

УДК 616.831-005.001.57

Яременко Л.М.¹, Гарбовий О.М.², Лавриненко В.Є.¹**Експресія білку S-100 в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку у щурів при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості**¹Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, кафедра гістології та ембріології, м. Київ (e-mail: lilya-yaremenko@ Rambler.ru)²Національний інститут раку, відділ патологічної анатомії, м. Київ

Резюме. При ішемії відбувається дифузне ушкодження структурних елементів мозку: нейронів, глії та міжклітинних контактів. Одним із маркерів, який відображує гліальні функціональні процеси у нервовій системі є білок S-100.

Мета роботи – вивчити зміни експресії білку S-100 в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку щурів при моделюванні порушень кровопостачання у басейні лівої сонної артерії різного ступеню важкості.

Матеріали та методи. Дослідження виконані на 115 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар вагою 260-290 г., яким моделювалось ушкодження головного мозку. Головний мозок для досліджень забирався через 1, 3, 10, 30 і 90 днів після початку досліду. Були застосовані гістологічні, імуногістохімічний, денситометричний та статистичний методи.

Порушення кровопостачання кори великих півкуль головного мозку призводить до зміни експресії S-100 білку, направленість і ступінь якого залежить від ступеня ішемії.

У осередках інфарктів відбувається практично зникнення експресії S-100. Крім того можуть формуватися мікроосередки зі зниженим вмістом цього маркера, у яких, можна припустити, дегенеративні зміни в наслідок ішемії не сягнули некрозу.

В збережених ділянках сенсомоторної кори мозку відбувається реактивна активація S-100-позитивних клітин, що може відображати довготривалі процеси, які відображають явища пост-ішемичного реактивного гліозу.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку полягає у поглибленні уявлень про морфофункціональні зміни у мозку при порушеннях кровообігу, а також як одну з ознак оцінки ступеню важкості ішемичного ураження

Ключові слова: ішемія мозку, білок S-100.

Постанова проблеми і аналіз останніх досліджень.

Цереброваскулярна патологія, а особливо гострі порушення мозкового кровопостачання є однією із складних проблем медицини, що обумовлена їх суттєвою питомою вагою в структурі захворюваності та смертності населення, високими показниками тимчасових втрат працездатності та первинної інвалідності. [3]. Пошкодження головного мозку в результаті ішемії тієї чи іншої форми та ступеня завжди супроводжується вторинними або віддаленими структурними, функціональними та молекулярними змінами, які тривають від місяців до декількох років. При ішемії відбувається дифузне ушкодження структурних елементів мозку: нейронів, глії та міжклітинних контактів [4].

Одним із маркерів, який відображує гліальні функціональні процеси у нервовій системі є білок білок S-100 [5, 9], що забезпечує можливість зв'язку з різними білками-мішенями. [6, 10, 11]. Визначення експресії білоку S-100 в тканині головного мозку дозволяє оцінити ступінь диференціювання та функціональну активність гліальних елементів [8].

Мета роботи – вивчити зміни експресії білку S-100 у гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку щурів при моделюванні порушень кровопостачання у басейні лівої сонної артерії різного ступеню важкості.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження виконані на 115 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар вагою 260-290 г. що утримувалися у виварії на стандартному раціоні по 4 тварини у клітці з вільним доступом до їди та води, та постійним світло-затемненим режимом згідно «Принципам ухода за лабораторними животними». Всі досліді з використанням тварин проводились з положенням міжнародних принципів гуманного поводження з тваринами викладених в «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (NIH publ. No. 93 23, revised 1985). В досліді використовували самців щурів,

оскільки рівень естрогенів здійснює вплив на протікання ішемичного ушкодження головного мозку.[7]. Тварини, використані в досліді, були поділені на 4 групи: 1 група – контроль (К), тварини, які не зазнавали ніяких дій (n=10); 2 група (ПО) - псевдооперовані, щурам виконувався доступ до лівої загальної сонної артерії й її мобілізація, після чого рана зашивалася (n=35); 3 група (ПСА) - з перев'язаною сонною артерією, після доступу до лівої сонної артерії та її мобілізації в неї вводилося 0,2 мл фізіологічного розчину та накладалася шовкова лігатура (n=35); 4 група (МЕА) – з мікроемболізацією кровоносних судин лівої півкулі головного мозку, (n=35) [2.]. Всі оперативні втручання виконувалися під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Головний мозок для досліджень забирався через 1, 3, 10, 30 і 90 днів 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 (pH 7,4, 4°C) на 24 години. Матеріал ушльнювався в парафін і виготовляли гістологічні зрізи товщиною 4 мкм які забарвлювалися азур II-еозином.

