

7. Loskutova Z.S. Vivarium. – M.: Medicine, 1980. – 93 p.
8. Ryzhavsky B.Ya. Brain development: remote consequences of uncomfortable conditions. – Khabarovsk: Publishing House of the Far Eastern State Medical University. – 2006. – 232 p.
9. Collection of Technical Standards / Ed. by M.P. Mogilny. – M.: De Li print, 2002. – 387 p.
10. Handbook on Dietology / Ed. by A.A. Pokrovsky. M.A. Samsonov. – M.: Medicine. 1981. – 704 p.
11. Feoktistova N.A. The influence of diet with prevalence of soybean products on the cognitive function of female and male laboratory white rats // Far Eastern Medical Journal. – 2007. – № 4. – P. 62-64.
12. Laboratory animals. Classification of age periods of laboratory animals. (Part 1) // Mode of access: <http://handcent.ru/laboratornye-zhivotnye/223-klassifikaciya-vozrastnyh-periodov-laboratornyh-zhivotnyh-chast-1.html>
13. Cheng P.F., Chen J.J., Zhou X.Y., et al. Do soy isoflavones improve cognitive function in postmenopausal women? A meta-analysis // Menopause. – 2014 Jul 7. [Epub ahead of print].
14. Gleason C.E., Carlsson C.M., Barnett J.H., et al. A preliminary study of the safety feasibility and cognitive efficacy of soy isoflavone supplements in older men and women // Age Ageing. – 2009. – Jan; 38 (1). – P. 86-93.
15. Fournier L.R., Ryan Borchers T.A., Robison L.M., et al. The effects of soy milk and isoflavone supplements on cognitive performance in healthy postmenopausal women // J. Nutr Health Aging. – 2007. – Mar-Apr; 11 (2). – P. 155-164.
16. Monteiro S.C., de Mattos C.B., Ben J., Netto C.A., et al. Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. Metab Brain Dis. – 2008. – № 23 (3). – P. 243-253.
17. Katayama S., Imai R., Sugiyama H., et al. Oral administration of soy peptides suppresses cognitive decline by induction of neurotrophic factors in SAMP8 mice J Agric Food Chem. – 2014. – Apr 23. – № 62 (16). – P. 3563-3569.
18. Kritiz-Silverstein D., Von Mühlen D., Barrett-Connor E., et al. Isoflavones and cognitive function in older women: the SOY and Postmenopausal Ytals In Aging (SOFIA) Study // Menopause. – 2003. – May-Jun. – № 10 (3). – P. 196-202.
19. Sarkaki A., Amani R., Badavi M., et al. Pre-treatment effect of different doses of soy isoflavones on spatial learning and memory in an ovariectomized animal model of Alzheimer's disease // Pak J Biol Sci. – 2008. – № 11 (8). – P. 1114-1119.
20. Sarkaki A., Badavi M., Aligholi H., et al. Preventive effects of soy meal (+/- isoflavone) on spatial cognitive deficiency and body weight in an ovariectomized animal model of Parkinson's disease // J Biol Sci. – 2009. – Oct. – № 12 (20). – P. 1338-1345.

Координаты для связи с авторами: Феоктистова Наталья Алексеевна – ассистент кафедры химии АмГМА, тел. +7-914-060-82-52, e-mail: compranula2@gmail.com; Григорьев Николай Романович – д-р мед. наук, профессор кафедры физиологии и патофизиологии АмГМА, тел. +7-914-585-89-82, e-mail: nikagrig@yandex.ru; Бородин Евгений Александрович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой химии АмГМА, тел. +7-962-284-06-40, e-mail: borodin54@mail.ru.



