УДК 616.831-005.4.001.891.57:|616.017.1:57.04

Л. М. ЯРЕМЕНКО[1], О. М. ГРАБОВИЙ[2]

РЕАКЦІЇ IBA-1-ПОЗИТИВНИХ МІКРОГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН У СЕНСОМОТОРНІЙ КОРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ІНДУКЦІЇ ТРАНЗИТОРНОЇ ІШЕМІЇ

Надійшла 26.01.16

Порушення кровопостачання кори за допомогою перев'язки сонної артерії або мікроемболізації судин півкулі мозку адипоцитами призводить до збільшення в ній кількості Iba-1+-мікрогліоцитів, інтенсивність якого залежить від ступеня ішемічного пошкодження. Реакція мікроглії на ішемічне ураження має системний характер, оскільки проявляється і в ділянках кори, які не зазнавали деструктивних (некротичних) змін та знаходяться поза зонами ішемізації. Імуномодулятор імунофан підвищує кількість Iba-1+-мікрогліоцитів у гострий період після транзиторної ішемії, проте у відновлювальний період істотно зменшує їх кількість; це співпадає із сприятливішим перебігом постішемічного процесу в цілому. Останнє можна розглядати як прояв нейропротекторних властивостей імунофану.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мозок, ішемія, мікроглія, Iba-1, імунофан.

ВСТУП

Мікроглія складає основну популяцію імунокомпетентних клітин ЦНС. Мікрогліоцити після ушкодження або при нейродегенераційних процесах секретують фактори росту і про-/протизапальні цитокіни, продукують реактивні форми кисню, оксид азоту (NO) та глутамат [1–3]. Мікроглія бере участь у регуляції синаптичної пластичності [4, 5]. Активована мікроглія після ішемічного інсульту продукує цитокіни, чим посилює процеси загибелі нейронів [6].

Останнім часом виявлення мікроглії в ЦНС проводять за наявністю білка Iba-1. Це кальційзв'язуючий пептид, який є специфічним маркером макрофагів; він присутній у цитоплазмі та ядрах клітин мікроглії. Даний білок задіяний в регуляцію процесів фагоцитозу макрофагами та мікрогліоцитами, в реорганізацію цитоскелета та в зміни конфігурації цитоплазматичної мембрани [7, 8].

В аспектах можливих впливів на процеси нейрозапалення привертає до себе увагу синтетичне похідне тимопоетину – імунофан (аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргінін), який має імунорегулюючі та детоксикаційні властивості. Імунофан інгібує вільнорадикальні процеси і перекисне окиснення ліпідів [9], запобігає пошкодженню лімфоцитів та гранулоцитів [10]. Окрім індукції імунних ефектів, імунофан посилює антиоксидантний захист організму. Це є результатом стимуляції синтезу церулоплазміну і лактоферину та підвищення активності каталази. Паралельно відбувається зниження продукції медіаторів запалення [9, 10]. Цей пептид демонструє досить виражені нейропротекторні властивості [11, 12].

Беручи до уваги все наведене вище, ми намагалися визначити реакції Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин у сенсомоторній корі головного мозку у щурів при моделюванні транзиторних порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості та при імунокорекції наслідків таких уражень з використанням імунофану.

МЕТОДИКА

Дослідження були виконані на 150 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар з масою тіла 260–290 г. Тварин утримували у віварії на стандартно-

[1]Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).
[2]Національний інститут раку МОЗ України, Київ (Україна).
Ел. пошта: angrabovoy@gmail.com (О. М. Грабовий);
l_yaremenko03@gmail.com (Л. М. Яременко).

