УДК:616.831-005.4:612.08:612.017.1

Яременко Л.М.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЗМІН В КОРІ ЛІВОЇ ПІВКУЛІ ВЕЛИКОГО МОЗКУ З НАРОСТАННЯМ ТИТРУ АНТИТІЛ ДО ТКАНИН ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІШЕМІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ У ЩУРІВ

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Резюме. *В експерименті вивчені зміни кори лівої півкулі великого мозку щурів при експериментальному ішемічному інсульті (емболії мікросудин, перев'язуванні сонної артерії та псевдооперовних) та за умов корекції супутніх змін імунної системи імунофаном. Показано, що судинні ураження мозку, незалежно від наявності осередків деструкції (інфарктів) супроводжуються дифузними нейродегенеративними змінами. Імунні механізми безпосередньо сприяють нейродегенративним процесам при судинних ураженнях мозку. Застосування імунофану при емболії мікросудин мозку призводить до зменшення виразності нейродегенеративних процесів та титрів антитіл до тканин головного мозку на всіх строках спостереження. Кореляційні зв'язки між титрами аутоантитіл та клітинним складом кори великих півкуль при порушеннях кровообігу в головному мозку вказують на певну їх взаємозалежність.*

Ключові слова: *мозок, порушення кровопостачання, ішемія, імунофан.*

Церебральний інсульт – одне з актуальних питань сучасної медицини, що пояснюється, як тяжкістю наслідків кожного конкретного випадку хвороби, так і рівнем показників захворюваності, що сягають пандемії [2]. Сучасна медична наука розглядає інсульт, як складний багатовекторний процес, що розвивається у просторі часу, на перебіг якого можна впливати, а не як одноманітну подію, як вважалось 20 і більше років тому [6]. В останній час все більше приділяється уваги вивченню реакції гліальних клітин на пошкоджуючий фактор (травму, ішемію, крововивилив) з розвитком дисбалансу цитокінів і локальної (на рівні ЦНС) запальної реакції, що призводить до ушкодження нейронів, гематоенцефалічного бар'єру і порушення мікроциркуляції [3]. Важливою ланкою в каскаді після ішемічного запалення є аутоімунні реакції до специфічних антигенів мозку. Їх ініціювання є одним з ключових аспектів ушкоджуючої дії цитокінів на мозкову тканину після фокальної ішемії [7].

Метою нашої роботи було вивчення взаємозв'язку змін структури кори великих півкуль головного мозку та титру аутоантитіл до тканинних антигенів головного мозку при моделюванні судинних уражень головного мозку в басейні лівої загальної сонної артерії у щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проведені на 150 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар вагою 260–290 г, які утримувалися на стандартному раціоні в віварії. Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), також керувалися рекомендаціями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985) і положеннями "Правил до клінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP)".

Тварини, використані в досліді, були поділені на 5 груп: 1 група, контроль (К) – тварини, які не зазнавали ніяких дій (n=10); 2 група, псевдооперовані (ПО) – щурам виконувався доступ до лівої загальної сонної артерії й її мобілізація, після чого рану ушивали (n=35); 3 група, з перев'язаною сонною артерією (ПСА) – після доступу до лівої сонної артерії та її мобілізації в неї вводили 0,2 мл фізіологічного розчину та накладали шовкову лігатуру (n=35); 4 група, з мікроемболізацією кровоносних судин лівої півкулі головного мозку (МЕА) – (n=35) [1]; 5 група (МЕА+ім) – тварини з МЕА, які отримували по 0,5 мкг імунофану (НВП "Бионокс", Росія) на 1–10, 21–23, 30–32, 50–51 доби експерименту (n=35). Всі оперативні втручання виконувалися під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Головний мозок та кров (для виділення сироватки) для досліджень забиралися через 1, 3, 10, 30 і 90 діб з початку досліду після введення тваринам тіопенталу натрію (200 мг/кг). У термін до 1 хв проводився розтин черепа щурів, виймався

