

ЕКСПРЕСІЯ БІЛКА НЕЙРОФІЛАМЕНТІВ У СЕНСОМОТОРНІЙ КОРИ ЩУРІВ ПРИ МІКРОЕМБОЛІЗАЦІЇ КРОВОНОСНИХ СУДИН: ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯЦІЇ

Надійшла 25.03.15

Досліджували зміни експресії білка нейрофіламентів (NFP) в сенсомоторній корі щурів після мікроемболізації судин однієї з півкуль за допомогою унілатеральної ін'єкції суспензії адипоцитів у загальну сонну артерію. Експресію NFP оцінювали за результатами імуногістохімічного виявлення з використанням моноклональних мишачих антитіл до людського протеїну нейрофіламентів (клон 2F11, «Dako», Данія). У контрольних щурів NFP виявлявся переважно в межах тонких терміналей нервових волокон, але не в перикаріонах нейронів. Після мікроемболізації судин лівої півкулі головного мозку спостерігалось загальне зменшення інтенсивності експресії NFP при наявності мозаїки осередків практичної відсутності та посилення такої експресії. Спорадично в пізні терміни після мікроемболізації у небагатьох нейронах відмічалася наявність мічених NFP-структур у перикаріонах, аксонних горбиках і аксонах. Зміни експресії NFP мали розповсюджений характер і виявлялись у ділянках кори протилежної півкулі. Використання курсового введення імуномодулятора імунофану в цілому призводило до зменшення інтенсивності патологічних змін експресії NFP. Це свідчить про можливість залучення імунних процесів у патогенез спостережуваних змін. У відновлювальний період після мікроемболізації в корі відмічалися значна кількість NFP-позитивних тілець, котрі можна кваліфікувати як колби (конуси) росту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ішемія мозку, неокортекс, нейрофіламенти (NF), протеїн NF (NFP), імуномодуляція.

ВСТУП

Проблеми лікування цереброваскулярних патологій, особливо тих, що призводять до гострих порушень мозкового постачання, є одними з центральних у сучасній медицині. Незважаючи на тривалу історію досліджень у даній області, значна частина відповідних питань досі залишаються нерозв'язаними [1]. Гіпоксія, що є фактично неминучим наслідком ішемізації церебральних тканин будь-якого генезу, призводить до дифузних, часто-густо драматичних ушкоджень структурних елементів мозку – нейронів, клітин глії та міжклітинних контактів [2]. Такі зміни звичайно пов'язані з пошкодженням цитоскелета нейронів [3].

Нейрофіламенти (NF) відносяться до проміжних філаментів і складають основні елементи цитоскелета нейронів; зокрема, вони забезпечують підтримку функціональної структури аксонів. Протеїн NF (NFP) є триплетним протеїном, що складається з трьох субодиниць – легкої, проміжної та важкої (NF-L, NF-M та NF-H відповідно). NFP демонструє певні ознаки просторової спеціалізації; в периферичних частинах нервової клітини він збагачений NF-H, а в центральних – NF-L [4]. NF, побудовані з NFP, забезпечують транспорт певних матеріалів до сом нейронів, де синтезуються білки і ліпіди (зокрема, нейроспецифічні), використовувані в інших компартментах цих клітин, а також транспорт синтезованих продуктів у зворотному (соматофугальному) напрямку [5, 6]. Зміни експресії NFP у структурах головного мозку, пов'язані з дією транзитної ішемії та гіпоксії, поки що вивчені недостатньо. Ми провели відповідне дослідження, використовуючи методику створення таких умов у корі великих півкуль щурів за допомогою введення в русло сонної артерії суспензії адипоцитів. Це

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ (Україна).

²Національний інститут раку, Київ (Україна).

Ел. пошта: Lilya-yaremenko@rambler.ru (Л. М. Яременко);
agrabovoy@yandex.ru (О. М. Грабовий).