УДК 611.81-027.12:541.515:599.323.4-092.9

Б.Я. Рыжавский¹, О.А. Лебедько^{2,1}, О.В. Лазинская¹, М.С. Кузнецова², О.Е. Гусева²

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ БЛЕОМИЦИНА НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОРЫ, КОНЦЕНТРАЦИЮ РНК В ЦИТОПЛАЗМЕ НЕЙРОНОВ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС (ОТСРОЧЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ)

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

²Хабаровский филиал ДНЦ ФПД – НИИ охраны материнства и детства,
ул. Воронежская, 49, кор. 1, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск

Резюме

Исследована кора головного мозга (ГМ) крыс, которым в течение 3 дней (в возрасте 30-32 суток) ежедневно вводили внутривentricularно блеомицин в дозе 1 мг/кг. Контролем служили интактные животные из тех же пометов. Морфометрическое изучение коры показало, что толщина собственной теменной доли (СТД) и гиппокампа, размеры ядрышек в нейронах слоя V СТД и поля I гиппокампа у подопытных крыс были достоверно большими, чем у контрольных. В цитоплазме нейронов слоя II и V СТД и поля I гиппокампа у подопытных крыс концентрация РНК была выше, чем у контрольных. Изучение окислительного статуса гомогенизированных тканей полушария головного мозга подопытных крыс выявило активацию продукции свободных радикалов: показатели хемилюминесценции на 20-30 % превышали контрольные уровни.

Ключевые слова: мозг, кора, блеомицин, свободные радикалы.

EFFECT OF BLEOMYCIN INTRODUCTION ON MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE CORTEX, RNA CONCENTRATION IN CYTOPLASM OF NEURONS AND FREE RADICALS OXIDATION IN THE BRAIN OF NON-MATURED RATS (REMOTE CONSEQUENCES)

¹Far eastern state medical university;

²Khabarovsk branch of federal state budgetary institution «Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration» Research Institute of Maternity and Childhood, Khabarovsk

Summary

The authors studied the cortex of the brain in rats (age 30-32 days) which received bleomycin intraperitoneally in the dose of 1 mg/kg for three days. The control group included intact animals from the same breed. Morphometric study of the brain showed that the thickness of parietal lobe proper (PLP) and hippocampus, sizes of nucleoli in the neuron layer V PLP and field I of hippocampus in the studied rats were reliably larger than in the control group. In cytoplasm of neuron layer II and V of PLP and field I of hippocampus in experimental rats, concentration of RNA was higher than in the control animals. Study of oxidative status of homogeneous tissues of brain hemispheres of the experimental animals revealed activation of free radical production: chemiluminescence parameters were 20-30 % higher than the control ones.

Key words: brain, cortex, bleomycin, free radicals.

Известно, что развитие головного мозга зависит от большого числа средовых факторов. В частности, установлено, что факторы, приводящие к акселерации, ускоряют темпы развития ГМ [5, 6]. Известно также, что ускорение темпов соматического развития животных может быть следствием приема ряда лекарственных препаратов, в частности, антибиотиков [6, 12], что обусловило их применение для стимуляции темпов роста сельскохозяйственных животных [12]. В то же время, влияние антибиотиков на развитие головного мозга не изучено. Среди антибиотиков имеются препараты, применяющиеся и при лечении опухолей, в том

числе, у детей. К ним относится, в частности, блеомицин – препарат, представляющий смесь гликопептидных антибиотиков, обладающий противоопухолевым действием [7]. Его изучение привлекает внимание и в связи с его побочными эффектами, включающими активацию образования свободных радикалов, токсическое действие на легкие, развитие пневмофиброза [1, 3]. В связи с этим в настоящей работе исследовалось влияние блеомицина на показатели состояния коры ГМ, закономерно меняющиеся в процессе онтогенетического развития органа, а также при изменениях его функционального состояния.

Материалы и методы

Исследование проведено на крысах линии Вистар из 2 пометов (по 10 и 8 крысят), каждый из которых был разделен пополам. Животным опытной группы (n=9) в возрасте 30, 31, 32 суток ежедневно внутрибрюшинно вводился блеомицин, растворенный в физрастворе, в дозе 1 мг/кг. Контрольная группа (n=9) состояла из intactных крыс. Подопытные и контрольные животные содержались в одних клетках, корм и воду получали ad libitum. Эвтаназию крыс обеих групп проводили одновременно при достижении ими возраста 45 суток. Левое полушарие ГМ животных фиксировали в жидкости Карнуа. Парафиновые срезы, толщиной 7 мкм, полученные из СТД, окрашивали галлоцианином. На них при помощи окуляр-микрометра МОВ-15 измеряли толщину коры и ее слоя I, а также, с помощью компьютерной морфометрии, на аппарате «Мекос» – площади сечения ядрышек, ядер и цитоплазмы нейронов слоя II и V СТД и поля I гиппокампа, концентрацию РНК в цитоплазме этих нейронов как описано в [6].