мозок, який фронтально розрізався на три частини і середня занурювалася у 10 % забуферений формалін pH 7,4 охолоджений до 4°С. Фіксація тривала 24 доби при 4°С. Матеріал ущільнювали в парафін і виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 7 мкм, які забарвлювалися азур II-еозином та фосфорновольфрамовим гематоксиліном за Маллорі. Гістологічні препарати вивчали візуально і морфометрично. У пірамідному шарі сенсомоторної кори кожної дослідної тварини в 10 прямокутних ділянках розміром 350 х 260 мкм визначали питому кількість нейроцитів, питому кількість змінених нейроцитів, питому кількість гліоцитів та вираховували нейро-гліальний індекс.

Титри аутоантитіл (АА) до тканинних антигенів сірої (СР) та білої (БР) речовини головного мозку визначали за допомогою пасивної гемаглютинації за Бойденом [4]. Антигени із тканин головного мозку виділяли за загально прийнятою методикою [5]. При проведенні оцінки змін титру АА використовували логарифмічну шкалу.

Отримані результати обробляли стандартними статистичними методами та проводили кореляційний аналіз за програмою Microsoft Excel.

Результати досліджень

Проведені спостереження показали, що кора лівої півкулі мозку щурів контрольної групи мала звичайну будову. Її пірамідний шар містить велику кількість нейроцитів. Більшість з них має велике округле світле ядро з добре помітним ядерцем. Навколо ядра за звичай виявляється смужка дещо темнішої цитоплазми. Невелика частина нейроцитів забарвлюється гіперхромно. Ядра в них зливалися з цитоплазмою, а дендрити досить часто інтенсивно забарвлювалися на більшому чи меншому протязі. Інколи зустрічалися нейрони, які мали набряклу просвітлену цитоплазму та світле набрякле ядро. Нейропіль мав ніжно волокнистий вигляд. Між нейронами в складі нейропілю визначалися невеличкі за розмірами темні ядра гліоцитів. З 10 щурів контрольної групи мінімальні титри антитіл до тканинних антигенів СР визначалися у 2 тварин, а до БР головного мозку – в 1 особини (Рис. 1). Тому дані результати можна вважати за негативні та рахувати, як контрольний показник.

У щурів ПО через 1 добу після операції в корі лівої півкулі мозку 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 – практично вже не виявлялися. Клітинний склад пірамідного шару кори великої півкулі з боку операції протягом експерименту не зазнавав достовірних змін (Рис. 1).

У ПО тварин (Рис. 2), у відповідь на оперативне втручання, відмічалося зростання титрів АА до тканинних антигенів головного мозку, які сягали максимуму через 30 діб після операції. Через 90 діб досліду вони виявлялися на рівні який достовірно не відрізнявся від контролю.

При ПСА в корі лівої півкулі в ранній післяопераційний період (через 1 і 3 доби після травми) спостерігалося розширення одних кровоносних судин, переважно вен, та спустошення інших. Відзначалися розповсюдженні явища периваскулярного набряку. В деяких кровоносних судинах через 1 і 3 доби після операції виявлялися крайові скупчення лейкоцитів. Серед нейроцитів пірамідного шару через 1–3–10 діб виявлялося достовірно більше гіперхромних нейроцитів, ніж у контролі та ПО. Крім того, починаючи з 10 доби після травми тут визначалося достовірне збільшення кількості гліоцитів (Рис. 1).

При ПСА (Рис. 2.) титри АА до антигенів СР та БР вже через 1 добу після операції перевищували значення ПО в три рази, й у подальші три місяці спостережень поступово зростали. При цьому титри до антигену СР були дещо більшими, ніж до БР.