призводить до мікроемболізації дрібних кортикальних судин однієї з церебральних півкуль та розвитку транзиторної ішемії. Протягом 24 год жирові емболи в мікросудинах піддаються лізису, і кровопостачання півкулі поновлюється (в усякому разі частково). Результатом описаного вище порушення кровообігу в півкулі є розвиток дифузних нейродегенераційних змін, у тому числі в корі цієї півкулі; приблизно в 20 % експериментальних тварин у тканинах півкулі виникають осередки інфарктів. Протягом відновного періоду (30–90 діб) на місці значних зон індукованої ішемією деструкції утворюються гліальні рубці або кісти [7].

Експресію NFP виявляли із застосуванням імуногістохімічної методики, використовуючи моноклональні мишачі антитіла до людського протеїну NF.

Щодо гемато-енцефалічного бар'єра (ГЕБ) мозок є забар'єрним органом. Порушення даного бар'єра додає імунну агресію до кола патогенетичних факторів судинних уражень при розладах кровообігу в мозку [8–10]. Тому виглядало доцільним тестувати вплив імуномодулятора на наслідки мікроемболізації церебральних судин. Як такий імуномодулятор міг бути використаний імунофан. Це синтетичне похідне тимопоетину, гексопептид (аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргінін), який проявляє імунорегулюючі та детоксикаційні властивості та пригнічує вільнорадикальні процеси пероксидного окиснення ліпідів [11]. Антиоксидантна дія імунофану запобігає пошкодженню лімфоцитів та гранулоцитів, викликаному дією патогенних факторів середовища [12].

МЕТОДИКА

Експерименти були проведені на 80 самцях статево-зрілих білих щурів лінії Вістар (маса тіла 260–290 г). Тварин утримували в стандартних умовах віварію на стандартному раціоні, по чотири тварини в клітці, з вільним доступом до їжі та води та світловим режимом 12/12 год. Протягом семи днів перед початком експерименту тварини проходили адаптацію до умов лабораторії та контактів з персоналом. У досліджах були використані щури-самці, оскільки рівень естрогенів у самиць помітно впливає на перебіг ішемічного ушкодження головного мозку [13].

Тварини були рандомізовано поділені на три групи: групу контролю (К, $n = 10$), групу ME ($n = 35$), щури якої були піддані мікроемболізації

кровоносних судин лівої півкулі головного мозку [14], та групу ME+Im ($n = 35$), тваринам якої також проводили мікроемболізацію церебральних судин та яким вводили імунофан. Даний препарат (НВП «Біонокс», РФ) вводили підшкірно протягом першого–10-го, 21–23-го, 30–32-го та 50–51-го днів після процедури мікроемболізації. Щурам контрольної групи вводили фізіологічний розчин за аналогічною схемою. Всі оперативні втручання виконували під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Евтаназію тварин здійснювали за допомогою тіопенталу в овердозі (200 мг/кг).

Для мікроемболізації кровоносних судин лівої півкулі головного мозку використовували введення в ліву загальну сонну артерію 0.2 мл суспензії ізольованих адипоцитів. Така суспензія готувалася за допомогою додавання 20 мл пасти відмитих ізольованих адипоцитів до розчину, який включав у себе 2.8 мл 10 %-вого розчину CaCl_2 , 10 г Twin'у з доведенням до об'єму 80 мл ізотонічним (0.9 %) розчином NaCl. Ін'єкція проводилася після накладання на артерію лігатури.

Зразки головного мозку для досліджень вилучали через один, три, 10, 30 та 90 діб після початку досліду (процедури мікроемболізації в другій та третій групах). Після евтаназії череп щура швидко розтинали, ізолювали мозок, який розділяли на три частини фронтальними перерізами. Середня частина вмішувалась у 10 %-вий забуферений холодний формалін (pH 7.4, 4 °C) на 24 год. Зразки ущільнювали за стандартною методикою, заливали в парафін, і виготовляли фронтальні зрізи 4 мкм завтовшки, які забарвлювали азур II-еозином.

