

ЕКСПРЕСІЯ СУДИННОГО ЕНДОТЕЛІАЛЬНОГО РОСТОВОГО ФАКТОРА В КОРИ МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ПОРУШЕННЯХ КРОВОПОСТАЧАННЯ ТА ІМУНОКОРЕКЦІЇ ЇХ НАСЛІДКІВ

Надійшла 04.06.15

У щурів при гострих порушеннях кровообігу в одній півкулі головного мозку, викликаних перев'язкою сонної артерії або мікроемболізацією судин кори після внутрішньоартеріального введення суспензії адипоцитів, у корі цієї півкулі тимчасово знижується експресія судинного ендотеліального ростового фактора (VEGF), що можна розглядати як один із чинників патогенезу порушень відновлювальних процесів після ішемізації кори. Послаблення експресії даного фактора зумовлює пролонгацію дегенеративних явищ у віддалені терміни після перенесеної ішемії. Застосування імуномодулятора імунофану вірогідно зменшувало інтенсивність зниження експресії VEGF після транзиторної ішемії мозку, що зумовлювало сприятливіший перебіг постішемічного процесу, зменшувало виразність нейродегенеративних явищ та призводило до зростання кількості гліоцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ішемія мозку, мікроемболізація, судинний ендотеліальний ростовий фактор (VEGF), імуномодуляція.

ВСТУП

Судинний ендотеліальний ростовий фактор (vascular endothelial growth factor, VEGF) – сигнальний білок, що стимулює ангиогенез та впливає на низку інших клітинних та органних функцій; у нервовій системі він виступає як один із трофічних факторів [1]. VEGF є компонентом інтегральної системи, котра сприяє відновленню подачі кисню та поживних речовин до тканин в умовах недостатності кровообігу та кровопостачання [2]. Концентрація VEGF у сироватці крові підвищується при бронхіальній астмі та знижується при деяких інших патологіях, зокрема цукровому діабеті та після інсульту [3]. VEGF у ЦНС не тільки бере участь у підтримці адекватного стану гемоциркуляторного русла, а й безпосередньо діє на нервові клітини [4]. Цей фактор росту впливає на процеси розвитку нервових елементів, міграцію нервових клітин, рівень виживання нейронів тощо [5].

Ми виконали серію робіт, в яких, використовуючи певні експериментальні підходи, створювали транзиторні порушення кровопостачання однієї з півкуль головного мозку щурів. Для цього, зокрема, вико-

ристовували методику мікроемболізації (МЕ) судин даної ділянки головного мозку за допомогою введення в русло сонної артерії суспензії адипоцитів [6]. Уведення адипоцитів призводило до закупорювання дрібних кортикальних судин вказаної півкулі та розвитку транзиторної ішемії. Протягом приблизно однієї доби після такої операції відбувалися лізис жирових емболів і відновлення кровопостачання. Результатом подібного порушення кровообігу були дифузні нейродегенеративні зміни в корі ураженої півкулі, а в певній частині тварин виникали осередки інфарктів. У відновний період (10–90-та доби після мікроемболізації) на місці вогнищ деструкції утворювалися гліальні рубці або кісти.

Ішемічне ураження мозку супроводжується імуносупресією та нейрозапаленням, морфологічним проявом чого є збільшення кількості клітин глії та їх гіпертрофії. В межах перших трьох діб після мікроемболізації в корі спостерігалось гостре запалення, що характеризувалось активацією ендотеліальних клітин та розвитком набряку. У відновний період проявлялось хронічне запалення, пов'язане зі стійкою активацією гліоцитів та потраплянням у мозок клітин імунної системи. Останнє свідчить про пошкодження гематоенцефалічного бар'єра, що є одним із патогенетичних факторів розвитку нейродегенеративних процесів.

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

² Національний інститут раку, Київ (Україна).

Ел. пошта: lilya-yaremenko@ Rambler.ru (Л. М. Яременко).