Процессы свободнорадикального окисления исследовали методом хемилюминесценции (ХМЛ). Регистратуру ХМЛ в гомогенатах правого полушария

ГМ крыс осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER» по методикам, описанным ранее [2]. Определяли: S_{sp} – светосумму за 1 минуту спонтанной ХМЛ, величина которой прямо коррелирует с интенсивностью свободнорадикального окисления h – амплитуду быстрой вспышки Fe^{2+} -индуцированного свечения, свидетельствующую о содержании гидроперекисей липидов; S_{ind-1} – светосумму за 4 минуты Fe^{2+} -индуцированного свечения, величина которой зависит от скорости образования перекисных радикалов; H – амплитуду H_2O_2 -индуцированного люминол-зависимого свечения, величина которой обратно коррелирует с перекисной резистентностью субстрата; S_{ind-2} – светосумму за 2 минуты H_2O_2 -индуцированной люминол-зависимой ХМЛ, величина которой обратно коррелирует с активностью антиоксидантной антирадикальной защиты (АОРЗ). Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольтках, рассчитывали на 1 г влажной ткани, взятой во время забоя животных, и выражали в относительных единицах. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica.

Результаты и обсуждение

Изучение гистологических препаратов не выявило в СТД и гиппокампе подопытных крыс признаков атрофии, дистрофических изменений. Таким образом, введение блеомицина не приводило к морфологическим изменениям в коре головного мозга, характерным для последствий, формирующихся в легких под влиянием

введения этого препарата, в частности, пневмофиброза, разрушения паренхиматозных структур [1, 3].

Морфометрический анализ показал, что толщина коры в СТД, являющейся ассоциативной зоной неокортекса [4], у подопытных крысят была больше, чем у intactных животных, толщина молекулярного слоя при

этом не имела межгрупповых различий. Число нейронов в стандартной площади среза слоя II и V также практически не различалось в сравниваемых группах (табл. 1), что может свидетельствовать об отсутствии усиленной гибели нейронов в этих слоях коры у подопытных крыс. Размеры цитоплазмы и ядер нейронов слоя II и V СТД, а также гиппокампа, не различались в коре подопытных и контрольных животных. В то же время, размеры ядрышек в нейронах слоя V и гиппокампа у подопытных крыс были достоверно больше, чем у контрольных, в нейронах слоя II наблюдалась тенденция к их увеличению. Концентрация РНК в цитоплазме нейронов слоя II, V СТД и гиппокампа была в ГМ подопытных крыс больше, чем у контрольных (табл. 1). Таким образом, исследованные ассоциативные и эфферентные нейроны неокортекса и гиппокампа у подопытных крыс имели морфометрические и гистохимические признаки более интенсивного, чем в контроле, синтеза РНК. Эти отличия могут быть отражением ускоренного развития коры или/и повышенной функциональной активности изучавшихся нейронов [4]. Признаком первого можно считать и большую толщину коры СТД в мозге подопытных крысят.

Ранее нами было установлено [3], что при аналогичном режиме введения блеомицина в легких развивались выраженные деструктивные изменения на фоне тяжелого оксидативного стресса (ХМЛ-показатели легочных гомогенатов подопытных крыс превышали контрольные уровни в 2,6-3,4 раза). Считается, что цитотоксический эффект блеомицина обусловлен индукцией образования свободных радикалов, которые вызывают в конечном итоге повреждения ДНК, приводящие к гибели клеток [11].

