

УДК: 616.831-005.4-039.31:[612.017.1:57.04]:612.08

Л.М. Яременко**ЕКСПРЕСІЯ GFAP В СЕНСОМОТОРНІЙ КОРИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ТРАНЗИТОРНОЇ ІШЕМІЇ ЗА УМОВ ІМУНОМОДУЛЯЦІЇ***Національний медичний університет імені О.О. Богомольця***Яременко Л.М.** Експресія GFAP в сенсомоторній корі головного мозку при моделюванні транзиторної ішемії за умов імуномодуляції // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 4. – С. 57-60.

Проведені експериментальні дослідження показали, що альтерація, обумовлена транзиторним порушенням кровообігу в лівій півкулі головного мозку, в гострий період супроводжується різким зменшенням експресії GFAP в осередках дегенеративно-деструктивних змін та реактивним її зростанням за їхніми межами. Відновлювальний період після ішемії характеризується не тільки різким зростання кількості GFAP-позитивних клітин у гліальних рубцях та стінках псевдокіст, а й дифузним збільшенням їхньої кількості. Застосування імуномодулятора імунофана при ішемічних ураженнях мозку зменшує ступінь виразності змін експресії GFAP у корі великих півкуль мозку. Це можна розглядати як морфо-функціональний показник, що свідчить про зниження подразнюючої дії ішемічної альтерації на астроглію та меншим ступенем її активації. Останнє може виступати принципово важливим фактором, що обумовлює зменшення виразності вторинних дегенеративних змін у корі головного мозку після порушень кровообігу.

Ключові слова: ішемія мозку, GFAP, астроцити, імуномодуляція.**Яременко Л.М.** Экспрессия GFAP в сенсомоторной коре головного мозга при моделировании транзиторной ишемии в условиях иммуномодуляции // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 4. – С. 57-60.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что альтерация, обусловленная преходящим нарушением кровообращения в левом полушарии головного мозга, в острый период сопровождается резким уменьшением экспрессии GFAP в очагах дегенеративно-деструктивных изменений и реактивным ее ростом за их пределами. Восстановительный период после ишемии характеризуется не только резким ростом количества GFAP-позитивных клеток в глиальных рубцах и стенках псевдокист, но и диффузным увеличением их количества. Применение иммуномодулятора имунофана при ишемических поражениях мозга уменьшает степень выраженности изменений экспрессии GFAP в коре больших полушарий мозга. Это можно рассматривать как морфо-функциональный показатель, свидетельствующий о снижении раздражающего действия ишемической альтерации на астроглию и меньшей степенью ее активации. Последнее может выступать принципиально важным фактором, обуславливающим уменьшение выраженности вторичных дегенеративных изменений в коре головного мозга после нарушений кровообращения.

Ключевые слова: ишемия мозга, GFAP, астроциты, иммуномодуляция.**Yaremenko L.M.** GFAP expression in the rats' sensorimotor cortex after transitory ischemia and immunomodulation // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 4. – С. 57-60.

Experimental observations have shown that the alteration caused by ischemia in the left hemisphere of the brain, in the acute phase is accompanied by a sharp decrease in the expression of GFAP in the foci of degenerative and destructive changes and reactive its growth beyond. The recovery period after ischemia is characterized not only by a sharp increase in the number of GFAP-positive cells in the glial scar and walls pseudocysts, but also diffuse increase in their number. Immunofan use of immunomodulators in ischemic brain lesions reduces the severity of changes in expression of GFAP in the cerebral cortex of the brain. This can be seen as the morpho-functional indicator shows a decline irritating ischemic alterations on astroglia and a lesser degree of its activation. The latter can serve principled but an important factor contributing to a decrease in the severity of secondary degenerative changes in the cerebral cortex after circulatory disorders.

Key words: cerebral ischemia, GFAP, astrocytes, immunomodulation.

Вступ. Ішемічні ушкодження мозку характеризуються комплексом деструктивно-дегенеративних, реактивних та відновлювальних процесів [5, 6]. Вони завжди супроводжується вторинними або віддаленими структурними, функціональними та молекулярними змінами, які тривають від місяців до декількох років [3].