му раціоні, по чотири тварини у клітці, з вільним доступом до їжі та води та постійним світловим режимом 12/12 год. У дослідах використовували самців щурів, оскільки рівень естрогенів істотно впливає на перебіг ішемічного ушкодження головного мозку [13]. Тварини були поділені на п'ять груп. У групу 1 входили контрольні тварини (К), які не зазнавали ніяких дій (n = 10). Група 2 складалась із псевдооперованих тварин (ПО); у них забезпечували оперативний доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізацію, але судину не перев'язували, після чого рану зашивали (n = 35). Щурам групи 3 (ПСА) перев'язували ліву сонну артерію; в цю судину вводили 0.2 мл фізіологічного розчину, після чого на неї накладали шовкову лігатуру (n = 35). Щурам групи 4 (МЕА) проводили мікроемболізацію кровоносних судин лівої півкулі головного мозку за допомогою ін'єкції суспензії ізольованих адипоцитів (n = 35) [14]. П'яту групу (МЕАі) складали тварини з МЕА, яким підшкірно вводили по 0.5 мкг імунофану (НВП «Бионокс», РФ) на перший–10-й, 21–23-й, 30–32-й та 50–51-й дні 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).

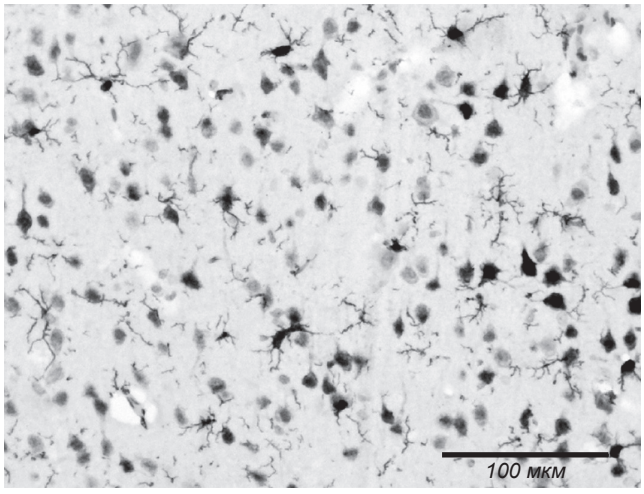
Головний мозок для досліджень забирали через одну, три, 10, 30 і 90 діб після початку досліду; тварин анестезували тіопенталом натрію в овердозі (200 мг/кг). Протягом не більше 1 хв розтинали череп, виймали мозок, який фронтально розрізали на три частини. Середню частину занурювали у 10 %-вий забуферений формалін (pH 7.4; 4 °C, 24 год). Матеріал ущільнювали, заливали в парафін і виготовляли гістологічні зрізи 4 мкм завтовшки, які забарвлювали азур II-еозином та в яких проводили імуногістохімічну реакцію з антитілом до Iba-1 (rabbit polyclonal, 1:750; «Molecular Probes», США) відповідно до протоколу виробника. Для візуалізації продуктів реакції використовували систему детекції EnVision™ FLEX («Dako», Данія). Зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Гілла. Як позитивний контроль використовували зразки мозку щурів з визначеною позитивною реактивністю; для негативного контролю проводили всі процедури, за виключенням застосування первинних антитіл.

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 («Nikon», Японія) в стандартних умовах. На отриманих зображеннях підраховували кількість Iba-позитивних (Iba-1+) клітин у п'яти тест-полях (430×320 мкм) гангліонарного шару кори лівої та правої півкуль. Отримані цифрові дані обробляли із застосуванням стандартних статистичних методів.

