УДК 616.831–005.001.57:616.31:577.322

© Колектив авторів, 2013

ЕКСПРЕСІЯ СИНАПТОФІЗУ В ГАНГЛІОНАРНОМУ ШАРІ СЕНСОМОТОРНОЇ КОРИ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПОРУШЕННЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО КРОВООБІГУ ЗА УМОВ ІМУНОКОРЕКЦІЇ У ЩУРІВ

Л. М. Яременко, О. М. Грабовий*, В. Б. Раскалей, Л. П. Запривода

Кафедра гістології та ембріології (зав. – д. мед. н., проф. Чайковський Ю, Б.), Національній медичний університет імені О. О. Богомольця 01069 Україна, м. Київ, бул. Шевченко, 13. E-mail: lilya-yaremenko@rambler.ru

**Відділ патологічної анатомії (зав. – д. мед. н., проф. Грабовий А. Н.), Національний інститут раку, , 03022 Україна, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43.*

SYNAPTOPHYSIN EXPRESSION IN GANGLIONIC LAYER OF THE SENSORIMOTOR CORTEX AFTER CEREBRAL CIRCULATORY DISORDER SIMULATION OF RATS

L. M. Yaremenko, A. N. Grabovoy, V. B. Raskalei, L. P. Zaprivoda

SUMMARY

The experimental results showed that transient ischemic brain lesions Imunofan decreases the decreased expression of synaptophysin in the ganglionic layer of the cerebral cortex. Imunofan exhibits neuroprotective properties in the early stages (1 and 3 days) after the onset of ischemia, reducing the morphological and functional manifestations neyrodegenativnih processes, and long-term periods – enhances compensatory and remedial mechanisms.

ЭКСПРЕССИЯ СИНАПТОФИЗНА В ГАНГЛИОНАРНОМЙ СЛОЕ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ИММУННОКОРЕКЦИИ У КРЫС

Л. М. Яременко, А. Н. Грабовой, Д. В. Раскалей, Л. П. Запривода

РЕЗЮМЕ

Проведенные экспериментальные исследования показали, что при транзиторных ишемических поражениях мозга имунофан уменьшает степень снижения экспрессии синаптофизину в ганглионарный слое коре больших полушарий мозга. Имунофан проявляет нейропротекторные свойства в ранние сроки (1 и 3 суток) после возникновения ишемии уменьшая морфо-функциональные проявления нейродегенативних процессов, а в отдаленные сроки – усиливает компенсаторные и восстановительные механизмы.

Ключові слова: головний мозок, порушення кровообігу, синаптофізин, імунофан.

Пошкодження головного мозку в результаті ішемії тої чи іншої форми та ступеня завжди супроводжується вторинними або віддаленими структурними, функціональними та молекулярними змінами, які тривають від місяців до декількох років [5]. Оскільки мозок є забар'єрним органом, то порушення гематоенцефалічного бар'єру додає фактор імунної агресії до патогенезу його судинних уражень при розладах кровообігу в ньому [2,10]. З цих позицій привертає до себе синтетичне похідне тимопоетину імунофан (аргінил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргінин), який проявляє імуннорегулюючі та детоксикаційні властивості, блокує вільнорадикальні процеси перекісного окислення ліпідів [3].

Одним із маркерів, який відображує функціональні процеси у нервовій системі є білок синаптофізин (Син) [8, 11], що є інтегративним компонентом мембран синаптичних пухирців [12, 3]. Визначення експресії Син в тканині головного мозку дозволяє оцінити ступінь диференціювання та функціональну активність нейронів [13].

Мета дослідження – виявити вплив імуномодулятора імунофана на експресію синаптофізину в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку при порушенні кровопостачання у щурі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на 115 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар вагою 260–290 г. Тварини, використані в досліді, були поділені на 4 груп: 1 група – контроль (К), тварини, які не зазнавали ніяких дій (n=10); 2 група (ПО) – псевдо оперовані. Щурам виконувався доступ до лівої загальної сонної артерії й її мобілізація, після чого рана зашивалася (n=35); 3 група (МЕА) – з мікроемболізацією кровоносних судин лівої півкулі головного мозку, (n=35) [7]; 4 група (МЕА+і) – тварини з МЕА, які отримували по 0,5 мкг імунофану (НВП «Бионокс», Росія) на 1–10, 21–23, 30–32, 50–51 дні експерименту (n=35). Щурам груп ПО підшкірно вводили фізіологічний розчин за аналогічною схемою. Всі оперативні втручання виконувалися під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Головний мозок для досліджень забиралися через 1, 3, 10, 30 і 90 діб після початку досліду після введення тваринам тіопенталу натрію (200 мг/кг). На протязі до 1 хв проводився розтин черепа щурів,