Імуногістохімічну реакцію для виявлення NFP проводили відповідно до протоколу виробника. Зрізи мозку депарафінували ксилолом та регідратували. Демаскування антигенів здійснювали в цитратному буфері (pH 6.0) при 98 °C протягом 20 хв, після чого зрізи промивали буфером. Далі на них наносили 3 %-вий розчин перексиду водню на 5 хв для пригнічення активності ендогенної пероксидази. Після триразового промивання у фосфатному буфері протягом 5 хв зрізи інкубували 30 хв у термостаті при 22 °C з первинними антитілами до NFP (Monoclonal Mouse Anti-Human Neurofilament Protein, Clone 2F11, «Дак», Данія). Продукти імуногістохімічної реакції візуалізували за допомогою детекції EnVision FLEX («Дак», Данія). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Gill. Як позитивний контроль використовували зрізи мозку щурів із гарантовано визначеною позитивною ре-

активністю щодо NFP, а для отримання негативно-го контролю проводили згадані вище процедури, але без застосування первинних антитіл. Отримані гістологічні препарати вивчали та фотографували під світловим мікроскопом Nikon Eclipse 80i, укомплектованим цифровою камерою DS-5SMc/L2 («Nikon», Японія).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У щурів контрольної групи в сенсомоторній корі великих півкуль мозку, яка демонструвала звичайну будову, виявлялася значна кількість мічених використаним препаратом антитіл тонких нервових волокон у складі нейропіля. В сомах нейронів, їх дендритах, аксонних горбиках і товстих аксонах експресії NFP майже не спостерігалось (рис. 1). Позитивно забарвлені волокна з експресією NFP розташовувались у нейропілі хаотично. На поверхні сом та товстих дендритів часто виявлялося щільне сплетення мічених волоконних терміналей. У цих локусах у багатьох випадках можна було спостерігати дрібні округлі тільця з інтенсивною експресією NFP. Діаметр таких тілець дещо перевищував товщину NFP-позитивних тонких нервових волокон. Інколи подібні тільця розташовувались у безпосередній близькості до сом нейронів. У препаратах зрідка виявлялися поодинокі мічені нервові волокна, вертикально орієнтовані щодо поверхні кори. Діаметр таких елементів помітно перевищував діаметр тонких мічених волокон нейропіля. Отже, патерн виявлення NFP-позитивних нервових

волокон у наших експериментах змушує припустити, що використаний клон антитіл до даного протеїну зв'язувався переважно з філаментами в тонких термінальних розгалуженнях кортикальних волоконних елементів (рис. 1).

Використана методика мікроемболізації судин церебральної півкулі призводила до певних дегенераційних та деструкційних змін у корі враженої (лівої) півкулі, що супроводжувалося помітними змінами експресії NFP. Через одну добу після процедури мікроемболізації на тлі незначного загального зменшення щільності NFP-позитивних елементів спостерігались осередки різних розмірів із виразним зменшенням інтенсивності експресії цього білка, аж до повного його зникнення. Через три доби також можна було виявити помірне зменшення кількості мічених волокон (рис. 2). Можна було відмітити нерівномірну інтенсивність мічення вздовж таких елементів. Вони відрізнялися нерівними контурами та (інколи) наявністю варикозитетів. Іноді серед мічених елементів спостерігались невеличкі тільця неправильної або видовженої форми, котрі можна було кваліфікувати як фрагменти дегенеруючих нервових терміналей. На 10-ту добу після процедури мікроемболізації розподіл мічених NFP-позитивних елементів у корі ушкодженої півкулі характеризувався мозаїчністю. В межах сірої речовини зрізів при цьому виявлялися відносно численні ділянки з гіперекспресією NFP (проте ступінь такого посилення експресії був помірним). Крім того, в препаратах спостерігались численні

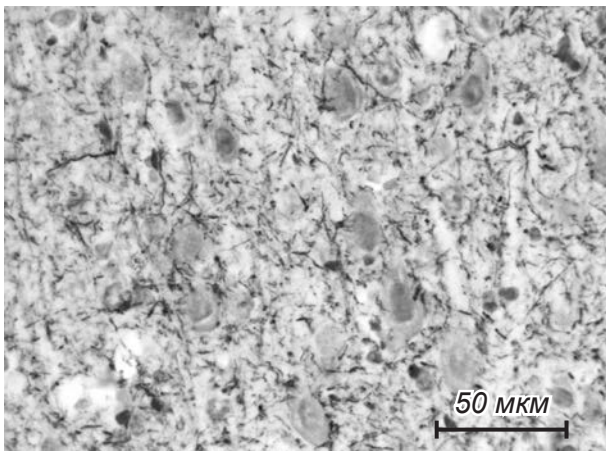


Рис. 1. Експресія білка нейрофіламентів (NFP) у сенсомоторній корі лівої півкулі головного мозку інтактного щура.