Іншою методикою створення транзиторної ішемії кори може слугувати згадана вище унілатеральна перев'язка сонної артерії. У таких тварин, як щури, це призводить до відносно незначних та нетривалих нейродегенеративних змін, що майже не супроводжується явищами запалення. Кровопостачання кори відновлюється в цьому разі за рахунок посилення колатерального кровообігу [7, 8].

Оскільки в умовах МЕ в корі виникають запальні процеси, очевидну цікавість викликає можливість впливати на дані процеси, використовуючи імуномодулятори. Одним із них є синтетичне похідне тимопоєтину імунофан (аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргінін). Цей пептид демонструє істотні імунорегуляторні та детоксикаційні властивості, пригнічує вільнорадикальні процеси перекисного окиснення [9], запобігає пошкодженню лімфоцитів та гранулоцитів [10]. Окрім індукції імунних ефектів, імунофан підвищує антиоксидантну резистентність завдяки стимуляції синтезу церулоплазміну та лактоферину та підвищенню активності каталази, знижує продукцію медіаторів запалення [9, 10]. Цей поліпептид має виражені нейропротекторні властивості [7, 11].

В умовах описаних вище транзиторних порушень кровопостачання кори, зумовлених використанням двох зазначених експериментальних прийомів, ми вивчали зміни інтенсивності експресії VEGF у вражених ділянках кори однієї з півкуль головного мозку щурів. Для цього застосовували імуногістохімічну методику. Ми також намагалися вивчити вплив імуномодулятора імунофану на відповідний комплекс розладів.

МЕТОДИКА

Досліди були виконані на 115 самцях білих статево-зрілих щурів лінії Вістар із масою тіла 260–290 г. Тварин утримували у віварії на стандартному раціоні по чотири тварини в клітці з вільним доступом до їжі та води і постійним світловим режимом (12/12 год). У дослідах використовували самців щурів, оскільки коливання рівня естрогенів у самиць істотно впливає на перебіг ішемічного ушкодження головного мозку [12]. Дослідні тварини були поділені на п'ять груп. Першу групу (К) склали контрольні інтактні тварини ($n = 10$), другу – псевдооперовані щури (ПО), в котрих відкривали ліву загальну сонну артерію та мобілізували її, але не перев'язували; після цього рану зашивали ($n = 35$). У третій групі (ПСА) тваринам перев'язували ліву сонну артерію, в неї ін'єкували 0.2 мл фізіо-

логічного розчину, після чого накладали лігатуру ($n = 35$). Щурам четвертої групи (МЕ) проводили мікроемболізацію кровоносних судин лівої півкулі головного мозку ($n = 35$). Для цього в ліву загальну сонну артерію вводили 0.2 мл суспензії ізольованих адипоцитів; даний аспект методики був докладно описаний у нашій попередній роботі [8]. П'ята група (МЕ+і) включала в себе тварин, котрим проводили процедуру МЕ, але додатково підшкірно щоденно вводили по 0.5 мкг імунофану («Бионокс», РФ) у межах першого–10-го, 21–23-го, 30–32-го та 50–51-го днів експерименту ($n = 35$). Щурам груп ПО та ПСА підшкірно вводили фізіологічний розчин за аналогічною схемою. Всі оперативні втручання виконували під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Тварин експериментальних груп декапітували, та їх головний мозок вилучали для досліджень через одну, три, 10, 30 і 90 діб після початку досліду. Маніпуляції проводили під глибоким барбітуратовим наркозом (тіопентал натрію, 200 мг/кг). Мозок розділяли фронтальними розрізами на три частини; середню з них вміщували на 24 год у 10 %-вий забуферений розчин формаліну (рН 7.4, 4 °С). Матеріал обробляли за загальноприйнятою методикою для заливання в парафін; з отриманих зразків виготовляли гістологічні зрізи 4 мкм завтовшки, які забарвлювали азур II-еозином. У зрізах проводили імуногістохімічну реакцію з поліклональними антитілами до VEGF (Ab-1 (RB-222) Human, Mouse, and Rat, 1:200) виробництва «Lab Vision» (США) відповідно до інструкції виробника. Для візуалізації продуктів реакції використовували систему детекції EnVision™ FLEX («Dako», Данія). Кожний другий зріз додатково забарвлювали гематоксиліном Гілла. Як позитивний контроль використовували зразки мозку щурів із визначеною позитивною реактивністю щодо VEGF, а для негативного контролю проводили всі вказані вище процедури, але без застосування первинних антитіл.