За умов емболії судин ізольованими адипоцитами в лівій півкулі головного мозку через 1 добу досліду частина судин виявлялася різко розширеною з виразним периваскулярним набряком. Кровоносні капіляри часто щільно заповнені еритроцитами. Місцями спостерігалися пристінкові скупчення лейкоцитів у венозних судинах. Через 1 добу операції в просвіті мікросудин іноді можна було спостерігати емболи, що складалися з жирових крапель. Переваскулярний набряк зберігався через 3 і 10 діб, і навіть навколо деяких венозних судин і через 30 діб після відтворення емболії (Рис. 1).

На фоні виразних судинних змін при МЕА у лівій півкулі через 1 добу після початку досліду виявлялися множинні осередки деструкції. В їх складі нейропіль ставав комірчастим, а нейрони забарвлювалися гіперхромно, деякі з них зазнавали рексису і навколо них виявлялися порожнини перицелюлярного набряку (Рис. 1).

Через 3 доби у складі лівої півкулі в осередках деструкції при МЕА нейропіль ставав крупнокомірчастим. Нейрони були гіперхромні, частина з них зазнавала ретракції і навколо них формувалися більш чи менш чіткі порожнини перецелю-

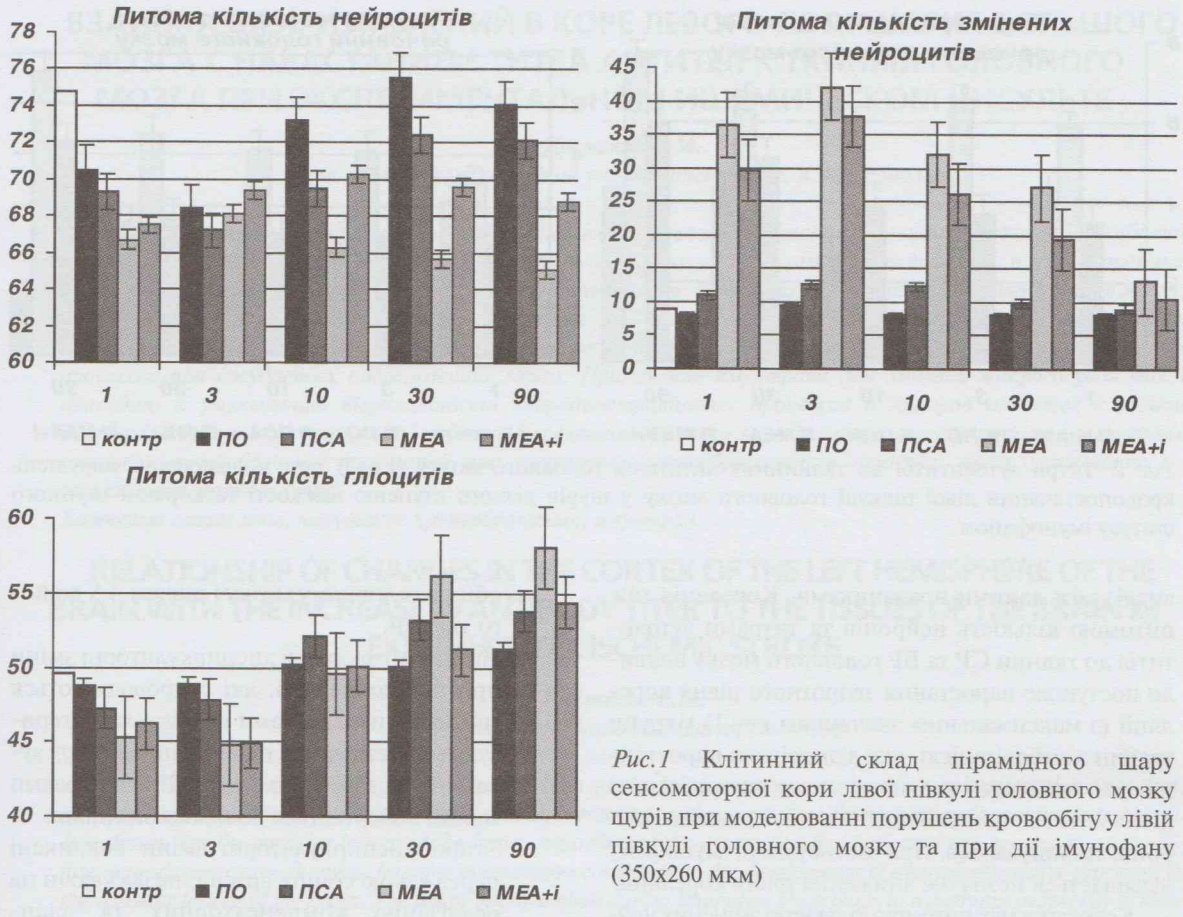

Рис. 1 Клітинний склад пірамідного шару сенсомоторної кори лівої півкулі головного мозку щурів при моделюванні порушень кровообігу у лівій півкулі головного мозку та при дії імунофану (350х260 мкм)

лярного набряку. Частина нейронів навпаки забарвлювалася погано. У невеликій кількості тут виявлялися дрібні клітини з оксифільною зернистою цитоплазмою. До 10 доби після емболії у складі лівої півкулі починали утворюватися порожнини за рахунок злиття комірок у нейропілі, які через 30 діб формували псевдокисти або більш менш щільні гліальні рубці клітин. Останні виявлялися у лівій півкулі й через 90 діб після відтворення емболії (Рис. 1).