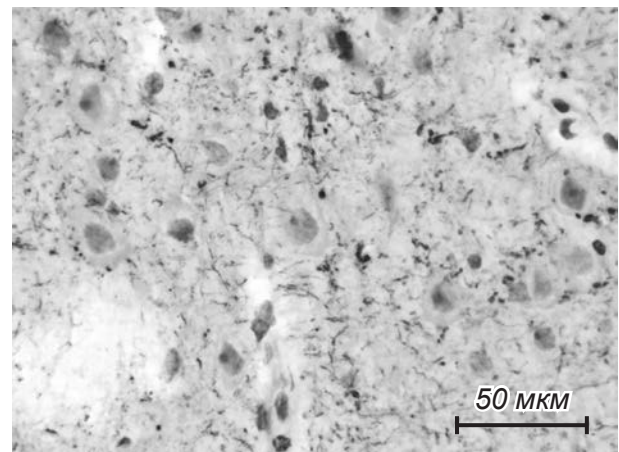


Рис. 2. Зміни в сенсомоторній корі лівої півкулі головного мозку щура через три доби після мікроемболізації судин. Загальне зниження та осередкове зникнення експресії NFP, нерівномірність мічення терміналей по їх довжині, наявність мічених глибок неправильної форми.

округлі утворення розміром 1–5 мкм з високою інтенсивністю експресії NFP. Іноді такі тільця розташовувалися на кінцях нервових волокон. У деяких пірамідних нейронах п'ятого шару мережа мічених NF відмічалась у межах соми (звичайно біля аксонного горбика).

Через 30 або 90 діб після процедури мікроемболізації мозаїчний патерн експресії NFP у корі ушкодженої півкулі залишався вираженим, але мічення виявляло тенденцію до зменшення (рис. 3). Спостерігалися вогнища як гіпо-, так і гіперекспресії NFP. Кількість округлих структур із високою експресією NFP прогресивно зменшувалася; на 90-ту добу вони виявлялися рідко. Слід зазначити, що зміни інтенсивності експресії NFP не обмежувалися виключно корою лівої півкулі. Згадані вище зміни розподілу NFP-позитивних елементів відмічались і в корі протилежної півкулі, хоча й у значно меншій кількості.

Курсові ін'єкції імунофану щурам, підданим мікроемболізації, якісно не змінювали морфологічної картини розподілу NFP-позитивних елементів у сірій речовині кори враженої півкулі. Осередки гіпо- та гіперекспресії відповідного протеїну відмічались в корі як ураженої, так і «інтактної» (правої) півкулі. Але при цьому в цілому виявлялося помітно менше позитивних волокон та нейроцитів із наявністю мережі мічених філаментів. Мічення NFP-позитивних волокон у тварин даної групи було рівномірнішим, ніж у другій групі. Кількість NFP-високопозитивних

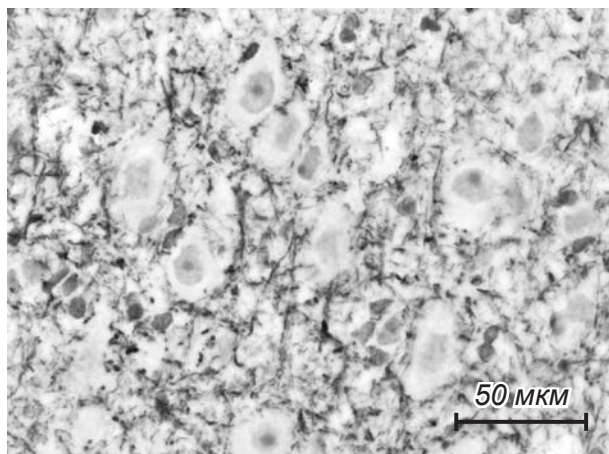


Рис. 3. Експресія білка нейрофіламентів (NFP) у сенсомоторній корі лівої півкулі головного мозку щура через 30 діб після мікроемболізації судин.