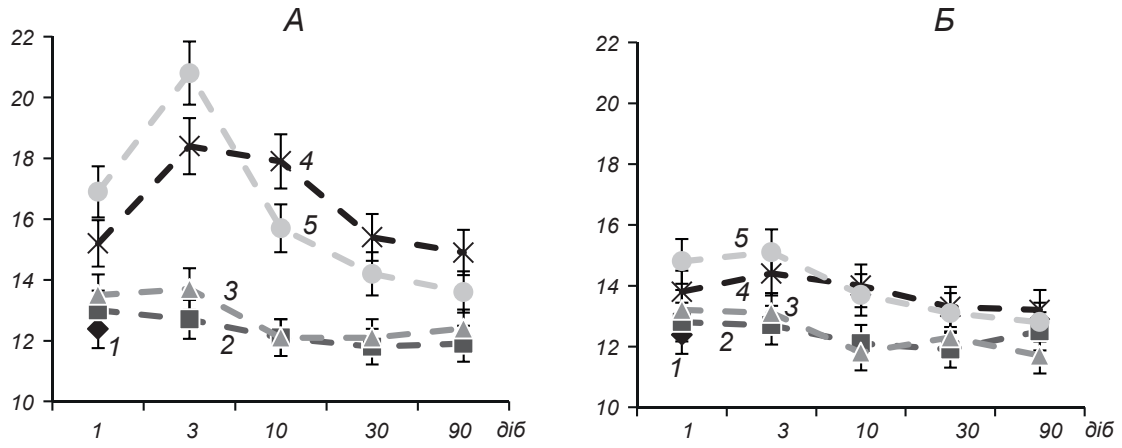
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені спостереження показали, що кора півкуль мозку щурів контрольної групи має звичайні характеристики. Виявлені Iba-1+-клітини (рис. 1) мали невеликі ядра та тонкі відростки характерної для мікрогліоцитів будови (невелику кількість слабо розгалужених відростків, від яких відходять тоненькі гілочки). Інколи ці клітини по периметру прилягали до кровоносних мікросудин або нейронів.

У щурів груп ПО та (в більшій мірі) ПСА в корі лівої півкулі певна частина кровоносних мікросудин (перш за все капілярів) були розширені, спостерігався незначний або помірний периваскулярний набряк. Ці зміни через 10 днів досліду практично зникали. Серед нейроцитів гангліонарного шару кори лівої півкулі щурів групи ПСА через одну–три–10 діб виявлялося дещо більше змінених клітин, ніж у контролі та правій півкулі, а з 30-ї доби після травми тут спостерігалося деяке збільшення кількості гліоцитів. У ПО-тварин Iba-1+-клітини візуально не зазнавали змін. Після ПСА через одну і три доби досліду відмічалося деяке збільшення тіл



Р и с. 1. Iba-1-позитивні мікрогліальні клітини в сенсомоторній корі інтактного щура.
Імуногістохімічна реакція, забарвлення гематоксиліном.



Р и с. 2. Динаміка кількості Iba-1-позитивних мікрогліоцитів при порушеннях церебрального кровообігу різного ступеня.
По осі абсцис – термін вимірювання, діб; по осі ординат – середня кількість Iba-1-+-одиниць у тест-зонах. А – ліва півкуля (ділянки кори, які не зазнали безпосередніх деструктивних змін). *Б* – права півкуля. *1* – контроль (умовно інтактні тварини); *2* – тварини із псевдооперацією; *3* – тварини з перев'язкою лівої сонної артерії; *4* – тварини з мікроемболізацією судин півкулі адипоцитами; *5* – тварини з мікроемболізацією, які отримували ін`єкції імунофану.

мічених мікрогліоцитів та товщини їх відростків. Кількісна оцінка показала, що після ПО і навіть ПСА збільшення кількості Iba-1+-мікрогліоцитів в корі з боку ураження не було статистично вірогідним (рис. 2).

В умовах проведення МЕА в корі ураженої півкулі виникали досить очевидні деструктивні та дегенераційні зміни. Вони проявлялись як формування невеликих осередків некрозів (діаметр 50–300 мкм) приблизно у п'ятої частини тварин. На місці таких осередків у віддалені строки формувалися гліальні рубці. В одної особини через 30 діб і в одної через 90 діб були виявлені псевдокісти, що займали майже всю товщу кори півкулі. В інших ділянках кори спостерігалися дегенераційні зміни нейронів, що призводило в подальшому до зменшення їх кількості (щільності). Останнє супроводжувалося дифузним зростанням кількості гліоцитів [15].

