day 21 of the experiment. In the early periods and during the second week after recovery, the increase of the light sum of iron-induced chemiluminescence was noted, followed by a prolonged accumulation of secondary metabolites of lipid peroxidation. The investigated level of superoxide dismutase significantly increased not only on days 1–3, but also during the second week of the postresuscitation period. When assessing the level of reduced glutathione, a significant increase of its content occurred during the first three days after recovery.

Conclusion. The revealed activation of a neurospecific protein production with preceding shifts in pro- and antioxidant systems is indicative of hyperreactive character of astrogliosis formed in brain structures against the continuous oxidative stress, disrupting the functioning of neural networks in the visual cortex of experimental animals.

Keywords: neurodegeneration, astroglia, visual cortex, oxidative stress, experiment.

При остром повреждении астроциты и нейроны претерпевают глубокое морфофункциональное remodelирование, зависящее от давности и локализации процесса. Установленные взаимосвязи между характером астроглиальной активации и нейронального повреждения включают развитие астроглиа-связанных процессов, в том числе изменение метаболизма нейронов, функционирования нейронных сетей и гематоэнцефалического барьера, потенцирование эксайтотоксичности, стимуляцию нейровоспалительного ответа и инициацию нейропластических и репаративных процессов [1].

При ишемии с последующей реперфузией выживаемость нейронов во многом зависит от уровня активности факторов антиоксидантной защиты, обеспечивающих инактивацию свободных радикалов [2]. Тем самым предотвращаются необратимые повреждения клеточных липидов, белков и нуклеиновых кислот, приводящие к развитию некротических или апоптотических процессов клеточных структур, то есть формированию нейродегенерации [3]. Необходимо отметить, что нарушение церебральной гемодинамики также сопряжено с патологией сенсорных систем, в том числе и зрительной, играющей значительную роль в восприятии и обработке информационного потока окружающей действительности [4].

Цель исследования — изучить характер реактивных изменений астроцитарной глии и окислительный метаболический статус в зрительной коре головного мозга экспериментальных животных после острой остановки кровообращения.

Серия экспериментов выполнена на 47 половозрелых самцах неинбредных белых крыс с массой тела 150–180 г. Под эфирным наркозом моделировали 5-минутную аноксию интраторакальным пережатием сосудистого пучка сердца с последующей реанимацией. Контрольную группу крыс (n=5) вводили в наркоз без моделирования аноксии.

Все эксперименты выполнены в соответствии с нормативными документами, регламентирующими гуманное обращение с животными.

Наблюдение за динамикой общего состояния животных проводили в течение 5 нед после оживления. В 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е, 21-е и 35-е сутки после реанимации животных выводили из эксперимента.

Степень реактивности астроглиальных клеток оценивали с помощью иммуногистохимического метода с диаминобензидин-детекцией антител к глиофибрилярному белку (GFAP — от англ. Glial Fibrillary Acidic Protein), служащему специфическим маркером астроцитов [5].

Головной мозг фиксировали нейтральным забуференным 10% формалином и далее обрабатывали по стандартной методике с последующей заливкой в парафиновую среду. Изготавливали срезы мозга толщиной 4 мкм, монтировали на предметные стекла с поли-L-лизинным покрытием, затем депарафинизировали и регидратировали.

Высокотемпературную демаскировку антигенных детерминант проводили в условиях водяной бани при температуре +90 °С. После охлаждения стекла были промыты 0,05% фосфатным буфером дважды, затем

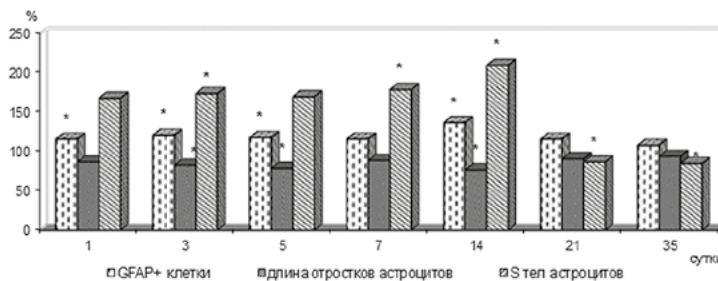


Рис. 1. Морфометрические характеристики GFAP-экспрессирующих клеток астроглии зрительной коры головного мозга у экспериментальных животных в реперфузионном периоде (% характеристик контрольной группы); *статистическая значимость различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$); S — площадь; GFAP (от англ. Glial Fibrillary Acidic Protein) — глиофибрилярный кислый протеин

нанесены первичные антитела. Использовали кроличьи поликлональные антитела к глиальному фибриллярному кислому белку GFAP (Cloud-Clone Corp. Wuhan). Антитела к GFAP инкубировали 10 мин при комнатной температуре, потом стёкла промывали 0,05% фосфатным буфером.

