

Реакція нейроглії на гіперперфузію сенсомоторної кори при сенсibiliзації мозковим антигеном

Яременко Л.М. *, Грабовий О.М., Шепелев С.Є., Стеченко Л.О.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Україна

*E-mail: l.yaremenko03@gmail.com

Ключові слова:

- GFAP
- S-100
- Iba-1

Анотація

За допомогою імуногістохімічних маркерів проводився аналіз реакції нейроглії сенсомоторної кори на гіперперфузію та сенсibiliзацію мозковим антигеном. Дослідження проведені на 115 самцях білих щурів лінії Вістар. Імуногістохімічні реакції проводили у відповідності з протоколами виробника.

Проаналізувавши наші спостереження, можна відзначити, що в цілому, спостерігаються реакції, які дозволяють думати, що виявлені зміни нейроглії виявляють тенденцію до зворотного розвитку при дисциркуляторних порушеннях в мозку у щурів. Це можна пояснити тим, що тварини, які використовуються в експерименті, були практично здорові і володіли високими компенсаторно-приспосувальними потенціями.

Вступ

Переважає більшість наукових робіт про патогенетичні механізми, клітинні реакції в тканинах мозку при його гіперперфузії ґрунтується на експериментальних моделях. В основному моделювали важку церебральну гіперперфузію, зазвичай це двостороння перев'язка сонних артерій [4, 11]. Лише деякі роботи були виконані на легких моделях гіперперфузії мозку, які включали двосторонній стеноз сонних артерій [9, 11] або односторонню перев'язку сонної артерії [10, 14].

Як відомо, тканина мозку в нормі відокремлена від імунної системи гематоенцефалічним бар'єром. Але, від 5 до 92% людей, за даними ряду авторів, у крові присутні протимозкові антитіла, які можуть викликати ушкодження мозку, ініціювати або посилювати неврологічні прояви [2, 6].

Виходячи з цього **ціллю нашої роботи** було за допомогою імуногістохімічних реакцій виявити зміни стану нейроглії при односторонній перев'язці лівої загальної сонної артерії при сенсibiliзації мозковим антигеном.

Матеріали та методи

Дослідження проведені на 115 самцях білих щурів лінії Вістар вагою 260-290 гр. Тварин утримували у виварії по 3-4 особини в клітці на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі і води, і постійним світло-затемненим режимом. Всі досліді проводилися згідно "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". У досліді використовували самців щурів, оскільки рівень естрогенів впливає на перебіг дисциркуляторного ушкодження головного мозку [5].

Щури за випадковим принципом були розділені на 4 групи: група К – контроль, тварини (умовно інтактні), не відчували ніяких дій (n = 10); група Ks – контроль сенсibiliзованих (n = 35); група ПОs – псевдооперовані, щурам виконувався доступ до лівої загальної сонної артерії і її мобілізація, після чого

рана зашивалася з попередньою сенсibilізацією ($n = 35$); групи ПСAs – перев'язка загальної сонної артерії ($n = 35$), щурам здійснювали доступ до лівої загальної сонної артерії і її мобілізацію, накладали на неї лігатуру, а потім рана зашивалася з попередньою сенсibilізацією ($n = 35$). Тварини груп Ks, ПОs і ПСAs за 12 днів до операції були сенсibilізовані 20% водно-сольовим екстрактом (антигеном) гомологічної тканини мозку (вміст білка 0,33 - 0,5 мг / мл по Лоурі) [12]. Щурам підшкірно вводили: в 1-й день - 0,5 мл, 2-й день - 1 мл 3-й день - 1,5 мл екстракту [12].

Оперативні втручання виконували під тіопенталовим наркозом (50 мг / кг). Евтаназію тварин здійснювали за допомогою тіопенталу в овердозі (200 мг / кг).

Головний мозок досліджували через 12 (1), 15 (3), 22 (10), 42 (30), 102 (90) днів після сенсibilізації (оперативного втручання). Після введення овердозу тіопенталу череп щура швидко розкривали, ізолювали мозок, поділяли його на три частини фронтальними перетином. Середня частина занурювалася в 10%-ний забуферений холодний формалін (рН 7.4, 4°C) на 24 години. Зразки ущільнювали в парапласт і виготовляли фронтальні зрізи 4 мкм завтовшки, які фарбували азур II-еозином для оцінки загального стану кори півкуль мозку.