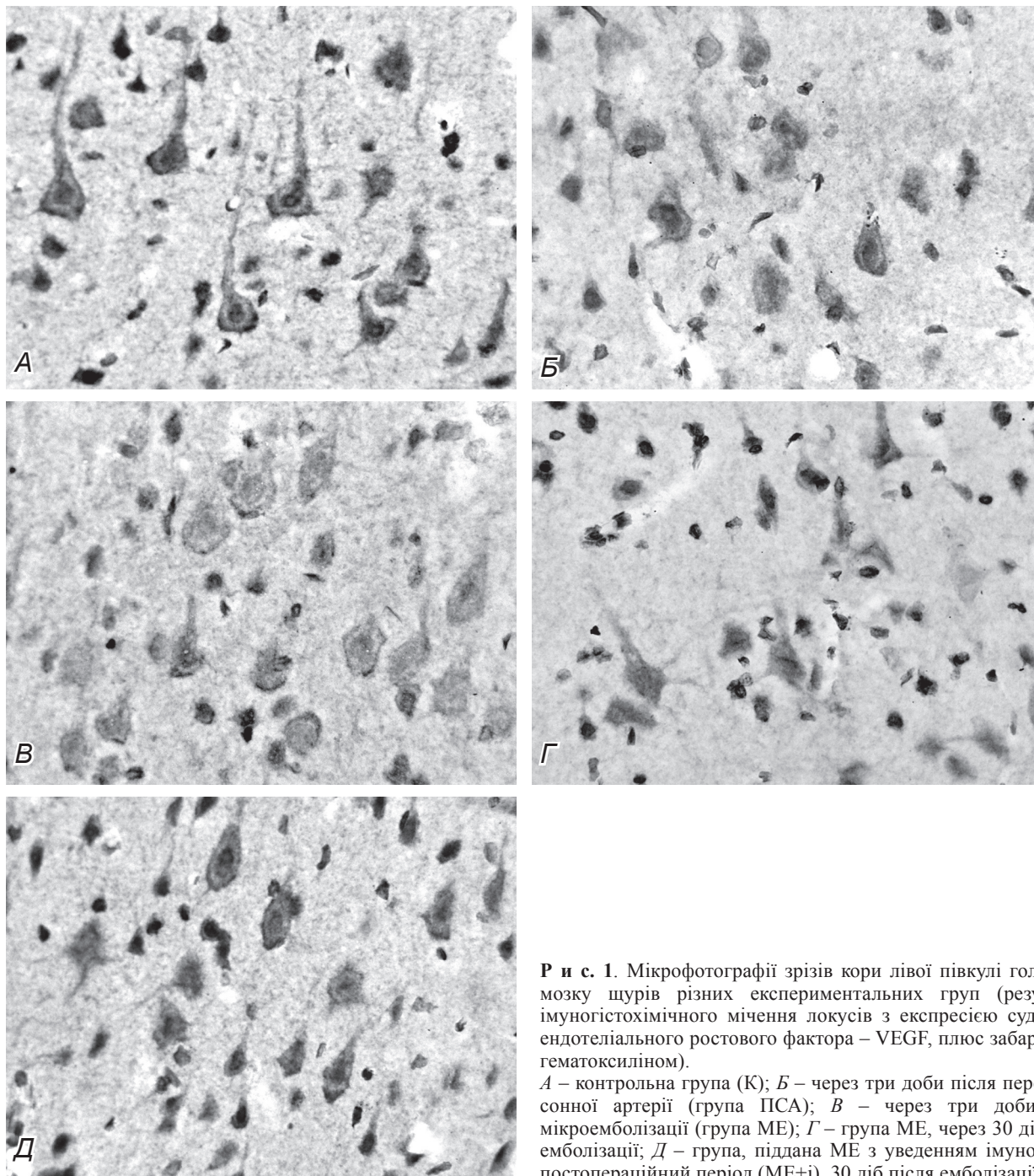
Гістологічні препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 («Nikon», Японія). Отримані зображення ($\times 400$, 1280 \times 960 пікселів RGB) піддавали денситометричному аналізу для визначення інтенсивності експресії VEGF; використовували систему аналізу зображення ImageJ 1.46 («Wayne Rasband» (NIH), США). Вимірювали оптичну щільність у симетричних ділянках гангліонарного шару кори великих півкуль (лівої та інтактної правої). Отримані числові дані обробляли з використанням стандартних статистичних методів. Міжгрупові різниці вважалися вірогідними при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної інтактної групи (К) в цитоплазмі сом нейронів кори великих півкуль головного мозку виявлялася досить виразна експресія VEGF. При цьому гранули хромогену частіше розташовувалися під плазмолемою та (в дещо меншій кількості) в цитоплазмі. Іноді можна було спостерігати VEGF-позитивне імуномічення (хоча й менш