Таблица 1

Влияние введения блеомицина на морфометрические показатели коры мозга крыс

Показатели	Группа «Блеомицин»	Группа «Контроль»
Толщина коры, мкм	1332±20*	1245±22
Толщина слоя I, мкм	158±8	141±8
Число нейронов в поле зрения		
Слой II	17,3±1,2	17,9±0,8
Слой V	7,8±0,2	8,1±0,2
Площадь сечения в нейронах (мкм²)		
Ядрышки, слой II	4,3±0,15	4±0,11
Ядра, слой II	43±1,8	43±1,9
Цитоплазма, слой II	52±2,2	49±1,5
Ядрышки, слой V	6,6±0,3*	5,4±0,36
Ядра, слой V	67±2,2	67±2,5
Цитоплазма, слой V	97±3,5	91±4,7
Ядрышки, гиппокамп	5,1±0,17*	4,5±0,19
Ядра, гиппокамп	54±2,4	54±2,1
Цитоплазма, гиппокамп	62±2,6	58±1,1
Концентрация РНК в цитоплазме нейронов, усл. ед.		
Слой II	0,38±0,013*	0,29±0,026
Слой V	0,37±0,013*	0,30±0,021
Гиппокамп	0,37±0,009*	0,32±0,02

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль».

ХМЛ-анализ (табл. 2) продемонстрировал, что воздействие блеомицина умеренно интенсифицировало процессы свободнорадикального окисления, о чем

свидетельствовало достоверное увеличение показателей S_{sp} , h и S_{ind-1} на 20 %, 26 % и 33 %, соответственно. Накопление продуктов свободнорадикального окисления сопровождалось ослаблением антиоксидантной и антирадикальной защиты и снижением перекисной резистентности: величина S_{ind-2} и амплитуда H возросли на 23 % и 25 %, соответственно.

Таблица 2

ХМЛ-показатели (в отн. ед.) свободнорадикального статуса гомогенатов полушария головного мозга 45-суточных белых крыс

	Группа «Блеомицин»	Группа «Контроль»
S_{sp}	0,103±0,005*	0,082±0,004
h	0,87±0,04*	0,64±0,03
S_{ind-1}	1,14±0,08*	0,76±0,03
H	2,07±0,10*	1,60±0,07
S_{ind-2}	3,85±0,15*	2,90±0,09

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе «Контроль».

Вследствие того, что расщепляющий блеомицин фермент – блеомицин-гидролаза отсутствует в легких, именно они подвергаются более интенсивному и длительному воздействию избытка свободных радикалов, что и обуславливает пневмотоксичность этого антибиотика [9]. Зарегистрированное в наших исследованиях отсутствие патоморфологических изменений на фоне умеренной активации продукции свободных радикалов в ГМ крыс, подвергнутых воздействию блеомицина, вероятно, обусловлено высоким содержанием в нейронах инактивирующего фермента – блеомицин-гидролазы [10]. Кроме того, следует учитывать, блеомицин подавляет синтез нуклеиновых кислот (преимущественно ДНК) и белка, действуя на клетки, находящиеся как в митотическом цикле, так и вне его, и проявляя большую активность в фазе G_2 [7]. В связи с этим можно предполагать, что деструктивные изменения в коре мозга подопытных крыс не развивались и вследствие того, что зрелые нейроны коры являются неделяющимися клетками, и поэтому малочувствительными к повреждающему действию блеомицина.

Более высокие уровни генерации свободных радикалов в ГМ, сопровождающиеся морфометрическими и гистохимическими изменениями, свидетельствующими об ускоренном развитии коры, повышении функциональной активности нейронов, по-видимому, можно оценивать с позиции перехода редокс-регуляции в режимы функционирования, необходимые для успешного прохождения очередного этапа нейроонтогенеза. Это следует, в частности, из данных, свидетельствующих о том, что повышение продукции свободных радикалов вызывает активацию экспрессии редокс-сенситивных генов апоптоза – процесса, необходимого для элиминации структур, эффективных на предыдущем этапе нейроонтогенеза, но утративших свое значение на новом этапе развития [8].

Оценивая полученные данные, мы полагаем, что изучение влияния антибиотиков, обладающих противоопухолевым действием, на ГМ, заслуживает дальнейших исследований, в частности, учитывающих зависимость эффектов от дозы и схемы назначения препарата, а также от срока, прошедшего после его отмены.