Імуногістохімічні реакції проводили відповідно до протоколів виробника. У роботі були використані первинні антитіла: кроляче поліклональне до білка S100 (Dako, Denmark), готове до використання; кроляче поліклональне до гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) (Dako, Данія), готове до використання; кроляче поліклональне до Iba-1 (Molecular Probes, США), в розведенні 1:750. Продукти реакції візуалізували за допомогою системи детекції EnVision FLEX (Dako, Данія) з діамінобензидіном (DAB).

Отримані препарати вивчали і фотографували за допомогою мікроскопа Olympus BX51, цифрової камери Olympus C3040ZOOM, з програмним забезпеченням Olympus DP-Soft 3.2. Денситометричні вимірювання експресії S100 проводили на цифровому зображенні (x200, x400, 1280x960 пікселів RGB, режим освітлення – фото, стандартна експозиція) за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1.46 (Wayne Rasband (NIH), USA); і підрахунок кількості мічених GFAP і Iba-1 клітин (на площі 430 × 320 мкм) – в п'яти тест-полях 5-го шару сенсомоторної кори лівої півкулі мозку.

Отримані цифрові дані обробляли стандартними статистичними методами з розрахунком середнього арифметичного, стандартного відхилення, помилки середнього, похибки середнього. Для оцінки достовірності відмінностей середніх значень показників між групами використовували t-критерій Стьюдента. Статистично значущими вважали відмінності при $< 0,05$.

Результати та обговорення

Таким чином, проведені дослідження показали, що такі порівняно малі порушення гемоциркуляції в мозку, які виникають при односторонній перев'язці сонної артерії, викликають реакції з боку нейроглії. Причому, навіть такі маніпуляції, як іммобілізація сонної артерії (в нашому випадку ПОs), здатні викликати епізодичні значущі збільшення кількості цих гліальних клітин [13]. Використання імуногістохімічних маркерів дозволяє виявити ці зміни більш повно і раніше, ніж використовуючи загальногістологічні методи [3].

Незважаючи на наявність гематоенцефалічного бар'єру, в крові від 5 до 92% обстежених людей, в анамнезі яких були відсутні судинні мозкові ушкодження, виявляються антитіла до тканинних компонентів мозку [2, 6]. Виконана нами, для моделювання цього явища, сенсibilізація щурів мозковим антигеном не супроводжувалася виразними ознаками неврологічного дефіциту. Однак при цьому відзначалися істотні збільшення вмісту в крові протимозкових антитіл і циркулюючих імунних комплексів [1]. Морфологічно в сенсомоторній корі сенсibilізація приводила до збільшення числа реактивно змінених нейронів протягом першого місяця спостережень і деякого збільшення числа гліоцитів через один і три місяці спостережень [3].

Наші дослідження дозволили виявити достовірне, поступово наростаюче збільшення кількості GFAP+клітин в сенсомоторній корі після сенсibilізації мозковим антигеном. Оцінка кількості клітин мікроглії у Ks показала поступове наростання їх кількості, яке ставало достовірно більшим у порівнянні з K тільки через три місяці після сенсibilізації. Що ж стосується оцінки експресії білка S100, то її значущих кількісних змін в групі ПСAs відзначено не було.

ПО при сенсibilізації також не виявило значущих змін експресії S100. Збільшення числа мічених астроцитів при цьому достовірно не відрізнялося від Ks. Кількість же клітин мікроглії достовірно збільшувалася як у порівнянні з K так і з Ks.

Сенсибілізація значно стимулювала збільшення кількості як астроцитів так і мікроглії в сенсомоторної корі. На певних етапах спостереження вони достовірно були вищими ніж показники при Ks. Також у цих тварин було відзначено достовірне збільшення експресії S100 через 3 (15) днів досвіду в порівнянні з Ks, хоча таке точкове її збільшення і не виглядає в цілому переконливим.

У цілому, спостерігаються реакції дозволяють говорити, що при дисциркуляторних порушеннях в мозку у щурів виявлені зміни астроцитів і мікроглії виявляють тенденцію до зворотного розвитку. Це можна пояснити тим, що тварини, які використовуються в експерименті, були практично здорові і володіли високими компенсаторно-приспосувальними потенціями. У людини ж не можна очікувати подібного зворотного розвитку гліальних реакцій, оскільки гіпопезузія мозку / дисциркуляцію розвивається на тлі змін судинного русла, які як правило ще і прогресують [9, 13]. Відповідно, аналогічні зміни глії мозку у людини виступатимуть як вторинні фактори, що сприяють нейродегенеративних процесів [7].