інтенсивне) і в апікальних дендритах пірамідних нейронів. Помірне мічення VEGF спостерігалось в нейропілі (у вигляді дрібних гранул). У цитоплазмі частини гліальних клітин також виявлялася порівняно невисока експресія цього фактора (рис. 1, А).

У псевдооперованих щурів (ПО) візуально не вдавалося виявити якихось помітних відмінностей експресії VEGF порівняно з контролем.



Р и с. 1. Мікрофотографії зрізів кори лівої півкулі головного мозку щурів різних експериментальних груп (результати імуногістохімічного мічення локусів з експресією судинного ендотеліального ростового фактора – VEGF, плюс забарвлення гематоксиліном).

А – контрольна група (К); Б – через три доби після перев'язки сонної артерії (група ПСА); В – через три доби після мікроемболізації (група МЕ); Г – група МЕ, через 30 днів після емболізації; Д – група, піддана МЕ з уведенням імунофану в постопераційний період (МЕ+і), 30 днів після емболізації.

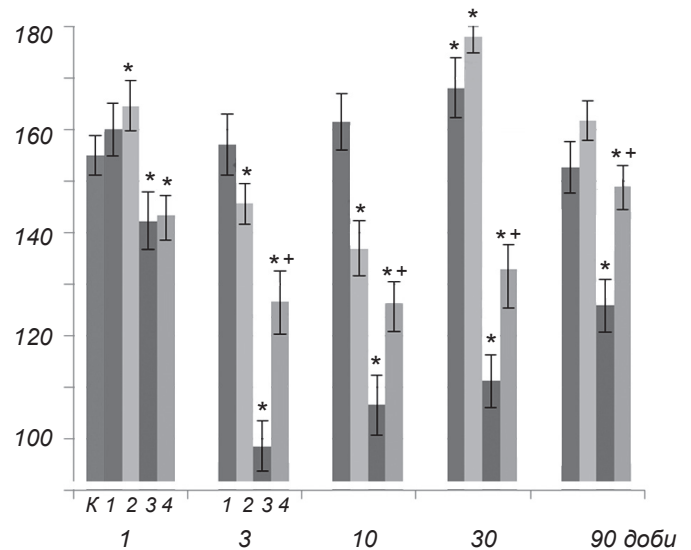
Після операції ПСА через одну, три та 10 діб у корі мозку звертали на себе увагу розширені кровоносні мікросудини з явищами периваскулярного набряку. Іноді в зрізах кори лівої півкулі зустрічалися дегенеруючі нейрони, які можна було диференціювати за гіперхромією цитоплазми, зморщенням та ущільненням ядра. Дані явища поступово зменшувались, і вже через 30 діб після операції їх важко було виявити. На цьому тлі візуально в інтервалі три–10 діб досліджу спостерігалось незначне зменшення експресії VEGF у перикаріонах та нейропілі (рис. 1, Б) з наступним відновленням через 30 днів від початку експерименту.