У ділянках пірамідного шару кори лівої півкулі мозку, на які не розповсюджувалися деструктивні процеси, спостерігалися виразні масові зміни нейроцитів. За звичай більшість з них виявлялася гіперхромною. Інколи спостерігалося їх ретракція перекаріонов і чіткий перицелюлярной набряк. В таких клітинах за звичай гарно фарбувалися і відростки. Кількість змінених клітин збільшувалася з 1 до 3 доби після емболії, після чого зменшувалося Слід відзначити що за цих умов відбувалося поступове зменшення й питомої кількості нейронів пірамідного шару, і наростала кількість гліоцитів (Рис. 1).

Титри АА до СР так і до БР у щурів, яким проводилася емболія мікросудин лівої півкулі головного мозку, мали наростаючий характер та були достовірно вищими від ПСА (Рис. 2).

Застосування імунофану при МЕА якісно не змінило морфологічної картини, й в складі лівої півкулі також виявлялися виразні зміни судин та осередки деструкції. Але, проведені морфометричні спостереження показали (Табл. 1), що за цих умов починаючи з 1 доби після емболії зменшувалося кількість змінених нейроцитів. Крім того в динаміці експерименту відбувалося менш виразне зменшення питомої кількості нейроцитів пірамідного шару, а кількість гліоцитів, навпаки збільшувалася менш виразно. Все це призвело до того що через 90 діб після початку досліду пірамідний шар кори зазнавав меншої зміни клітинного складу. При цьому титри АА до СР виявлялися суттєво нижчими, ніж у МЕА. Особливо виразно це визначалося через 3 і 10 днів досліду й, у меншому ступені, через 30 і 90 днів. Титри АА до БР за цих умов після пікового значення через 1 добу експерименту не тільки були меншими, ніж у МЕА, а й виявляли чітку зворотну тенденцію – зменшувалися з часом (Рис. 2).

Враховуючи те, що при ушкодженні головного мозку відбувалися зміни в корі великих півкуль з одного боку та наростання аутоантитіл до тканин головного мозку був проведений кореляційний