Практичне відновлення вихідного рівня мічення, наявність на кінцях деяких терміналей округлих утворень з високим вмістом NFP (колб росту).

тілець, розташованих як біля сом нейронів, так і в межах нейропіля, була значно меншою, а самі вони виглядали дрібнішими та слабше забарвленими (рис. 4).

У віддалений період після індукції мікроемболізації (30–90-та доби) у щурів третьої групи (ME+Im) спостерігалися більша кількість NFP-позитивних елементів на боці ушкодження порівняно з такою у тварин другої групи (ME). Крім того, в окремих ділянках кори головного мозку виявлялися помітна кількість вертикально орієнтованих NFP-позитивних нервових волокон. У поодиноких нейронах NFP-позитивність відмічалась у межах перикаріону, в проксимальних ділянках дендритів, а також в аксонних горбиках і аксонах (рис. 5). Приблизно у 20 % щурів групи ME+Im у корі спостерігалися гліальні рубці зі значною кількістю NFP-позитивних елементів (рис. 6).

ОБГОВОРЕННЯ

Таким чином, отримані в наших експериментах дані щодо імуногістохімічного виявлення NFP у корі великих півкуль щурів можна підсумувати наступним чином. Слід взяти до уваги, що в нашій роботі ми обмежились лише якісним описом патерну локалізації NFP-позитивних елементів на основі візуальних оцінок. Дати кількісний опис таких патернів у контрольній та експериментальних групах можна буде в наступних роботах, хоча це, вірогідно, зустрінеться з істотними труднощами у зв'язку

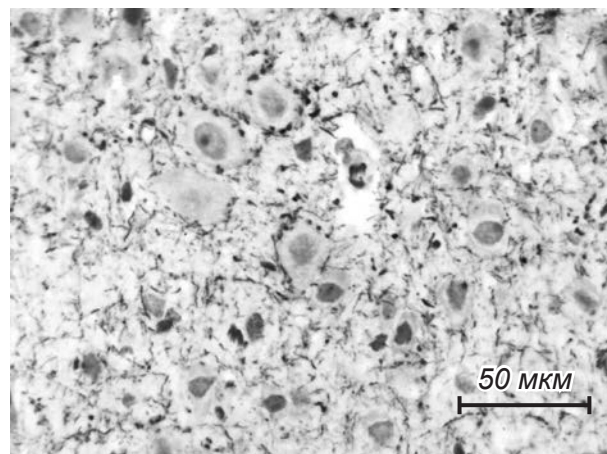
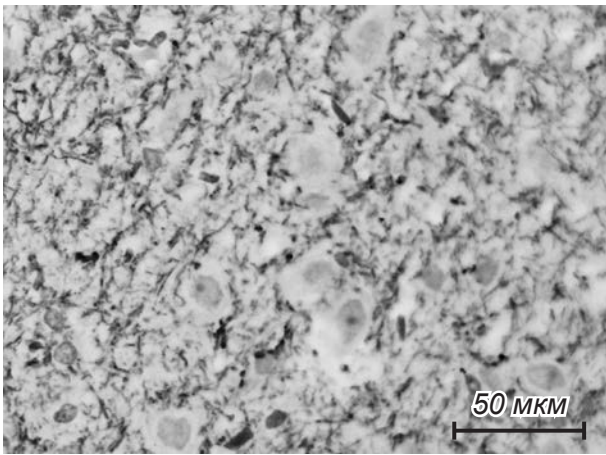
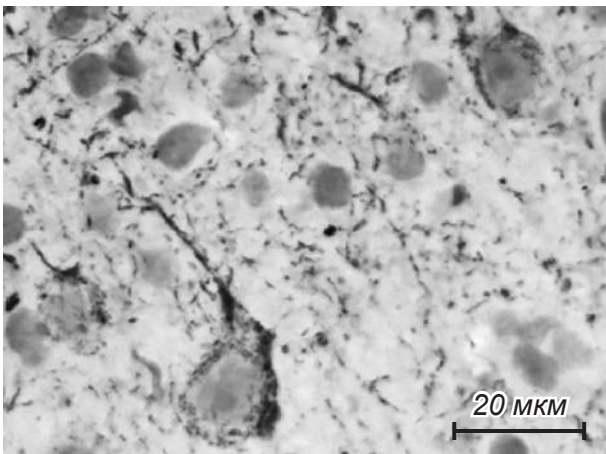


