

ЕКСПРЕСІЯ СИНАПТОФІЗИНУ В СЕНСОМОТОРНІЙ КОРІ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ПРИ ТРАНЗИТОРНІЙ ІШЕМІЇ ТА ІМУНОКОРЕКЦІЇ ЇЇ НАСЛІДКІВ: ВПЛИВ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ МОЗКОВИМ АНТИГЕНОМ

Надійшла

У контрольних шурів, сенсibilізованих мозковим антигеном, рівень експресії синаптофізину (Синф) у сенсомоторній корі головного мозку був вірогідно нижчим порівняно зі значеннями інтактного контролю через 13, 15, 22 та 42, але не через 102 доби після сенсibilізації. Після гострого порушення мозкового кровообігу внаслідок мікроемболізації судин зазначений показник в ураженій півкулі у попередньо сенсibilізованих тварин був вірогідно меншим порівняно з таким у контралатеральній півкулі (через три, 10 та 30 діб) та нижчим, ніж у сенсibilізованих тварин без таких порушень (через одну, три, 10 та 30 діб). Застосування імуномодулятора імунофану призводило до швидкого (через одну-дві доби) збільшення експресії Синф як в ураженій, так і в контралатеральній півкулі головного мозку (зі збереженням вірогідної різниці між значеннями в півкулях протягом як мінімум 10 діб).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальна ішемія мозку, синаптофізин, антиген, імунофан.

ВСТУП

Втрата імунної толерантності щодо компонентів мозку може стати причиною гліального нейрозапалення [1], дегенеративних та функціональних змін у нейронах [2, 3], ініціації та/або посилення неврологічних порушень [4, 5]. Незважаючи на існування гемато-енцефалічного бар'єра (ГЕБ), антитіла до елементів тканини мозку виявляються в крові від 5 до 92 % обстежених, у яких судинні мозкові катастрофи в анамнезі були відсутні [4, 5]. Пошкодження ГЕБ привносить фактор імунної агресії до комплексу патогенетичних механізмів, зумовлених гострими порушеннями мозкового кровообігу [6]. Це, в свою чергу, дає підстави для використання імуотропних засобів у цілях корекції відповідних змін.

З урахуванням викладеного вище ми досліджували рівні експресії білка синаптофізину (Синф) у сенсомоторній корі головного мозку шурів в умовах індукції порушень кровопостачання в басейні лівої сонної артерії на тлі попередньої сенсibilізації мозковим антигеном та при дії імуномодулятора імунофану.

МЕТОДИКА

У дослідженні було використано статевозрілих самців шурів лінії Вістар з початковою масою тіла 260–290 г. Тварини рандомізованим чином були поділені на шість груп. Щури групи Кі (інтактний контроль) не зазнавали жодних втручань. Тварини всіх інших груп за 12 діб до оперативного втручання були сенсibilізовані внаслідок уведення 20%-вого водносолевого екстракту гомологічної тканини мозку (церебрального антигена). При цьому тварини групи Кс (контроль, сенсibilізовані) не зазнавали жодних інших втручань. У тварин групи ПОс (псевдооперовані, сенсibilізовані) забезпечували оперативний доступ до лівої загальної сонної артерії та мобілізували останню без додаткових маніпуляцій, після чого рану зашивали. Щурам групи ПСАС (перев'язка сонної артерії, сенсibilізовані) мобілізували згадану артерію, вводили 0.2 мл фізіологічного розчину та накладали на цю судину лігатуру. Тваринам груп МЕАС (мікроемболізація басейну сонної артерії, сенсibilізовані) та МЕАС+і (МЕАС+імунофан) індукували гостре порушення мозкового кровообігу за допомогою введення у ліву загальну сонну артерію 0.2 мл суспензії відмитих ізольованих адипоцитів [7], після