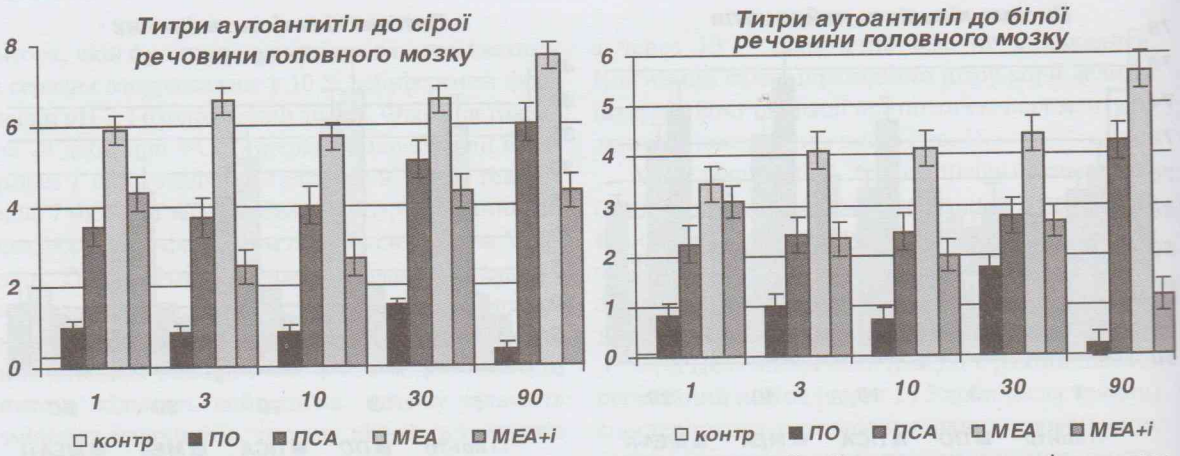

Рис 2. Титри аутоантитіл до тканинних антигенів головного мозку (Log2) при моделюванні порушень кровопостачання лівої півкулі головного мозку у щурів різного ступеню важкості та корекції імунного статусу імунофаном

аналіз між даними показниками. Кореляція між питомою кількість нейронів та титрами аутоантитіл до тканин СР та БР головного мозку виявило поступове наростання зворотного рівня кореляції (з максимальним значенням r=–1) у групи тварин з емболізацією, яка відповідало наростанню ушкодження головного мозку та зростанню рівня антитіл, відповідно до цього, кількість нейронів зменшувалась. При застосуванні імунофану відмічається незначне зниження рівня кореляції.

Кореляція між питомою кількістю змінених нейронів та титрами АА навпаки мала пряму залежність між наростанням титрів АА та кількістю змінених нейронів: чим більше антитіл, тим більше змінених нейронів (Табл. 1). Після застосування імунофану відмічалось зниження кореляції (Табл. 1, 2).

Кореляція між кількістю гліоцитів та рівнем АА до тканин головного мозку була на низькому рівні (Табл. 2). Отже кількість гліоцитів, ймовірно, не залежить від титру аутоантитіл, а знаходиться в прямій залежності від кількості змінених нейронів (Табл. 1).

Висновки

1. Проведені дослідження виявили пряму залежність між важкістю порушення кровообігу в головному мозку і рівнем АА до його тканин.
2. Мінімальні зворотні дисциркуляторні зміни при псевдооперації, які супроводжуються мінімальними змінами у мозку, характеризуються незначним підвищенням титру аутоантитіл, що через 3 місяці після травми майже повертається до похідного рівня.
3. Стійкі дисциркуляторні зміни викликані перев'язкою сонної артерії, незважаючи на реалізацію компенсаторних та адаптаційних процесів, супроводжуються значним зростанням титру АА, який з часом тільки наростає.
4. Альтеративні зміни, обумовлені гострою ішемічною атакою, трансформуються в повільно прогресуючий нейродегенеративний процес, який веде до кількісної зміни клітинного складу – збідніння нейронами та збільшення питомої кількості гліоцитів. Зміни у мозку, що спостерігалися, відбувалися на фоні загальної імуносупресії з відносною активацією гуморальної ланки імунітету з, з підвищенням титру АА, рівень яких з часом зростає.