В умовах МЕ в корі лівої півкулі відмічались осередки некрозу різного розміру, в яких експресія VEGF до 10-ї доби експерименту була різко зниженою або відсутньою. Через 10–30 діб на місцях дрібних некротичних зон формувалися гліальні рубці, а на місці великих вогнищ у двох тварин на 30-ту добу досліджу утворювалися псевдокісти. Через 30 діб досліджу в частині клітин гліальних рубців та стінках псевдокіст низька або помірна експресія VEGF змінювалася на дещо підвищену щодо контрольних значень.

У ділянках кори, які не зазнали виражених деструктивних змін в умовах МЕ, виявлялося зниження експресії VEGF у нейронах та нейропілі; найменший рівень імуномічення спостерігався через три доби після зазначеного порушення кровообігу (рис. 1, В). У подальшому даний показник поступово зростав (Г), але навіть через 90 діб досліджу він був нижчим, ніж у контролі. Разом з тим у відновлювальний період після МЕ-ішемізації експресія VEGF у гліальних елементах поступово зростала, і наприкінці досліджу вона часто була вищою, ніж у контролі.

Застосування імунофану в умовах МЕ (група ME+і) судин лівої півкулі зменшувало дифузні дегенеративні зміни нейрокитів у пошкодженій корі та виразність гліальної реакції. На цьому тлі зниження експресії VEGF у нейронах та нейропілі кори з боку ураження візуально здавалося меншим, ніж у тварин із МЕ, котрим імунофан не вводили (рис. 1, Д), причому через 90 діб досліджу інтенсивність імуномічення VEGF виглядала практично такою ж самою, як і в контрольних групах.

Денситометрична оцінка інтенсивності експресії VEGF у корі лівої півкулі мозку в умовах різних за тяжкістю та методикою індукції порушень кровообігу показала, що динаміка згаданого показника у відповідних групах істотно розрізняється (рис. 2).



Р и с. 2. Діаграма усереднених значень оптичної щільності (ум. од.) зрізів кори лівої півкулі головного мозку експериментальних щурів в умовах імуногістохімічного мічення білка судинного ендотеліального ростового фактора (VEGF) у різні періоди після транзиторних порушень кровопостачання півкулі. Столпчик К – оптична щільність у зрізах кори тварин контрольної інтактної групи. Позначення експериментальних груп: 1 – тварини з псевдооперацією (ПО), 2 – тварини з перев'язкою лівої загальної сонної артерії (ПСД), 3 – тварини з уведенням суспензії адипоцитів у басейн лівої загальної сонної артерії (мікроемболізацією судин лівої півкулі головного мозку, МЕ), 4 – тварини з мікроемболізацією, яким вводили імунофан протягом періоду спостереження (ME+і; див. Методику). Зірочками позначені випадки вірогідної відмінності ($P < 0.05$) від значень у групі К, хрестиками – випадки аналогічних відмінностей при порівнянні груп 3 та 4.