Імуногістохімічну (ІГХ) реакцію для виявлення S-100 проводили у відповідності з протоколом виробника. Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм депарафінувалися ксилолом та регідратовалися. Демаскування антигенів здійснювалося у цитратному буфері pH 6.0 при 98°C протягом 20 хвилин, після чого зрізи промивалися буфером. Далі на зрізи наносився 3% розчин перекиси 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 антитілом проти білку S-100 (Polyclonal Rabbit Anti-S100 (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. Для аналізу отриманих зображень (збільшення мікроскопа x400, 1280x960 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 S-100 між контролем та дослідними групами, а також між враженою півкулею мозку та контралатеральною визначалася за критерієм Фішера.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені спостереження показали, що сенсомоторна кора півкуль мозку щурів контрольної групи має звичайну будову. Більшість нейроцитів має велике округле світле ядро з добре помітним ядрцем та добре розвиненою цитоплазмой. Нейропіл має ніжно волокнистий вигляд. Гліоцити мають невеликі темні ядра. У інтактних тварин у частині гліоцитів виявляється висока експресія S-100 як у навколо ядерних ділянках так і нечисленних відростках, що помірно галузяться. Також виражена експресія цього протеїну виявляється у гліальних периваскулярних мембранах, а у нейропілі вона є меншою.

При ПО та ПСА морфологічні зміни у корі мозку, як з боку ураження так і з контр латерального, візуально практично не фіксуються [1]. Теж саме можна відзначити і для експресії білку S-100 як стосовно морфології не виразні зміни у виявляється тенденція до зниження експресія S-100, а виявлені деякі кількісні зміни цього показника не є

достовірними.

При МЕА на фоні розповсюджених дегенеративних змін [1] в лівій півкулі через 1 добу після ішемічного ушкодження відмічаються мікровогнища з більш або менш вираженим зниженням експресії S-100 у нейропілі. Разом з тим виявляються S-100-позитивні клітини, ймовірно астроцити, з набряклом цитоплазмою з високою експресією S-100. Збільшується рівень мічення гліальних периваскулярних мембран, які часто виглядають потовщеними. У нейропілі характерна експресія набуває гранулярного характеру у вигляді глибок різних розмірів, при цьому прослідити окремі волокнисті структури рідко. У окремих місцях виявляються вогнища середніх розмірів до 200-300 мкм з різко зниженою експресією, зазвичай, як правило виявляється в нейропілі губчаста дегенерація.

У корі правої півкулі тварин цієї групи на цьому строку спостереження виразні зміни експресії S-100 не визначаються.

Через 3 доби після ушкодження з лівої сторони відмічаються у двох тварин виявлені вогнищеві деструктивні зміни з повним зникненням експресії S-100 на фоні губчастої дегенерації. В пенумбрі виявляються S-100-позитивні гліоцити та посилення експресії складі периваскулярних мембран. На інших ділянках кори спостерігається певний мозаїцизм у експресії S-100 – є осередки де він знижений, а в більшості відзначається її загальне зростання. Особливо це стосується астроцитів, у яких вона стає помітно більшою, у порівнянні з попереднім строком спостереження.

З правої сторони в корі мозку щурів цієї підгрупи також відзначається деяке зростання експресії S-100 і перш за все в гліоцитах, тіла і відростки яких виглядають дещо набряклими у порівнянні з контролем.

Через 10 і 30 діб після ішемічної атаки з боку ураження спостерігається подальше зростання експресії S-100 у сенсомоторній корі. При цьому S-100-позитивні клітин зберігають збільшені розміри ті більш інтенсивне забарвлення, ніж у контролі. У нейропілі у цей період відбувається помітне зростання присутності S-100, а місцями можуть більш-менш чітко контуруватися волокнисті утворення. Через 3 місяці після МЕА сенсомоторна кора з боку ураження практично не відрізняється від того, що спостерігалось на попередньому строку спостереження. Лише в невеличких гліальних рубцях, що були виявлені у 2 та у стінці псевдокісти у 1 тварини відмічалось збільшення кількості чітко забарвлених S-100-позитивних волокнистих структур.