В цих процесах принципово важлива роль належить клітинам глії у тому числі астроцитам. Останнім належить низка важливих функцій підтримки гомеостазу та функціонування мозку. Вони забезпечують бар'єрну та трофічну функцію, непрямым шляхом впливають на синаптичну передачу та ін. [9, 10, 12, 16]. У зрілих астроцитах ЦНС експресується гліальний фібрилярний кислий протеїн (GFAP). Він, будучи одним із головних імуноцитохімічних маркерів астроцитарної глії, є членом сімейства білків цитоскелету і представляє собою основний проміжний філамент у зрілих клітинах цього

типу. GFAP - це високо специфічний білок мозку, який не виявляється за межами ЦНС [13, 14, 15]. В якості маркера астроцитів GFAP широко застосовується в діагностичних цілях та в експериментальних роботах при дослідженні функцій нервової системи в нормі та при патології [7, 15, 17].

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 [1, 8, 11]. З цих позицій привертає до себе синтетичне похідне тимопоетину імунофан (*аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргінін*), який проявляє імуннорегулюючі та детоксикаційні властивості, блокує вільнорадикальні процеси перекисного окислення ліпідів [2].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами: робота є фрагментом науково-дослідної роботи Національного медичного

університету імені О.О.Богомольця “Органи нервової, імунної та сечостатевої систем в умовах експериментального пошкодження”, № держреєстрації 0112U001413.

Мета дослідження – виявити вплив імунomodлятора імунофану на зміни експресії GFAP в сенсомоторній корі головного мозку в щурів при моделюванні транзитornoї ішемії.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 80 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 (МЕА) – з мікроемболізацією кровоносних судин лівої півкулі головного мозку, (n=35) [4]; 3 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). Всі оперативні втручання виконувалися під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Головний мозок для досліджень забирався 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, який фронтально розрізався на три частини і середня поміщалася у 10 % забуферений формалін (рН 7,4, 4°C) на 24 години. Матеріал ущільнювався в парафін і виготовлялі гістологічні зрізи товщиною 4 мкм які забарвлювалися азур II-еозином.

Імуногістохімічну (ІГХ) реакцію для виявлення GFAP проводили у відповідності з протоколом виробника. Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм депарафінували ксилолом та регідратували. Демаскування антигенів здійснювалося у цитратному буфері рН 6.0 при 98°C протягом 20 хвилин, після чого зрізи промивали буфером. Далі на зрізи наносився 3% розчин перекису 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°C з первинним поліклональним кроличим антитілами проти GFAP (Dako, Denmark). Для візуалізації продуктів ІГХ реакції використовувалася система детекції EnVision™ FLEX, (Dako, Denmark). Зрізи докрашувалися гематоксиліном Gill. У якості позитивного контролю 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 (збільшення мікроскопа x200, 1280x960 пікселів RGB). На отриманих зображеннях проводили підрахунок кількості GFAP-позитивних клітин гангліонарного шару кори великих півкуль (лівої та правої) на площі 430x320 мкм. Отримані цифрові дані оброблялися стандартними статистичними методами.

Результати та обговорення. Проведені спостереження показали, що у щурів контрольної групи у сенсомоторній корі півкуль мозку, яка має звичайну будову, імуногістохімічно виявлялися GFAP-позитивні клітини з невеликими ядрами та тонкими відростками. Останні помірно галузяться й у нейропілі утворювали негусту сітку.

За умов відтворення МЕА через 1 добу у корі лівої півкулі частина судин виявлялася різко розширеною з виразним периваскулярним набряком, ознаками стазу. Іноді можна було спостерігати емболи, що складалися з жирових крапель. Периваскулярний набряк зберігався через 3 і 10 діб, і навіть через 30 діб після відтворення емболії навколо деяких венозних судин. Вже через 1 добу після початку досліду при МЕА у лівій півкулі виявлялися різні за розмірами осередки дегенеративно-деструктивних змін. В їх складі нейропілі ставав дрібнокомірчастим, а нейрони зазнавали дегенеративних змін. Через 3 доби у таких ділянках нейропілі ставав крупно комірчастим. У більших з них нейрони зазнавали некрозу, у дрібних – характеризувалися різним ступенем дегенеративних змін. До 10 доби після емболії у складі лівої півкулі на місці відносно великих осередків інфарктів починають утворюватися порожнини, які через 30 діб формували псевдокісти, а на місці менших некрозів – гліальні рубці, які виявлялися також через 90 діб досліду. У ділянках гангліонарного шару кори лівої півкулі мозку за межами інфарктів спостерігалися виразні масові реактивні зміни нейроцитів, частина з яких виявляла ознаки некротичних змін. Кількість змінених клітин збільшувалася з 1 до 3 доби після емболії, після чого зменшувалося. У цілому, на протязі досліду у лівій півкулі при МЕА відбувалося поступове зменшення питомої кількості нейронів гангліонарного шару і зростала кількість гліоцитів.