Висновки

Порівняно невеликі порушення гемоциркуляції в мозку при односторонній перев'язці сонної артерії здатні викликати активацію астроцитів і мікроглії. При цьому реакція астроцитів, що виявляється по експресії GFAP, виявляється більш вираженою ніж Iba 1 + -клітин. Можливо це пов'язано з тісним контактом астроцитів з кровоносними судинами. Значиму роль у змінах глії грає сенсибілізація мозковими антигенами, що розвивається при порушеннях гемоциркуляції в мозку і потенціє ушкодження, викликані нею. При екстраполяції на людину, можна вважати, що сенсибілізація може вносити істотний внесок в розвиток ушкодження мозку при станах, пов'язаних з гіперперфузією.

Література

- [1] Яременко ЛМ, Грабовий ОМ, Бордонос ВГ. Стан титрів аутоантитіл до тканинних антигенів головного мозку та циркулюючих імунних комплексів при моделюванні порушень кровопостачання головного мозку різного ступеню важкості та його корекція. Імунологія та алергологія Київ. 2009; (2-3): 55-59.
- [2] Diamond B, Honig G, Mader S, Brimberg, L, Volpe BT. Brain-reactive antibodies and disease. Annual review of immunology. 201; (331): 345-385. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075041> [PMid:23516983 PMCID:PMC4401150]
- [3] Grabovoy AM, Jaremenko LM. The condition of brain hemisphere cortex at circulation problems modulation and at the correction of accompanying changes in immune system in rats. Naukovyi visnyk of Bohomolets National medical university. 2009; (4): 28-33.
- [4] Gueniot F, Morel JL, Couffignal T, Dupl a C. Development of a mouse model for chronic cerebral hypoperfusion: Analysis of its impact on neurovascular unit and cognitive impairment. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements. 2018; 10 (2): 225-226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2018.02.107>
- [5] Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2000; 20 (4): 631-652. DOI: <https://doi.org/10.1097/00004647-200004000-00001> [PMid:10779008]
- [6] Irani S, Lang B. Autoantibody-mediated disorders of the central nervous system. Autoimmunity, 2008; 41 (1): 55-65. DOI: <https://doi.org/10.1080/08916930701619490> [PMid:18176865]
- [7] Liu Q, Radwanski R, Babadjouni R, Patel A, Hodis DM, Baumbacher P, Mack WJ. Experimental chronic cerebral hypoperfusion results in decreased pericyte coverage and increased blood- brain barrier permeability in the corpus callosum. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2019; 39 (2): 240-250. DOI: <https://doi.org/10.1177/0271678X17743670> [PMid:29192539 PMCID:PMC6365610]

- [8] Manso Y, Holland PR, Kitamura A, Szymkowiak S, Duncombe J, Hennessy E, McColl BW. Minocycline reduces microgliosis and improves subcortical white matter function in a model of cerebral vascular disease. *Glia*. 2018; 66 (1): 34-46. DOI: <https://doi.org/10.1002/glia.23190> [PMid:28722234]
- [9] Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease*. 2016; 1862 (5): 887-900. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.016> [PMid:26705676 PMCid:PMC4821735]
- [10] Nishino A, Tajima Y, Takuwa H, Masamoto K, Taniguchi J, Wakizaka H, Tomita Y. Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model. *Scientific reports*. 2016; 6: 25072. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep25072> [PMid:27116932 PMCid:PMC4846861]
- [11] Sigfridsson E, Marangoni M, Johnson, J A, Hardingham G E, Fowler JH, Horsburgh K. Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 protects against optic tract damage and behavioural alterations in a mouse model of cerebral hypoperfusion. *Scientific reports*. 2018; 8 (1): 12552. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30675-4> [PMid:30135571 PMCid:PMC6105641]
- [12] Yaremenko LM, Grabovoy AN, Shepelev SE. Expression of glial fibrillar acidic protein in the sensorimotor cortex of the cerebral hemispheres in the modeling of transient ischemia against the background of previous sensitization by brain antigen and immunocorrection. *Pathologia*. 2017; 14 (3 (41)): 314-318. DOI: <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2017.3.118741>
- [13] Yaremenko LM, Grabovyi OM. Reactions of Microglial Cells in the Sensorimotor Cortex of Rats after Transient Ischemia. *Neurophysiology*. 2017; 49 (2): 107-112. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9638-6>
- [14] Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, Watanabe A, Tabira T, Takahashi K, Wakita H. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. *Experimental neurology*. 2008; 210 (2): 585-591. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.005> [PMid:18222425]