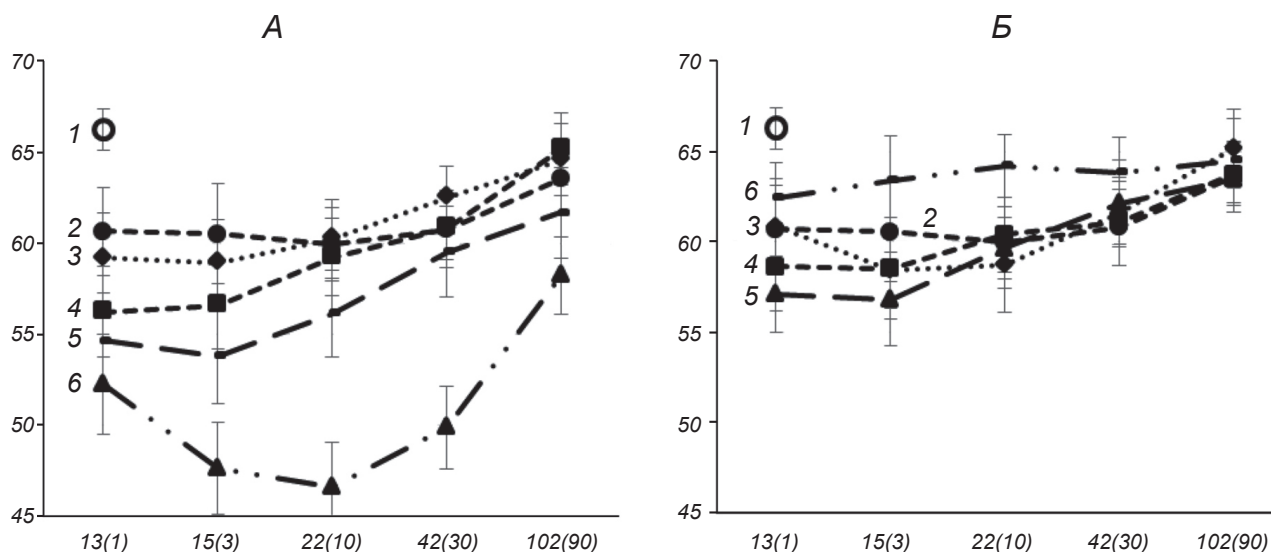
¹ Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).

² Національний інститут раку МОЗ України, Київ (Україна).
Ел. пошта: L_yaremenko03@gmail.com (Л. М. Яременко).

чого на артерію накладали лігатуру. Щури групи MEAc+і отримували підшкірно по 0.5 мкг імунофану на перший – 10-й, 21 – 23-й, 30 – 32 та 50 – 51-й дні експерименту. Зразки тканин головного мозку для досліджень вилучали через одну, три, 10, 30 та 90 діб після оперативного втручання (тобто відповідно через 13, 15, 22, 42 та 102 доби після сенсibiliзації мозковим антигеном у п'яти групах). Імуногістохімічну (ІГХ) реакцію з первинними антитілами до Синф (Synaptophysin Ab-2, Mouse Monoclonal Antibody, Clone: SYP02, «Thermo Scientific», США) у розведенні 1:50 проводили відповідно до протоколу виробника. Для візуалізації продуктів ІГХ-реакції використовували систему детекції EnVision™ FLEX, («Dako», Данія). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Gill. Як позитивний контроль використовували зразки мозку щурів з визначеною позитивною реактивністю, а для негативного контролю згадані вище процедури проводили без застосування первинних антитіл. Аналіз отриманих зображень зрізів мозку [8] здійснювали за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46; зображення піддавали трансформації у восьмибітні та вимірювали оптичну щільність симетричних ділянок гангліонарного шару кори великих півкуль (лівої та правої). Оцінку вірогідності відмінностей між досліджуваними показниками здійснювали за *t*-критерієм Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рівень експресії Синф у гангліонарному шарі сенсомоторної кори щурів групи Kc через 13, 15, 22 та 42 доби після сенсibiliзації мозковим антигеном був статистично вірогідно меншим, ніж такий у групі K ($P < 0.01$ через 13 діб та $P < 0.05$ у решті випадків), але різниця нівелювалася через 102 доби (див. рисунок). У щурів груп ПОс та ПСAc статистично вірогідних відмінностей рівня експресії Синф у лівій та правій півкулях, а також міжгемісферних відмінностей від відповідних показників у групі Kc не виявлялося (див. рисунок). Для тварин групи MEAc був характерним статистично вірогідно менший ($P < 0.01$) виявлений імуногістохімічно рівень експресії Синф у лівій півкулі порівняно з таким у групі Kc (через одну, три, 10 та 30 діб) та в контралатеральній півкулі (через три, 10 та 30 діб) (див. рисунок). Разом з тим у щурів групи MEAc+і статистично вірогідно нижчий ($P < 0.01$) рівень експресії Синф порівняно з таким у групі Kc виявлявся лише через одну добу після емболізації. Відмінності показників у лівій та правій півкулях спостерігалися через одну, три та 10 діб ($P < 0.01$ в усіх випадках). При цьому через 10 та 30 діб досліджуваний показник у групі MEAc+і був статистично вірогідно вищим ($P < 0.01$), ніж такий у групі MEAc.