ІГХ-дослідження показало, що в лівій півкулі мозку після МЕА спостерігався мозаїцизм у експресії GFAP. На 1 і 3, а у меншій ступені на 10 добу досліду, в корі виявлялися множинні невеличкі ділянки (50-100 мкм), а також зрідка більших розмірів – інфаркти, в яких різко знизилася, аж до повного зникнення, експресія GFAP. За їх межами через 1 і 3 днів після МЕА спостерігалася суттєве зростання експресії GFAP, що зумовлено як збільшенням виявлених клітин так і кількості їхніх відростків. При цьому GFAP-позитивні клітини мали більші, ніж у контролі, розміри тіл та товстіші відростки. Через 10 діб після початку експерименту з боку ураження спостерігалася суттєве зростання GFAP-позитивних клітин навколо осередків інфарктів, тоді як у інших ділянках визначалося суттєве зменшення експресії GFAP у порівнянні з попередніми строками спостереження. У подальшому, на 30 і 90 добу досліду, відбувалося зростання експресії GFAP, яка наприкінці досліду ставала суттєво вищою, ніж у контролі. У поодиноких гліальних рубцях, які сформувалися на місці невеликих осередків інфарктів, а також у стінках псевдокист, які утворилися на місці великих інфарктів, виявлялася значна кількість, як правило,

гіпертрофованих GFAP-позитивних астроцитів.

У контралатеральній півкулі (правій) спостерігалася незначне зростання експресії GFAP через 1 і 3 доби після МЕА, після чого зменшувалася і візуально практично не відрізнялася від того, що виявлялося у контролі.

Застосування імунофану при МЕА якісно не змінило морфологічної картини ішемічного ураження, й у складі лівої півкулі також виявлялися виразні зміни судин та осередки деструкції. Але, за цих умов визначалося менше змінених нейронів. Крім того, у динаміці експерименту відбувалося менш виразне зменшення питомої кількості нейронів, а кількість гліоцитів, навпаки збільшувалася в меншій ступені. Все це призвело до того, що через 90 діб після початку експерименту, кора великої півкулі мозку зазнавала меншої зміни клітинного складу.

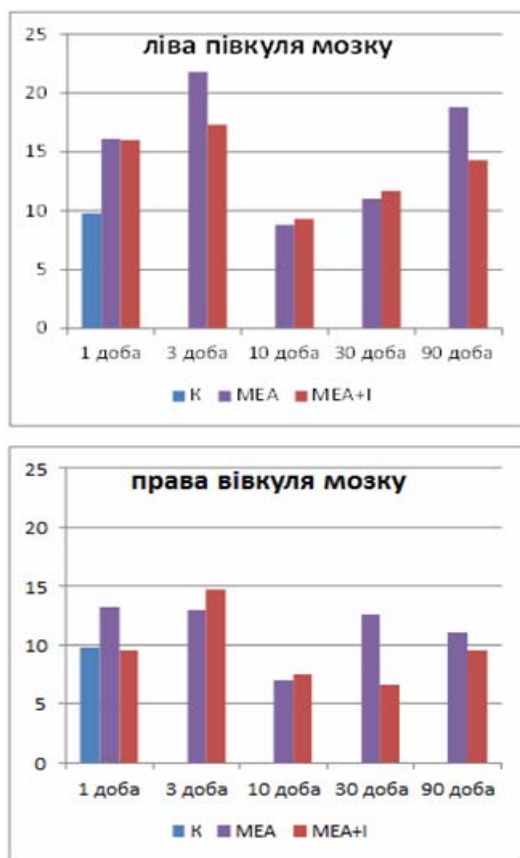


Рис. Динаміка змін кількості астроцитів в сенсомоторній корі мозку (на площі 430x320 мкм) при порушенні кровообігу в басейні лівої загальної сонної артерії та застосуванні імуномодулятора. К - контроль, МЕА - мікроемболія адипоцитами кровоносних судин у басейні лівої сонної артерії, МЕА+І - мікроемболія адипоцитами кровоносних судин у басейні лівої сонної артерії за умов застосування імуномодулятора.