Рис. 4. Менший рівень патологічних змін мічення білка нейрофіламентів (NFP) у сенсомоторній корі лівої півкулі щура через три доби після мікроемболізації судин в умовах імунофлуоресценції імунофаном.



Р и с. 5. Відносне посилення експресії білка нейрофіламентів (NFP) у сенсомоторній корі лівої півкулі щура через 30 діб після мікроемболізації судин в умовах імуномодуляції. Наявність округлих утворень з високим вмістом NFP (колби росту) на значній кількості терміналей.



Р и с. 6. Поодинокі нейрони з наявністю білка нейрофіламентів (NFP) у перикаріонах, аксонних горбиках та аксонах. Відновлювальний період (90 діб) після мікроемболізації судин в умовах імуномодуляції.

зі згаданим вище мозаїчним характером розподілу змін експресії NFP.

У корі великих півкуль мозку контрольних щурів гістохімічно виявлена експресія NFP (клон 2F11) була досить інтенсивно вираженою. Проте вона спостерігалася переважно в тонких терміналях нервових волокон, іноді в межах магістральних відростків кортикальних нейронів. У той же час наявність NFP-позитивних елементів у перикаріонах таких нейронів була мінімальною.

Розвиток транзиторної ішемії призводив протя-

гом початкового періоду після емболізації дрібних судин кори до певного зниження інтенсивності експресії NFP. У той же час спостерігався такий феномен, як мозаїчний розподіл зон із дещо посиленою і практично пригніченою експресією цього протеїну. Відновлювальний період після порушення мозкового кровопостачання характеризувався появою округлих тілець із високою експресією NFP; подібні структури, ймовірно, можуть бути кваліфіковані як колби (конуси) росту нервових волокон. Це дозволяє говорити про те, що ішемія кори в результаті емболізації дрібних судин супроводжується масованим ушкодженням термінальних ділянок нервових волокон, у подальшому регенеруючих. Отже, подібна картина може розглядатись як морфологічний прояв компенсаторної реакції [6].

Застосування імунофану в цілому робить помірнішим зниження рівня експресії NFP у початковий період після емболізації та зменшує прояви дегенераційних і деструктивних змін у терміналях кортикальних нервових волокон. Такий ефект може бути пов'язаний із антиоксидантними та детоксикаційними властивостями використаного препарату [12]. У віддалений відновлювально-компенсаторний період після ішемічної атаки дія імунофану зумовлює інтенсивнішу експресію NFP порівняно з такою у тварин групи 2 (ME). Крім того, в цих умовах у корі мозку спостерігаються поодинокі нейрони, в яких NFP виявляється в перикаріонах, аксонах та аксонних горбиках, а інколи і в дендритах. Вогнища гліозу в корі у тварин, яким ін'єкували імунофан, зустрічаються рідше та є менш щільними, а в гліальних рубцях у цих випадках виявляється більше NFP-позитивних елементів. Подібні особливості виявлення вказаних елементів у тварин третьої групи (ME+Im) свідчать на користь того, що емболізація судин кори головного мозку супроводжується вираженою імунною реакцією, а використання імуномодулятора (імунофану) дещо обмежує таку реакцію.