З контрлатеральної від ураження сторони у корі мозку у

відновлювальний період (починаючи з 10 доби досліду) спостерігалась дещо підвищена, у порівнянні з контролем, експресія S-100, яка візуально не змінювалась до кінця експерименту.

Проведена кількісна оцінка експресії S-100 у сенсомоторній корі контрольних тварин показала відсутність достовірної відмінності між лівою та правою півкулями, що дозволило об'єднати ці показники (Рис. 1).

Зміни експресії S-100 у корі мозку при ПО та ПСА як з правої так і з лівої сторони (Рис. 1) виявилися у цілому недостовірними.

У тварин з МЕА в корі ураженої півкулі мозку в нейропілі у цілому вже через 1 добу після початку досліду спостерігається (Рис. 1) зростання експресії S-100, і на 3 добу стає статистично достовірно більшим ніж у контролі. Це продовжується до 30 доби експерименту, після чого виявляється на тому ж рівні через 90 діб. У правій півкулі, контрлатеральній до ураженої, також відбувається збільшення наявності білку S-100 через 1 і 3 доби в межах, які практично не відрізняються від лівої півкулі, що зазнала ішемічної атаки. Максимум експресії S-100 у правій півкулі сягає через 10 днів досліду, й фактично на такому рівні зберігається до кінця експерименту та є достовірно меншим, ніж з боку ураження.

Таким чином проведені спостереження показали, що зміни експресії S-100 у мозку, безпосередньо залежить від ступеня ішемічного ураження. В осередках некрозів, вогнищах дегенеративних змін очікувано спостерігається зменшення присутності цього білку. У ділянках сенсомоторної кори, які не зазнали дегенеративних змін, навпаки спостерігається починаючи з 1 доби збільшення експресії S-100, яке поступово зростає і на 30 і 90 доби майже на третину перевищує такі показники у контролі.

Слід особливо відмітити зростання, хоч і менш виразне, експресії S-100 у контрлатеральній півкулі після МЕА. Перш за все це заставляє припустити, що такі зміни можуть бути пов'язаними з перерозподілом кровопостачання півкуль мозку та явищами реперфузії після періоду ішемії [4].

Отже можна констатувати, що ішемія активацію S-100-позитивних гліоцитів, та експресії ними цього білку. Причому, ці явища певною мірою можна розглядати як системними, оскільки збільшення кількості білку S-100 спостерігається як з боку ураження так і з контрлатеральної сторони.

Збереження у віддалений період після ішемічної атаки у сенсомоторній корі мозку гіперактивованих S-100-позитивних гліоцитів та підвищеного вмісту цього білку в нейропілі закономірно можна розглядати як системні зміни, які можуть