виймався мозок, якій фронтально розрізався на три частини і середня занурювалася у 10% забуферений формалін pH 7,4 охолоджений до 40°С. Фіксація тривала 24 години при 40°С. Матеріал ущільнювали в парафін і виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 4 мкм які забарвлювалися азур II-еозином

Імуногістохімічну (ІГХ) реакцію для виявлення Син проводили у відповідності з протоколом виробника. Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм депарафінувалися ксилолом та регідратувалися. Демаскування антигенів здійснювалося у цитратному буфері pH 6.0 при 98°С протягом 20 хвилин, після чого зрізи промивалися буфером. Далі на зрізи наносився 3% розчин перекиу водню на 5 хвилин для пригнічення активності ендогенної пероксидази. Після 3-х кратного промивання у фосфатному буфері протягом 5 хвилин зрізи інкубували 30 хвилин в термостаті при 22°С з первинним антитілом проти Син (Synaptophysin Ab-2, Mouse Monoclonal Antibody, Clone: SYP02. Thermo Scientific, USA) у розведенні 1:50. Для візуалізації продуктів ІГХ реакції використовувалася система детекції EnVisionTM FLEX, (Dako, Denmark). Зрізи докрашувалися гематоксиліном Gill. У якості позитивного контрою використані зразки мозку щурів з визначеною позитивною реактивністю, а для негативного контролю проводили процедуру без застосування первинних антитіл.

Отримані гістологічні препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 (Nikon, Japan) за стандартизованих умов. Для аналізу отриманих зображень [7, 11] (збільшення мікроскопа х400, 1280×960 пікселів RGB) їх, за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46, піддавали трансформації у 8-бітні та вимірювали оптичну щільність симетричних ділянок гангліонарного шару кори великих півкуль (лівої та правої). Отримані цифрові дані оброблялися стандартними статистичними методами. Значимість відмінності експресії Син між контролем та дослідними групами, а також між враженою півкулею мозку та контралатеральною визначалася за критерієм Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені спостереження показали, що кора півкуль мозку щурів контрольної групи має звичайну будову. ІГХ дослідження виявило високу експресію Син в нейропілі, де можна було іноді простежити окремі аксони. У цитоплазмі нейронів зрідка виявлялися поодинокі гранули хромогену і вона виглядала світлим обідком навколо ядра. Навколо деяких нейронів, безпосередньо біля плазмолеми виявлялася тонка смужка високої експресії Син, що мало вигляд своєрідної капсули. Це може свідчити про варіабельність у щільності утворення синапсів з тілом гангліонарних клітин. Денсіометрична оцінка експресії Син між правою і лівою півкулями мозку не виявило достовірної відмінності, що дозволило об'єднати ці показники (табл.).

У щурів ПО через 1 добу після операції в корі лівої півкулі спостерігалося незначне розширення частини кровоносних мікросудин, перш за все капілярного типу, переповнення їх кров'ю. Інколи відмічався незначний периваскулярний набряк навколо судин венозного типу. Ці зміни гемомікроциркуляторного русла продовжували спостерігатися й через 3 доби після операції а через 10 діб – практично вже не виявлялися. На цьому фоні спостерігалася певна тенденція до загального зниження експресії Син як у лівій, так і в правій півкулях, але яка не носила статистично достовірного характеру (табл.). Крім того виявлялося виразне зменшення експресії Син у вигляді ореолу навколо переваскулярних набряків.

За умов МЕА через 1 добу досліду в лівій півкулі кровоносні мікросудин виявлялася розширеними, деякі різко, переповнені кров'ю, з виразним периваскулярним набряком. Іноді в них можна було спостерігати емболи з жирових крапель. Переваскулярний набряк зберігався через 3 і 10, та навіть через 30 діб після відтворення МЕА навколо деяких венозних судин. Вже через 1 добу після початку досліду при у лівій півкулі виявлялися різні за розмірами осередки дегннеративно-деструктивних змін. В їх складі нейропіль ставав дрібно комірчастим, а нейрони зазнавали дегенеративних змін. Через 3 доби у таких ділянках нейропіль ставав крупно комірчастим. У більших з них нейрони зазнавали некрозу, у дрібних – характеризувалися різним ступенем дегенеративних змін. До 10 доби після МЕА у складі лівої півкулі на місці великих осередків інфарктів починають утворюватися порожнини, які через 30 діб перетворювалися у псевдокісти, а на місці менших некрозів формувалися гліальні рубці. У ділянках гангліонарного шару кори лівої півкулі за межами інфарктів спостерігалися виразні реактивні зміни численних нейроцитів, частина з яких виявляла ознаки некрозу. Кількість змінених нейронів збільшувалася з 1 до 3 доби після МЕА, після чого зменшувалося. У цілому, на протязі досліду в лівій півкулі при мікроемболії відбувалося поступове зменшення питомої кількості нейронів гангліонарного шару і зростала кількість гліоцитів.