В качестве визуализирующей системы использовали полимерную систему UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) по протоколу, рекомендованному производителем. Затем препараты докрасивали гематоксилином (БиоВитрум, Россия) и заключали в монтирующую среду (Bio-Mount, Bio-Optica, Italy). Использовали позитивные и негативные контроли.

Оценку процессов свободнорадикального окисления в гомогенатах головного мозга проводили путём определения продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, а также методом хемилюминесцентного анализа с использованием отечественного хемилюминомера ХЛ-003. Исследовали спонтанную и Fe^{2+} -индуцированную хемилюминесценцию, которая позволяет выявлять накопление перекисных радикалов. Состояние антиоксидантной системы в исследуемых тканях определяли путём регистрации активности супероксиддисмутазы [6] и уровня восстановленного глутатиона [7].

Статистическая обработка полученных результатов осуществлена в программе Statistica 7.0 с применением непараметрических методов статистики. Значимость различий показателей в группах оценивали с использованием метода Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Патоморфологические изменения со стороны реактивной астроглии в зрительной коре головного мозга опытных животных затрагивали все периоды эксперименталь-

ного наблюдения. Динамично нарастающая с первых суток реперфузионного периода умеренная экспрессия GFAP с некоторым снижением визуализируемой ветвистости нейрофиламентов сохранялась и к 5-м суткам эксперимента. Наблюдаемая в этот период активная экспрессия GFAP в клетках астроцитарного ряда, характеризует процессы реактивного астроглиоза, являющегося адаптивной реакцией клеток нейроглии с существенными репаративными функциями [8, 9].

На 14-е сутки после острой ишемии в астроцитах коры головного мозга была выявлена гиперэкспрессия GFAP, регистрировалось увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов на 37% ($p=0,046$; рис. 1). При этом выявлено статистически значимое увеличение средней площади их тел в 2,1 раза ($p=0,022$), обусловленное гипертрофией цитоплазмы, равномерно и интенсивно экспрессирующей GFAP, а также укорочение и утолщение отростков в среднем на 23% ($p=0,041$).

Формируемые астроглиальные пролиферативные изменения структуры нейрональной ткани играют, с одной стороны, положительную роль, отграничивая зону некроза и аутоиммунного воспалительного процесса [10, 11]. В то же время глиальные рубцы препятствуют регенерации аксонов, тем самым нарушая функционирование нейрональных связей.

На 21-е сутки сохранялась умеренная экспрессия GFAP в астроцитах коры головного мозга при незначительном снижении их плотности, что может свидетельствовать о включении процессов апоптотического повреждения глиальных структур в условиях дефицита энергии, кислорода и избытка свободных радикалов, глутамата и кальция [12].

К 35-м суткам астроциты также имели

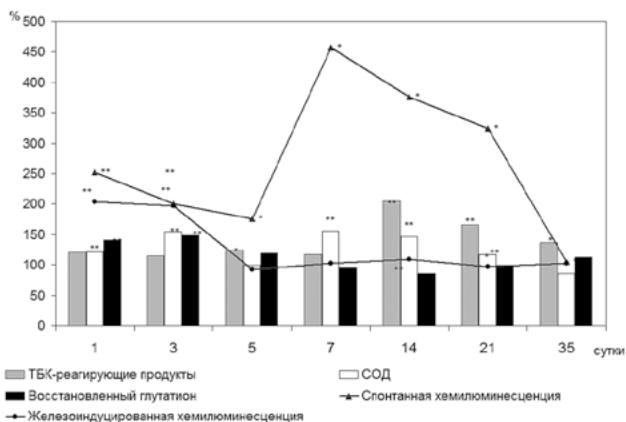


Рис. 2. Динамика показателей прооксидантного и антиоксидантного звеньев в зрительной коре головного мозга в постреанимационном периоде (% показателей контрольной группы); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ — статистическая значимость различий по сравнению с контрольной группой (критерий Манна–Уитни); ТБК — тиобарбитуровая кислота; СОД — супероксиддисмутаза

выраженную экспрессию GFAP, характеризовались мелкими размерами, паутиновидной формой с равномерным расположением в слоях коры головного мозга.

Изучение процессов свободнорадикального окисления в тканях зрительной коры методом хемиллюминесценции выявило значимое повышение спонтанной светимости практически во все сроки наблюдения. Регистрируемое нарастание светосуммы железоиндуцированной хемиллюминесценции в ранние сроки и на 2-й неделе после оживления с последующим длительным накоплением вторичных метаболитов перекисного окисления липидов (продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) свидетельствует, вероятно, о постоянной напряженности процессов образования радикалов в результате микроциркуляторных нарушений в условиях реперфузии (рис. 2).