Після псевдооперації (мобілізації сонної артерії без її перев'язки) інтенсивність імуномічення VEGF на перший день після такого втручання незначно підвищувалася. В межах трьох–10 діб цей показник не відрізнявся істотно від контрольних значень у групі К, а на 30-ту добу він незначно, але вірогідно перевищував згадані значення. Відхилення інтегральної щільності VEGF-імунопозитивності, що відображує інтенсивність експресії даного фактора, в групі ПО не перевищували 8 % контрольного значення цього індексу. В пізній період спостереження (через 90 діб) експресія VEGF у групі ПО була практично ідентичною такій у контролі (рис. 2).

У групі ПСА, тобто у тварин, котрим проводили унілатеральну перев'язку сонної артерії, інтегральна щільність VEGF-імунопозитивності в першу добу після операції незначно, але вірогідно перевищувала вихідні значення. В межах третьої–10 доби даний показник ставав вірогідно нижчим

контрольної величини, але на 30-ту добу перевищував останню приблизно на 15 %. У пізній період спостереження (на 90-ту добу) оптична щільність у проаналізованих препаратах практично дорівнювала контрольним значенням (рис. 2).

Ішемізація кори лівої півкулі в групі МЕ (рис. 2) зумовлювала досить істотне зменшення інтенсивності експресії VEGF. Таке падіння відчувалося вже в першу добу, коли інтегральна оптична щільність у відповідних зрізах кори ставала на 8 % меншою, ніж у контролі. У пізніші терміни (третья–30-та доби) даний показник зменшувався щодо контролю більше ніж на третину (на третю добу – на 37 %). Вірогідне зменшення інтенсивності експресії VEGF зберігалось і на 90-ту добу спостереження, коли оптична щільність VEGF-імунопозитивності складала близько 80 % вихідного значення.

Динаміка рівня експресії VEGF у групі ME+і, тобто у тварин із порушенням кровопостачання кори лівої півкулі, викликаним МЕ адипоцитами, але комбінованим із лікуванням імунофаном, була значною мірою подібною до такої у групі МЕ. Проте інтенсивність пригнічення експресії VEGF у тварин, котрим вводили імунофан, була значно (вірогідно) меншою, ніж у щурів групи МЕ, котрим цей агент не вводили. Максимальне нормоване зменшення оптичної щільності на третю та 10-ту добу після початку спостереження не перевищувало 20 %. На 90-й день після МЕ, комбінованої з уведенням імунофану, оптична щільність зрізів із VEGF-імунопозитивним продуктом у групі ME+і хоча й відрізнялася вірогідно від контрольного значення, але менше ніж на 5 %, тобто фактично наближувалася до вихідного значення.

Певна травматизація сонної артерії при псевдооперації, яка неминує супроводжує останню, очевидно викликає деякі розлади кровообігу в басейні судин лівої півкулі, але ці ефекти мінімальні. Вони не призводять до драматичних змін у будові кори великих півкуль [8] та в експресії VEGF. Перев'язка сонної артерії теж не спричиняє фатальних змін у кровопостачанні кори дослідженої півкулі, але все ж таки зумовлює певну недостатність такого кровопостачання. Це призводить спочатку до помірного зменшення експресії VEGF, проте з наступним (на 30-ту добу) її тимчасовим зростанням порівняно з контролем. Останній феномен у динаміці експресії VEGF, вірогідно, можна розглядати як прояв компенсаторно-приспосувальної реакції тканин кори на деяке тимчасове зменшення забезпечення киснем та поживними речовинами.

В умовах МЕ, котру, вірогідно, можна вважати експериментальним аналогом емболічного ішемічного інсульту в людини, драматичне пригнічення експресії VEGF в ураженій півкулі не тільки в гострій, але й у віддалений період свідчить про істотні порушення компенсаторно-відновлювальних процесів після ішемізації кори. Такі порушення відбуваються не тільки безпосередньо в осередках некрозу тканини мозку, а й у ділянках за межами цих осередків. Подібні розлади можуть виступати як один із істотних факторів прогресування дегенераційних змін у корі мозку, ініційованих транзиторною ішемією.