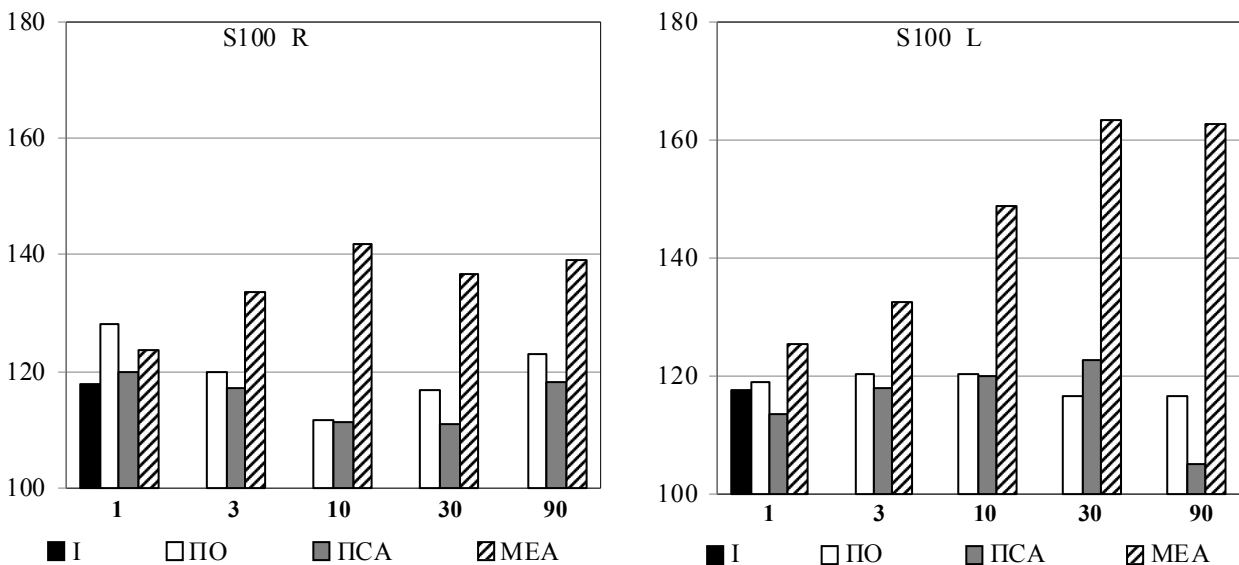


Рис. 1. Експресія S-100 в гангліонарному шарі сенсомоторної кори великих півкуль головного мозку при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості у щурів (питома оптична щільність, у.о./мкм²). R – права півкуля, L – ліва півкуля. 1 – 90 – доба після початку досліду. Дослідні групи щурів: ПО - псевдо оперовані, ПСА - перев'язка сонної артерії, МЕА - мікроемболія адипоцитами

перешкоджати відбуванню компенсаторних процесів та сприяти поступовому млявому нейродегенеративному процесу [6].

Висновки

Порушення кровопостачання кори великих півкуль головного мозку призводить до зміни експресії S-100 білку, направленість і ступінь якого залежить від ступеня ішемії.

У осередках інфарктів відбувається практично зникнення експресії S-100. Крім того можуть формуватися мікроосередки зі зниженим вмістом цього маркера, у яких, можна припустити, дегенеративні зміни в наслідок ішемії не сягнули некрозу.

В збережених ділянках сенсомоторної кори мозку відбувається реактивна активація S-100-позитивних клітин, що може відображати довготривалі процеси, які відображають явища пост-ішемічного реактивного гліозу.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку полягає у поглибленні уявлень про морфофункціональні зміни у мозку при порушеннях кровообігу, а також як одну з ознак оцінки ступеню важкості ішемічного ураження.

Література

1. Грабовий О.М., Стан кори півкуль головного мозку при моделюванні порушень кровообігу та при корекції супутніх змін імунної системи у щурів / Грабовий О.М., Яременко Л.М. // Науковий вісник Національного медичного університету імені О.О.Богомольця – 2009. - № 4 (26). – С28 – 33.
2. 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.
3. Зозуля А.І. Проблеми які стоять перед дослідниками щодо цереброваскулярних хвороб в цілому та інсульту зокрема / Зозуля А.І., Слабкий Г.О., Зозуля І.С. // Український медичний часопис 2014. - № 5. - С. 112-120.
4. Суслина З.А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / Суслина З.А., Пирадов М.А. // М.: «МЕДпресс-информ», 2008.— 288с.
5. S100B Expression in and effects on microglia / Adami C., Sorci G., Blasi E. et al. // Glia. - 2001. - V. 33. - P. 131-142.,
6. Bench-to-bedside review: Burn-induced cerebral inflammation — a neglected entity / M. A. Flierl, P. F. Stahel, B. M. Touban [et al.] // Critical Care. — 2009. —N13. —P. 215–223.
7. Hum P.D., Macrae I.M. Estrogen as a neuroprotectant in stroke // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. - 2000 - V. 20, 631-652().
8. Marenholz I., S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) / Marenholz I., Heizmann C.W., Fritz G. //Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2004. - V. 322. - P. 1111-1122.
9. Nishiyama H., K. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity / Nishiyama H., Knopfel T., Endo S., Itohara S. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. - 2002. - V. 99. - P. 4037-4042.
10. Increased levels of serum S100B protein in critically ill patients without brain injury / C. Routsis, E. Stamataki, S. Nanas [et al.] // SHOCK. — 2006. — Vol. 26, N 1. — P. 20–24.,
11. Serum S100B and Neuron-Specific Enolase as Predictors of The Neurologic Disability Status after Traumatic Brain Injury / A. Saleh, K. Sallam, M. Abadier, A. Al-Kholy // Egypt J. Neurol. Psychiat. Neurosurg. — 2007. — Vol. 44, N 1. — P. 143–156.