ІГХ дослідження за умов МЕА показало, що через 1 добу досліду в лівій півкулі спостерігалося суттєве зниження експресії Син, особливо в осередках інфарктів (табл.). За межами останніх часто визначалися невеличкі осередки розміром біля 100 мкм де експресія Син була різко знижена. Такі осередки виявлялися й через 3 та, дещо меншої виразності, через 10 діб досліду. З 30 доби після емболії відбувалося зростання рівня експресії Син в ураженій півкулі, але який не сягав рівня притаманного контролю чи контлатералної півкулі (табл.). З 10 доби досліду у гліальних рубцях вже починали виявлятися

Таблиця

Експресія синаптофізу в гангліонарному шарі сенсомоторної кори великих півкуль головного мозку при моделюванні порушення церебрального кровообігу та імуннокорекції в щурів (питома оптична щільність, умовні одиниці/мкм2, M±δ)

Контроль	П	63,4±12,7				
	Л	66,3±9,6				
	М: П+Л	64,85±11,15				
Строк спостережень (доби)		1	3	10	30	90
ПО	П	67,1±13,1	61,1±9,2	60,3±9,2	61,6±12,1	67,5±14,7
	Л	65,2±12,4	60±9,6	59,3±13,9	64,4±14,8	64,1±11,2
МЕА	П	59,8±10,1	58,5±9,3	62,1±14,5	63,7±13,2	67,8±12,7
	Л	54,1±7,5*	48,1±6,8*	51,3±7,0*	55,9±8,2*	59,9±8,3*
МЕА ОД	Л	44,2±6,1*	22,2±7,5*	15,1±3,4*	12,7±5,2*	19,8±4,3*
МЕА+і	П	60,6±8,1	60,1±8,3	62,8±10,1	61,5±9,2	65,1±9,7
	Л	56,1±9,5	52,1±10,1**	56,7±11,1**	59,7±11,2**	62,9±12,4**

Контроль, ПО (псевдо оперовані), МЕА (мікроемболія адипоцитами), МЕА+і (мікроемболія адипоцитами, дія імунофану) – дослідні групи щурів; МЕА ОД – осередки деструкції при МЕА; П – права півкуля, Л – ліва півкуля, МП+Л – середнє значення для правої і лівої півкуль; * – достовірна відмінність від контролю; ** – достовірна відмінність між однойменними сторонами при МЕА і МЕА+і.

поодинокі тяжі марковані хромогеном, кількість яких у подальшому поступово зростала. Схожа картина спостерігалася й у стінках псевдокіст. Крім того, через 30 і 90 днів після емболії поблизу гліальних рубців та псевдокист можна було спостерігати невеличкі ділянки, де експресія Син ставала вищою, ніж у контролі.

Застосування при МЕА імунофану якісно не змінило морфологічної картини змін у півкулях мозку. У лівій півкулі також виявлялися виразні судинні зміни та осередки деструкції. Але за цих умов вже з 1 доби після емболії виявлялося менше змінених нейроцитів у порівнянні з МЕА. Крім того в динаміці експерименту відбувалося менш виразне зменшення питомої кількості нейроцитів у гангліонарному шарі, а кількість гліоцитів, навпаки збільшувалася менш виразно. Все це призвело до того що через 90 діб після МЕА+і гангліонарний шар кори зазнавав меншої зміни клітинного складу.

ІГХ дослідження за умов МЕА+і показало, що через 1 добу досліду в лівій півкулі за межами осередків деструкції виявляється дещо вищий рівень експресії Син, ніж при МЕА, хоча ці відмінності не є статистично достовірними (табл.). При дії імунофану дещо рідше, чим при МЕА, виявляються дрібні осередки локального зниження експресії Син, що відзначалося також і на подальших строках спостереження. Починаючі з 3 доби після емболії за умов дії імунофану відмічалося достовірне зростання у порівнянні з МЕА експресії синаптофізину в гангліонарному шарі кори лівої півкулі (табл.), а на при кінці досліду він сягав рівня, що достовірно не відрізнявся від контролю.

Як і при МЕА, при дії імунофану, з 10 доби досліду в гліальних рубцях та у стінках псевдокіст, що формуються, починали виявлятися, причому у дещо більшій кількості, нервові волокна марковані хромогеном. Також, поблизу гліальних рубців та псевдокист за умов дії імунофану через 30 і 90 днів визначалися осередки гіперекспресії Син, які були помітно виразнішим у порівнянні з такими при МЕА.