Со стороны антиоксидантной системы регистрировалась активация как ферментативной, так и неферментативной систем защиты (см. рис. 2). Исследуемый уровень супероксиддисмутазы достоверно повышался не только на 1–3-и сутки, но и на 2-й неделе постреанимационного периода. При оценке уровня восстановленного глутатиона достоверное повышение его содержания было отмечено в первые 3 сут после оживления, что является реакцией, реализуемой астроцитарными клетками макроглии [13], дополнительно сберегающей нейроны от окислительного стресса и компенсирующей характерную для мозга относительно низкую активность каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы.

Известно, что клетки нервной ткани

особенно чувствительны к нарушениям прооксидантно-антиоксидантного равновесия вследствие большого количества липидов, которые содержатся в их мембранах. Прежде всего повреждающее действие активных форм кислорода отражается на функционировании миелинизированных волокон, обеспечивающих интегрированное взаимодействие нейрональных структур. В то же время полноценное функционирование нейронных сетей зависит и от микро- и макроглиального окружения, обеспечивающего в отношении нейронов и их волокон трофическую и репаративную функции.

ВЫВОДЫ

1. В реперфузионном периоде на протяжении 35 сут наблюдения были определены выраженные сдвиги про- и антиоксидантного равновесия, что свидетельствует о длительном развитии окислительного стресса в структурах зрительной коры экспериментальных животных.

2. Регистрируемая активная экспрессия глиофибрилярного кислого протеина астроглиальными элементами свидетельствует о формировании гиперреактивного диффузного астроглиоза, нарушающего функционирование нейронных сетей в области зрительной коры экспериментальных животных на протяжении длительного восстановительного периода после острой нейродегенерации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lundgaard I., Osorio M.J., Kress B.T. et al. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*. 2014; 276: 161–173. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.050.
2. Gwag B.J., Won S.J., Kim D.Y. Excitotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in ischemic neuronal death. In: *New concepts in cerebral ischemia*. N.Y. Washington: CRC PRESS. 2002; 88–121.
3. Artal-Sanz M., Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *Protein. Peptides*. 2005; 579 (15): 3287–3896. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.03.052.
4. Горбунов А.В., Богомолова А.А., Хавронина К.В. «Глазные» симптомы как признаки повреждения головного мозга. *Вестн. ТГУ*. 2014; 19 (4): 1108–1110. [Gorbunov A.V., Bogomolova A.A., Khavronina K.V. «Eye» symptoms as signs of brain damage. *Vestnik TGU*. 2014; 19 (4): 1108–1110. (In Russ.)]
5. Zhu H., Dahlstrom A. Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains. *J. Neurosci. Res*. 2007; 85 (12): 2783–2792. DOI: 10.1002/jnr.21257.
6. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochemie*. 1975; 57 (5): 657–660. PMID: 171001.
7. Путилина Ф.Е. *Определение содержания восстановленного глутатиона. Методы биохимических исследований*. Л.: ЛГУ. 1982; 183–187. [Putilina F.E. *Opredelenie sodержaniya vosstanovlennogo glutationa. Metody biokhimicheskikh issledovaniy*. (Determination of the reduced glutathione content in tissues. Methods in biochemical studies.) Leningrad: LGU. 1982; 183–187. (In Russ.)]
8. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009; 3: 638–647. DOI: 10.1016/j.tins.2009.08.002.
9. Oberheim N.A., Takano T., Han X. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J. Neurosci*. 2009; 29 (10): 3276–3287. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009.
10. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009; 32 (12): 638–647. DOI: 10.1016/j.tins.2009.08.002.
11. Pekny M., Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005; 50 (4): 427–434. DOI: 10.1002/glia.20207.
12. Sizonenko S.V., Camm E.J., Dayer A., Kiss J.Z. Glial responses to neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2008; 26 (1): 37–45. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2007.08.014.
13. Chen Y., Vartiainen N.E., Ying W. et al. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by glutathione-dependent mechanism. *J. Neurochem*. 2001; 77: 1601–1610. PMID: 11413243.

Уважаемые читатели!

С 1 сентября 2017 года во всех почтовых отделениях связи РФ идёт подписка на первое полугодие 2018 года на «Казанский медицинский журнал».

Подписные индексы журнала:

Агентство Роспечать: 48073 — годовая подписка

73205 — подписка на полгода.

Почта России: П2376 — подписка на полгода,

<https://podpiska.pochta.ru> — онлайн-подписка.

Цена подписки:

на год — 1350 рублей без услуг связи.

на полугодие — 675 рублей без услуг связи