Таблиця 1.
Кореляційний аналіз клітинного складу пірамідного шару кори головного мозку та титру аутоантитіл до тканин головного мозку у щурів з різним ступенем порушення мозкового кровообігу у басейні лівої сонної артерії

Клітинний склад пірамідного шару кори	Антитіла до Сірої речовини ГМ				Антитіла до Білої речовини ГМ			
	ПО	ПСА	МЕА	МЕА+і	ПО	ПСА	МЕА	МЕА +і
Питома кількість нейронів пірамідного шару	-0	-0,3	-1	-0,9	-0,1	-0,3	-0,8	-0,8
Питома кількість нейронів пірамідного шару	-0,6	0,05	0,46	0,16	-0,3	0,02	0,04	0,74
Кількість гліоцитів пірамідного шару	0,21	0,57	0,26	0,23	-0,2	0,52	0,47	0,5

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЙ В КОРЕ ЛЕВОГО ПОЛУШАРИЯ БОЛЬШОГО МОЗГА С НАРАСТАНИЕМ ТИТРА АНТИТЕЛ К ТКАНЯМ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Яременко Л.М.

Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца

Резюме. *В эксперименте изучены изминения коры левого полушария большого мозга при эмболии микрососудов, перевязывании сонной артерии и ложно оперированных животных, и при корекции сопутствующих изменений иммунной системы имунофаном. Показано, что сосудистые повреждения мозга, независимо от наличия очагов деструкции (инфарктов) сопровождаются диффузными нейродегенеративными изменениями. Иммунные механизмы способствуют развитию нейродегенеративных процессов при сосудистых повреждениях мозга. Применение имунофана при эмболии микрососудов мозга приводит к уменьшению выраженности нейродегенеративных процессов и титров антител к ткани головного мозга на всех этапах наблюдения. Кореляционные связи между титрами аутоантител клеточным составом коры больших полушарий при нарушении кровообращении в головном мозге указывают на зависимость друг от друга.*

Ключевые слова: *мозг, нарушение кровообращения, имунофан.*

RELATIONSHIP OF CHANGES IN THE CORTEX OF THE LEFT HEMISPHERE OF THE BRAIN WITH THE INCREASE IN ANTIBODY TITER TO THE TISSUES OF THE BRAIN IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE

Yaremenko L.M.

O.O. Bohomolets National Medical University

Abstract. *The experiment investigated mutations both of the left hemisphere of the brain microvascular embolism, carotid artery ligation and falsely operated animals, correction, and concomitant changes imunofanom immune system. It is shown that the vascular lesions of the brain, regardless of the destruction foci (infarcts) are accompanied by diffuse neurodegenerative changes. Immune mechanisms contribute to the development of neurodegenerative processes in the vascular lesions of the brain. The use of micro-emboli during Imunofan brain leads to a decrease in severity of neurodegenerative processes and the titers of antibodies to brain tissue at all stages of observation. Correlation between autoantibody titers cellular composition of the cerebral cortex in violation of blood circulation in the brain indicate the dependence on each other.*

Key words: *brain, poor circulation, Imunofan*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Грабовий О.М., Яременко Л.М., Панішина Н.Г. Спосіб моделювання ішемічного пошкодження мозку. Патент на корисну модель № 34604. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 11.08.2008, Бюл. №15,2008 р.
2. Зозуля І. С.,Мошенська О. П. Гострий період ішемічного інсульту: Сучасний погляд на проблему. // Укр.мед. часопис. - 2009. - № 4 (72). - С. 67- 73. вставить по тексту.
3. Луцик Б.Д., Кость А.С. Воспалительная реакция как механизм вторичного повреждения головного мозга при мозговых инсультах. // Лабораторная диагностика. - 2008. - № 3 (45). - С.72-74.
4. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии. - Кишинев: Штиинца, 1982. - 304 с.
5. Руководство по иммунологии. Под редакцией В'язова О.Е., Ходжаева Ш.Х.- М. Издательство Медицина.- 1973. - 392 с.
6. Суслина З. А. Пирадов М. А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. - М.: "МЕДпресс-информ", 2008. - 288с.
7. Bar-Or R.L., Segel L.A. On the role of a possible dialogue between cytokine and TCR-presentation mechanisms in the regulation of autoimmune disease.// J The or Biol. - 1998. V.21. - P.161-178