Таким чином, проведені спостереження показали, що імунофан наряду зі зменшенням виразності імунних змін [10] та ушкодження нейроцитів [1] у корі великих півкуль мозку при порушеннях кровообігу, зменшує ступінь зниження експресії Син. Виявлені ефекти імунофану на 1–3 доби після моделювання судинних уражень може бути пояснений його антиоксидантними властивостями, що реалізується шляхом стимуляції продукції церулоплазміну та активності каталази [3,6]. Подальше прискорення відновлення експресії Син у гангліонарному шарі кори великих півкуль можна пов’язувати як з певною нейропротекорною дією імунофану, так і зі зменшенням проявів імунних порушень (аутоагресії) [9], що супроводжують судинні ураження мозку. Це можна розцінювати як те, що імунофан сприяє реалізації компенсаторних та відновлювальних процесів в ураженій півкулі та зменшує прояви трансформації альтеративних змін, обумовлених гострою ішемічною атакою, у повільно прогресуючий нейродегенеративний процес, який веде до кількісної зміни клітинного складу кори мозку (збіднінння нейронами та збагачення гліоцитами). Останнє є морфологічним субстратом, що забезпечує зменшення ознак неврологічного дефіциту [11].

ВИСНОВКИ

Імунофан, застосований при транзиторних ішемічних ураженнях мозку, зменшує ступінь зниження експресії синаптофізину в гангліонарному шарі корі великих півкуль мозку.

Імунофан виявляє нейропротекторні властивості, у ранні строки (1 і 3 доби) після виникнення ішемії зменшуючи морфо-функціональні прояви нейродегенативних процесів, а у віддалені строки – посилює компенсаторні та відновлювальні механізми.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку полягають у поглибленні уявлень про роль імунної системи у розвитку морфофункціональних змін у мозку при порушеннях кровообігу, а також можливість застосування імуномодуляторів для зменшення їхньої виразності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Грабовий О. М. Яременко Л. М. Стан кори півкуль головного мозку при моделюванні порушень кровообігу та при корекції супутніх змін імунної системи у щурів//Науковий вісник. К.: 2009. – № 4 (26). – С. 48–54.

2. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – 327 с.

3. Караулов А. В. Молекулярно-биологическое обоснование применения имунофана в клинической практике//Лечащий врач. – 2000. – № 4. – С. 46–47.

4. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В., и др. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток//Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010.– Том V, № 3. – С. 57–63.

5. Крыжановский Г. Н., Магаева с. В., Макаров С. В. Сепашвили Р. И. Нейроиммунология. Руководство. – М.: Изд-во НИИ общей патологии и патофизиологии, 2003.-438 с.

6. Лебедев В. В., Шелепова Т. М., Степанов О. Г. Имунофан – регуляторный пептид в терапии инфекционных и неинфекционных болезней (Под ред. В. И. Покровского). М., 1998.- 119 с.

7. Пат. 34604 Україна. МПК G09B 23/00. Спосіб моделювання ішемічного ураження мозку/Грабовий О. М., Яременко Л. М, Панішина Н. Г.; заявник й патентовласник Національний медичний університет імені О. О. Богомольця. – № u200805453; опубл. 11.08.2008 Бюл. № 15

8. Хренов А. И., Беличенко П. В. Количественный анализ синаптофизина (р38) в мозге потомства второго поколения от самцов крыс с длительной морфинной интоксикацией.//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. № 1 (129). – С. 50–52.

9. Яременко Л. М., Грабовий О. М. Стан популяції лімфоцитів при моделюванні порушень кровообігу у лівій півкулі головного мозку у щурів та його корекція//Імунологія та алергологія (Київ). – 2009. – № 1. – С. 40–44.

10. Яременко Л. М., Грабовий О. М., Бордонос В. Г. 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 (київ). – 2009. – № 2–3. – С. 55–59.

11. Han Gil Seo, Dae-Yul Kim, Hee Won Park et a1. Early Motor Balance and Coordination Training Increased Synaptophysin in Subcortical Regions of the Ischemic Rat Brain//J Korean Med Sci.- 2010.- V. 25.- P. 1638–1645.

12. Leube, RE, Leimer, U., Grund, C. et al. (1994) Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells. J. Cell Biol. – 1994. № 127. – P. 1589–1601.

13. Portela-Gomes, Stridsberg, M., Johansson, U., Grimelius, J. (1999) Colocalisation of synaptophysin with different neuroendocrine hormones Histochem. Cell Biol 111 (1): 49–54.