З умов дії імунофіну спостерігалася зменшення виразності змін експресії GFAP у гострий період ішемії. Це проявлялося, перш за все, меншою кількістю мікроосередків, у яких відбувалося різке зниження присутності GFAP. Разом з тим, в інших ділянках астроцити, що виявлялися, виглядали менш набряклими, утворювали густішу сітку відростків, які більш чітко конту-

рирувалися та краще простежувалися на протязі. Зростання експресії GFAP у відновлювальний період відбувалося менш виразно, що було пов'язане як з меншою кількістю експресії GFAP - позитивних астроцитів, так й з меншими розмірами їхніх тіл та значно тоншими відростками. Гліальні рубці та капсули псевдокіст за цих умов також мали децю меншу питому кількість експресії GFAP-позитивних клітин.

Кількісна оцінка кількості клітин (Рис.) при порушенні кровообігу у лівій півкулі головного мозку показала, що при МЕА в ураженій півкулі (за межами осередків інфарктів) спостерігалася значне збільшення числа GFAP-позитивних астроцитів через 1 і 3 доби після порушення кровообігу. Після чого, на початок відновлювального періоду - через 10 днів досліду, відмічалася зменшення кількості цих клітин, з послідовним поступовим їх зростанням. Це призводить до того, що через 90 діб експерименту їхня кількість майже у двічі перевищувала ту, що визначалася у контролі ($p < 0,01$). У контралатеральній півкулі спостерігаються незначні зміни кількості GFAP+-астроцитів.

Імунофан, не змінюючи направленість змін кількості GFAP-позитивних астроцитів у корі мозку після моделювання ішемії, значно зменшував їхню виразність (Рис.). Через 90 діб за цих умов вміст виявлених астроцитів виявляється меншим на понад 20%, у порівнянні з МЕА ($p < 0,05$).

Таким чином, проведені спостереження показали, що при ішемії мозку разом з дегенеративними та деструктивними змінами у гострий період відбуваються зменшення експресії GFAP. Разом з тим, у ділянках сенсомоторної кори, що не зазнали критичних пошкоджень, спостерігається зростання його експресії. Це проявляється збільшенням питомої кількості GFAP-позитивних астроцитів, збільшенням їх розмірів їхніх тіл, товщини та кількості їх відростків, що виявляються. Враховуючи, що подібні зміни спостерігаються і в контралатеральній півкулі, хоча і в значно меншій ступені виразності, вони можуть бути розцінені як реактивне підвищення активності астроцитів. Від зворотного, можна припускати, що не всі клітини астроцитарного ряду кори великих півкуль головного мозку за звичайних умов є GFAP-позитивними.

Перехід до відновлювально-компенсаторних процесів після ішемічного ушкодження (10 доба досліду) супроводжується зниженням експресії GFAP та кількості астроцитів, що візуалізуються з його допомогою, до показників менших ніж у контролі. У подальшому відбувається поступове наростання кількості GFAP-позитивних клітин у сенсомоторній корі, кількість яких через 90 діб після моделювання транзиторної ішемії стає майже вдвічі більшим, ніж у контролі. Останнє може бути тим фактором, який суттєво вплине на функцію уражених регіонів мозку [6, 9, 15, 16]. Що стосується осередків інфарктів, то у складі гліальних рубців та у стінках псевдокіст, які утворилися на їх місці, очікувано виявляється велика кількість GFAP-позитивних гіпертрофованих астроцитів.

Імунофан не змінюючи принципово характеру змін експресії GFAP у корі мозку, що виникають після відтворення транзиторної ішемії, суттєво змінює їхню виразність. Можна припускати, що менша реакція астроцитів на ішемічне ураження в гострий період, пов'язана з антиоксидантними ефектами імунофану [2]. У подальшому, зменшення під впливом імунофану виразності гіперплазії GFAP-позитивної астроцитарної глії після порушення кровопостачання, можна пов'язати як з меншою виразністю альтеративних змін у гострому періоді ішемії мозку, так і зі зменшенням імунної відповіді на його ураження [8, 11].

Висновки: Альтерація, обумовлена транзиторними порушеннями кровообігу в лівій півкулі головного мозку, в гострий період супроводжується різким зменшенням експресії GFAP в осередках дегенеративно-деструктивних змін та реактивним її зростанням за їхніми межами. Відновлювальний період після ішемічного ушкодження характеризується не тільки різким зростання кількості GFAP-позитивних клітин у гліальних рубцях та стінках псевдокіст, а й дифузним збільшенням їхньої кількості.