Литература

1. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Демидова О.В. Влияние антиоксиданта эхинохрома А на блеомицин-индуцированный пневмофиброз // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – № 9. – С. 329-332.
2. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Задворная О.В. Свободнорадикальный статус неокортекса белых крыс и его модификация экзогенными производными тестостерона // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 95-99.
3. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Ткач О.В. и др. Влияние перорального введения Эхинохрома А на структурно-метаболические нарушения, индуцированные блеомицином в легких крыс, на раннем этапе постнатального онтогенеза // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 3. – С. 92-96.
4. Мотавкин П.А. Введение в нейробиологию. – Владивосток: Медицина ДВ, 2003. – 252 с.
5. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. – Хабаровск: Изд-во ДВГМУ, 2009. – 277 с.
6. Рыжавский Б.Я. Головной мозг при экспериментальной акселерации (морфологические аспекты). Хабаровск: Изд-во ДВГМУ, 2015. – 277 с.
7. Энциклопедия лекарств. – М.: ООО «РЛС-2005», 2004. – 1440 с.
8. Chato W., Abdouh M., Bernier G. p53 pro-oxidant activity in the central nervous system: implication in aging and neurodegenerative diseases // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – Vol. 15, № 6. – P. 1729-1737.
9. Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions // Pharmacol. Res. – 2015. – Vol. 97. – P. 122-130.
10. Kamata Y., Itoh Y., Kajiya A., et al. Quantification of neutral cysteine protease bleomycin hydrolase and its localization in rat tissues // J. Biochem. – 2007. – Vol. 141, № 1. – P. 69-76.
11. Savu D., Petcu I., Temelie M., et al. Compartmental stress responses correlate with cell survival in bystander effects induced by the DNA damage agent, bleomycin // Mutat. Res. – 2015. – Vol. 771. – P. 13-20.
12. <http://biologylib.ru/books/item/f00/s00/z0000000/st047.shtml>.

Literature

1. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Demidova O.V. The influence of antioxidant echinochrome A on the bleomycin-induced pneumofibrosis // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – № 9. – P. 329-332.
2. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Zadvornaya O.V. Free radical status neocortex of albino rats and its modification by exogenous testosterone derivatives // Far Eastern Medical Journal. – 2011. – № 4. – P. 95-99.
3. Lebedko O.A., Ryzhavsky B.Ya., Tkach O.V., et al. The influence of oral intake of echinochrome A on the structural and metabolic bleomycin-induced impairments in the lungs of the rats in the early stage of postnatal ontogeny // Far Eastern Medical Journal. – 2016. – № 3. – P. 92-96.
4. Motavkin P.A. Introduction to neurobiology. – Vladivostok: Medicine FE, 2003. – 252 p.
5. Ryzhavsky B.Ya. Brain development: remote consequences of unfavorable conditions. – Khabarovsk: Publishing House of the FESMU, 2009. – 277 p.
6. Ryzhavsky B.Ya. Brain during experimental acceleration (morphological aspects). – Khabarovsk, 2015. – 114 p.
7. Encyclopedia of drugs. – M.: LLC «RLS-2005», 2004. – 1440 p.
8. Chato W., Abdouh M., Bernier G. p53 pro-oxidant activity in the central nervous system: implication in aging and neurodegenerative diseases // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – Vol. 15, № 6. – P. 1729-1737.
9. Della Latta V., Cecchetti A., Del Ry S., Morales M.A. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions // Pharmacol. Res. – 2015. – Vol. 97. – P. 122-130.
10. Kamata Y., Itoh Y., Kajiya A., et al. Quantification of neutral cysteine protease bleomycin hydrolase and its localization in rat tissues // J. Biochem. – 2007. – Vol. 141, № 1. – P. 69-76.
11. Savu D., Petcu I., Temelie M., et al. Compartmental stress responses correlate with cell survival in bystander effects induced by the DNA damage agent, bleomycin // Mutat. Res. – 2015. – Vol. 771. – P. 13-20.
12. <http://biologylib.ru/books/item/f00/s00/z0000000/st047.shtml>.

Координаты для связи с авторами: Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биологии и гистологии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-76-13-96; Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, директор Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИОМиД; Лазинская Ольга Владимировна – преподаватель кафедры биологии и гистологии ДВГМУ; Кузнецова Мария Станиславовна – аспирант Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИОМиД; Гусева Ольга Евгеньевна – канд. мед. наук, главный врач, старший научный сотрудник Хабаровского филиала ДНЦ ФПД – НИИОМиД.