Застосування імуномодулятора (імунофану) істотно зменшує інтенсивність зниження експресії VEGF після транзиторної ішемії кори з боку ураження. Це відображується у сприятливішому перебігу відновлювальних процесів у корі великих півкуль мозку [8]. Такий нейропротекторний ефект може бути результатом прямого впливу імунофану на нервову тканину, зумовленого, перш за все, антиоксидантними властивостями препарату [10]. Крім того, відповідний ефект може бути опосередкований відносною активацією системи Т-регуляторних клітин [9–11]. Вказані вище фактори, задіяні після ішемізації кори, свідчать про істотні нейропротекторні властивості імунофану [13, 14].

Отже, запальні процеси після гострого порушення кровопостачання кори великих півкуль в умовах МЕ помітною мірою пригнічуються в результаті дії використаного імуномодулятора, і це супроводжується значно помірнішим зменшенням інтенсивності експресії VEGF. Таким чином, зниження експресії даного фактора можна розглядати як один із істотних елементів патогенезу постішемічних дегенераційних явищ у корі.

Застосування імунофану вірогідно зменшує виразність пригнічення експресії VEGF після транзиторної ішемії кори мозку, і це відображується у сприятливішому перебігу постішемічних процесів – зменшенні інтенсивності нейродегенераційних явищ та зростанні кількості гліоцитів.

Експерименти на тваринах проводились у відповідності з положеннями Хельсинкської Декларації 1975 р., переглянутої та доповненої в 2000 р., та директивами Національного Комітету з етики наукових досліджень; проведення експериментів було погоджено з Комісією з питань етики Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця.

У роботі керувалися сучасними правилами утримання та використання лабораторних тварин, що відповідають принципам Європейської Конвенції (Страсбург, 1985).

Автори даної роботи – Л. М. Яременко, О. О. Грабовий та О. М. Грабовий – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів 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. J. M. Rosenstein, J. M. Krum, and C. Ruhrberg, "VEGF in the nervous system," *Organogenesis*, **6**, No. 2, 107-114 (2010).
2. T. Licht and E. Keshet, "Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain," *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, No. 10, 1727-1737 (2013).
3. F. Mackenzie and C. Ruhrberg, "Diverse roles for VEGF-A in the nervous system," *Development*, **139**, 1371-1380 (2012).
4. Y. Ma, A. Zechariah, Y. Qu, and D. M. Hermann, "Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke," *J. Neurosci. Res.*, **90**, No. 10, 1873-1882 (2012).
5. T. Licht, R. Eavri, I. Goshen, et al., "VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons," *Development*, **137**, No. 2, 261-271 (2010).
6. 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.
7. Л. М. Яременко, О. М. Грабовий, "Стан популяції лімфоцитів при моделюванні порушень кровообігу у лівій півкулі головного мозку у щурів та його корекція", *Імунологія та алергологія*, № 1, 40-44 (2009).
8. 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. НМУ ім. О. О. Богомольця*, № 4, 28-33 (2009).
9. 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).
10. А. В. Караулов, "Молекулярно-биологическое обоснование применения иммунофана в клинической практике", *Лечащий врач*, № 4, 46-47 (2000).
11. Ю. А. Белозерцев, С. В. Юнцев, "Исследование нейропротекторного и ноотропного действия препаратов при патологии ЦНС", *Забайкал. мед. вест.*, № 2, 42-45 (2008).
12. P. D. Hurn and I. M. Macrae, "Estrogen as a neuroprotectant in stroke," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **20**, 631-652 (2000).
13. A. Liesz, E. Suri-Payer, C. Veltkamp, et al., "Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke," *Nat. Med.*, **15**, 192-199 (2009).
14. J. T. Walsh, J. Zheng, I. Smirnov, et al., "Regulatory T cells in central nervous system injury: a double-edged sword," *J. Immunol.*, **193**, No. 10, 5013-5022 (2014).