¹Яременко Л.М., ²Гарбовой А.Н., ¹Лавриненко В.Е.

Експресія білка S-100 в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку у крыс при моделюванні порушень церебрального кровообігу різної ступеню тяжкості

¹ Національний медичний університет імені А.А.Богомольця, г. Київ (e-mail: lilya-yaremenko@rambler.ru)

² Національний інститут рака, відділ патологічної анатомії, г. Київ

Резюме. При ішемії спостерігається дифузне пошкодження

структурних елементів мозку: нейронів, глії та міжклітинних контактів. Одним з маркерів, що відображає гліальні функціональні процеси в нервовій системі - є білок S-100.

Цель работы – изучить изменения экспрессии белка S-100 в ганглионарном слое сенсомоторной коры головного мозга крыс при моделировании нарушений кровообращения в бассейне левой сонной артерии разной степени тяжести.

Материалы и методы. Исследования проведены на 115 самцах белых половозрелых крысах линии Вистар весом 260-290 г, каким моделировалось повреждение головного мозга. Головной мозг для исследования забирали через 1, 3, 10, 30 и 90 суток после начала эксперимента. Были применены гистологические, иммуногистохимические, денситометрический и статистический методы.

Нарушения кровообращения коры больших полушарий головного мозга приводит к изменениям экспрессии белка S-100, направленность и степень которого зависит от степени ишемии.

В очагах инфарктов происходило практически исчезновение экспрессии S-100. Кроме того могут формироваться микроочаги из сниженным количеством этого маркера, в которых, можно предположить, дегенеративные изменения вследствие ишемии не достигли некроза.

В сохранных участках сенсомоторной коры мозга отражается реактивная активация S-100-позитивных клеток, что может отображать долговременные процессы, отражающие явления пост-ишемического реактивного глиоза.

Перспективы дальнейших исследований в данном направлении заключается в углублении представлений о морфофункциональные изменения в мозге при нарушениях кровообращения, а также как один из признаков оценки степени тяжести ишемического поражения.

Ключевые слова: ишемия мозга, белок S-100.

¹Yaremenko L.M., ²Grabovoy A.M., ¹Lavrinenko V.E.

Expression of S-100 Protein in Ganglionic Layer of the Sensorimotor Cortex when Simulating Cerebrovascular Disorders of Varying Degrees of Severity

¹Bogomolets National Medical University, histology and embryology department, Kyiv (e-mail: lilya-yaremenko@rambler.ru)

²National Cancer Institute, pathological anatomy department, Kyiv

Abstract. Ischemia is accompanied by diffuse damage of structural elements of brain: neurons, glia and intercellular contacts. One of the markers that show glial functional processes in nervous system is the S-100 protein.

The aim of the work is to study the changes in the S-100 protein expression in ganglion layer of rat's brain sensorimotor cortex at modeling of damaged anterior circulation in left carotid artery of different severity degree.

Materials and methods. The study is conducted on 115 male mature white rats from Vistar line weighted 260-290 g, at which the damage of the brain was modulated. The brain for study was taken in 1, 3, 10, 30 and 90 days after the start of the experiment. The histological, immunohistochemical, densitometrical and statistical methods were used.

The damage in brain hemispheres circulation leads to changes of S-100 protein expression, direction and degree of which depends on the level of the ischemia.

In infarct focuses there was practically absolute lack of S-100 expression. Also microfocuses with decreased amount of this marker can form, where we suppose degenerative changes caused by ischemia have achieved necrosis.

In saved areas of sensorimotor brain cortex there is a reactive activation of S-100 positive cells that can show the long-term processes, demonstrating the post-ischemic reactive gliose phenomenon.

The perspectives of further research in this direction are connected with deepening of understanding of morpho-functional changes in brain at circulatory disorder and also as one of signs for evaluation of severity degree of ischemic damage.

Key words: brain ischemia, S-100 protein.

Надійшла 22.06.2015 року.