Застосування імунофану при ішемічних ураженнях мозку зменшує ступінь виразності змін експресії GFAP у корі великих півкуль мозку. Це можна розглядати як морфофункціональний показник, що свідчить про зниження подразнюючої дії ішемічної альтерації на астроглію та меншим ступенем її активації. Останнє може виступати принципово важливим фактором, що обумовлює зменшення виразності вторинних дегенеративних змін у корі головного мозку після порушень кровообігу.

Перспективи подальших досліджень. Отримані данні щодо експресії GFAP в сенсомоторній корі головного мозку при моделюванні транзиторної ішемії за умов імуномодуляції поглиблюють уявлення про морфофункціональні зміни у мозку при порушеннях кровообігу та є підґрунтям для розробки нових способів лікування цереброваскулярних уражень.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга. / Гусев Е.И., Скворцова В.И. — М.: Медицина, 2001.— 327 с.
2. Караулов А.В. Молекулярно-биологическое обоснование применения имунофана в клинической практике / Караулов А.В. // Лечащий врач.— 2000.— № 4.— С. 46-47.
3. Крыжановский Г.Н. Нейроиммунология. Руководство. / Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. Сепашвили Р.И. // М.: Изд-во НИИ общей патологии и патофизиологии, 2003.— 438 с.
4. Пат. 34604 Україна. МПК G09B 23/00. Спосіб моделювання ішемічного ураження мозку / Грабовий О.М., Яременко А.М., Панішпина Н.Г.; заявник й патентовласник Національний медичний університет імені О. О. Богомольця. - № u200805453; опубл. 11.08.2008. Бюл. №15.
5. Скворцова В.И. Ишемический инсульт / Скворцова В.И., Евзельман М.А. // Орел, 2006.— 404с.
6. Суслина З.А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / Суслина З.А., Пирадов М.А. // М.: «МЕДпресс-информ», 2008.— 288с.
7. Иммуногистохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме. / Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Коржевская В.Ф. // Судебно-медицинская экспертиза.— 2010.— № 1.— С. 14-16.
8. Яременко А.М. Стан титрів аутоантитіла до тканинних антигенів головного мозку та циркулюючих імунних комплексів при моделюванні порушень кровопостачання головного мозку різного ступеню важкості та його корекція / Яременко А.М., Грабовий О.М. // Імунологія та алергологія.— 2009.— № 2-3.— С. 55-59.
9. Bacigaluppi M. New targets of neuroprotection in ischemic stroke. / Bacigaluppi M., Hermann D.M. // Scientific World Journal.— 2008.— V. 13, № 8.— P. 698-712.
10. Becher B. Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia / Becher B., Antel J.P. // Glia.— 1996.— Vol. 18.— P. 1-10.
11. Chamorro Á. The immunology of acute stroke / Chamorro Á., Meisel A., Planas A.M. // Nature Reviews Neurology.— 2012.— V. 8.— P. 401-410.
12. Dvorak F. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischemic stroke / Dvorak F., Haberer I., Sitzer M., Foerch C. // Cerebrovasc. Dis.— 2009.— N 27.— P. 37-41.
13. Eng L.F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty one years (1969—2000) / Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. // Neurochem. Res.— 2000.— N 25.— P. 1439—1451.
14. Foerch C. Utility of serum GFAP in monitoring acute MCA territorial infarction / Foerch C., Singer O., Neumann-Haefelin T. [et al.] // Cerebrovasc. Dis.— 2003.— N 16.— P. 45.
15. Foerch C. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP) for the differentiation between intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke / Foerch C., Steinmentz H., Sitzer M. // International Stroke Conference, 8—11 February 2012, New Orleans, USA. Abstract 82.
16. Liu Z. Reactive astrocytes promote axonal remodeling and neurological recovery after stroke / Liu Z., Xin H., Chopp M. // Perspective.— 2014.— V. 9, Issue 21.— P. 1874-1875.
17. Young A.R. Neuroprotection and stroke: time for a compromise. / Young A.R., Ali C., Duretete A., Vivien D. // J Neurochem.— 2007.— V. 103.— P. 1302-1309.

Надійшла 16.04.2014 р.

Рецензент: проф. А.Д.Савенко