При розгляді результатів нашої роботи виникає логічне питання, наскільки розподіл NFP-позитивних елементів, виявлений за допомогою використаної гістоімунохімічної методики, відповідає реальному розподілу структурних елементів, котрі складаються з даного білка. Не виключено, що концентрація NFP-позитивних структур у межах сом, дендритів та крупних аксонів кортикальних нейронів дійсно значно нижча, ніж у дрібних термінальних розгалуженнях кортикальних волокон. Тому ці елементи в таких волокнах зв'язуються з

використаними антитілами значно інтенсивніше, а кількість NFP у соматичних та аксонних структурах може в багатьох випадках виявитися нижчою щодо чутливості застосованої методики. Не можна також виключити ймовірності наступної ситуації: використаний клон антитіл до NFP інтенсивніше зв'язується з легкими субодиницями даного протеїну (NFP-L), а останніми відносно збагачені саме тонкі термінальні розгалуження кортикальних нервових волокон.

Експерименти на тваринах проводились у відповідності з положеннями Хельсінкської Декларації 1975 р., переглянутої та доповненої в 2000 р., та директивами національних комітетів з етики наукових досліджень. Проведення експериментів було погоджено з Комісією з питань етики Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця. Робота здійснювалася за сучасними правилами утримання та використання лабораторних тварин, що відповідають принципам Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментів та інших цілей (Страсбург, 1985).

У авторів статті – Л. М. Яременко та О. М. Грабового – відсутні будь-які конфлікти щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. А. І. Зозуля, Г. О. Слабкий, І. С. Зозуля, “Проблеми, які стоять перед дослідниками щодо цереброваскулярних хвороб в цілому та інсульту зокрема”, *Укр. мед. часопис*, **103**, № 5, 112-120 (2014).
2. З. А. Суслина, М. А. Пирадов, *Инсульт: диагностика, лечение, профилактика*, МЕДпресс-информ, Москва (2008).
3. В. В. Семенченко, С. С. Степанов, Н. Н. Боголепов, *Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты)*, Директ-Медиа, Москва (2014).
4. S. Takeda, M. Inui, S. Tamaki, et al., “Electron ion correlation in liquid magnesium,” *J. Phys. Soc. Jap.*, **63**, No. 5, 1794-1802 (1994).
5. C. Perrone Capano, R. Pernas-Alonso, and U. di Porzio, “Neurofilament homeostasis and motoneuron degeneration,” *BioEssay*, **23**, No. 1, 24-33 (2001).
6. E. Schroeder, S. Vogelgesang, A. Popa-Wagner, and C. Kessler, “Neurofilament expression in the rat brain after cerebral infarction: effect of age,” *J. Neurobiol. Aging*, **24**, No. 1, 135-145 (2003).
7. О. М. Грабовий, Л. М. Яременко, “Стан кори півкуль головного мозку при моделюванні порушень кровообігу та при корекції супутніх змін імунної системи у щурів”, *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*, № 4, 28-33 (2009).
8. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
9. Л. М. Яременко, О. М. Грабовий, “Стан титрів аутоантитіл до тканинних антигенів головного мозку та циркулюючих імунних комплексів при моделюванні порушень кровопостачання головного мозку різного ступеню важкості та його корекція”, *Імунологія та алергологія*, № 2/3, 55-59 (2009).
10. Á. Chamorro, A. Meisel, A. M. Planas, et al., “The immunology of acute stroke,” *Nat. Rev. Neurol.*, **8**, 401-410 (2012).
11. В. В. Лебедев, С. А. Новиков, “Гидрофильный гексапептид иммунофан – гиперактивный регулятор транспортных белков множественной лекарственной устойчивости”, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **142**, № 12, 649-651 (2006).
12. А. В. Караулов, “Молекулярно-биологическое обоснование применения иммунофана в клинической практике”, *Лечащий врач*, № 4, 46-47 (2000).
13. P. D. Hurn and I. M. Macrae, “Estrogen as a neuroprotectant in stroke,” *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **20**, No. 4, 631-652 (2000).
14. Пат. 34604 Україна. МПК G09B 23/00, *Спосіб моделювання ішемічного ураження мозку*, О. М. Грабовий, Л. М. Яременко, Н. Г. Панішина, опубл. 11.08.08, Бюл. № 15.