Рівні експресії синаптофізину в сенсомоторній корі головного мозку щурів після порушень кровопостачання у басейні лівої сонної артерії на тлі попередньої сенсibiliзації мозковим антигеном та при дії імунофану.

A - ліва, B - права півкулі

По осі абсцис – час після введення мозкового антигена та оперативного втручання (у дужках); по осі ординат – питома оптична щільність, ум. од./мкм². 1 – інтактний контроль; 2 – контроль, сенсibiliзовані щури; 3 – псевдооперовані, сенсibiliзовані тварини; 4 – тварини з перев'язкою сонної артерії, сенсibiliзовані; 5 – щури з мікроемболізацією басейну сонної артерії, сенсibiliзовані; 6 – тварини із зазначеною мікроемболізацією та введенням імунофану.

Таким чином, і сенсibilізація мозковим антигеном, і гостре порушення мозкового кровообігу на тлі такої сенсibilізації призводять до зменшення рівня експресії Синф. Це можна розцінювати як кореляти істотного порушення синаптичних процесів. Вплив імунофану на рівень експресії Синф проявлявся у швидкому та нетривалому (одна-дві доби) підвищенні згаданого показника як в ураженій, так і в контралатеральній півкулі. Окрім описаних вище ефектів, спостерігалось істотне прискорення процесу відновлення рівня Синф порівняно з таким у тварин, які після індукції у них судинної «катастрофи» не отримували даний імуномодулятор.

Усі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції про захист тварин, які використовуються в наукових цілях, та положенням Комітету з біоетики Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця МОЗ України.

Автори представленої роботи – Л. М. Яременко, О. М. Грабовий та С. Є. Шепелєв – стверджують про 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. S. Park, J. A. Shin, J. S. Jung, et al., "Anti-inflammatory mechanism of compound K in activated microglia and its neuroprotective effect on experimental stroke in mice," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **341**, No. 1, 59-67 (2012).
2. H. B. Stolp and K. M. Dziegielewska, "Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases," *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **35**, No. 2, 132-146 (2009).
3. Z. Zhang, J. S. Zoltewicz, S. Mondello, et al., "Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products," *PLoS One*, **9**, No. 3, e92698 (2014).
4. B. Diamond, G. Honig, S. Mader, et al., "Brain-reactive antibodies and disease," *Annu. Rev. Immunol.*, **31**, 345-385 (2013).
5. S. Irani and B. Lang, "Autoantibody-mediated disorders of the central nervous system," *Autoimmunity*, **41**, No. 1, 55-65 (2008).
6. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
7. Пат. 36843 Україна, МПК G09B 23/00, *Спосіб моделювання комбінованого судинно-імунного пошкодження мозку*, О. М. Грабовий, Л. М. Яременко, опубл. 10.11.08, Бюл. № 21.
8. А. И. Хренов, П. В. Беличенко, "Количественный анализ синаптофизина (p38) в мозгу потомства второго поколения от самцов крыс с длительной морфинной интоксикацией", *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **129**, № 1, 50-42 (2000).