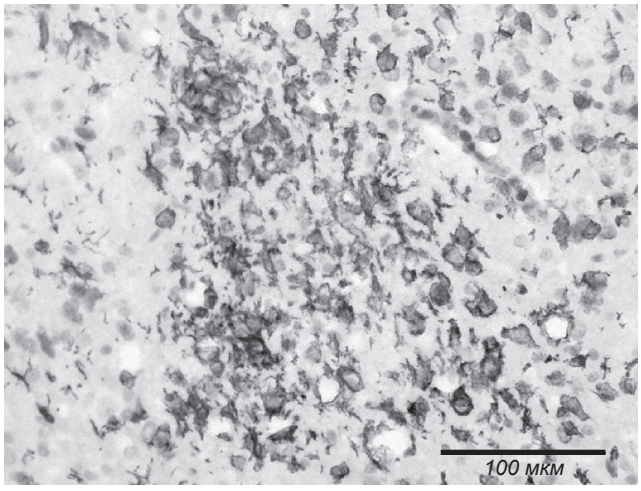
Результати імуногістохімічного дослідження показали, що в лівій півкулі мозку після МЕА на першу і третю, а в меншій мірі на 10-ту добу досліду в ділянках інфарктів була різко збільшена кількість Iba-1+-клітин (рис. 3). При цьому більша або менша їх частина втрачали відростки і набували округлої форми. У більшості таких зон лівої півкулі рівень експресії Iba-1 виявився меншим, ніж в інших ділянках кори.

За межами осередків деструкції через один, три і 10 днів після МЕА відмічали помітне збільшення кількості Iba-1+-клітин (рис. 2; 4). При цьому останні мали більші, ніж в контролі, розміри тіл та товстіші відростки. Через 30 діб після початку експерименту на боці ураження кількость клітин мікроглії була меншою порівняно з такою в попередні терміни спостереження. Проте навіть наприкінці досліду (90 днів) даний показник залишався більшим, ніж у контролі (рис. 2). У поодиноких гліальних рубцях, які сформувалися на місці невеликих осередків інфарктів, а також у стінках псевдокіст, які утворилися на місці великих інфарктів, виявлялася значна кількість Iba-1+-клітин, часто гіпертрофованих та з великою кількістю відростків.

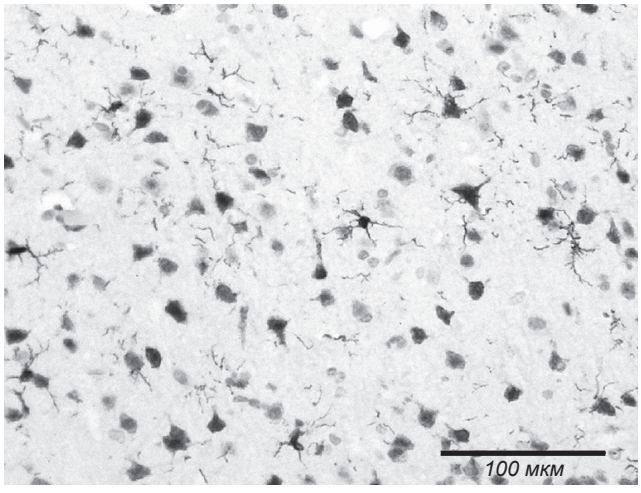
У контралатеральній (правій) півкулі (рис. 2) спостерігалося незначне, але вірогідне збільшення кількості Iba-1+-клітин через одну, три і 10 діб після МЕА. Після цього даний показник зменшувався, і різниця щодо контролю ставала невірогідною.

В умовах МЕАі через одну і три доби досліду на ураженому боці відмічалося вірогідно більше зростання кількості Iba-1+-клітин, ніж при МЕА (рис. 2; 5). У більшості випадків такі одиниці відзначалися інтенсивнішою експресією Iba-1. Через 10 діб експерименту, проте, кількість подібних клітин ставала вірогідно меншою, ніж у групі МЕА. Ця тенденція зберігалась і на 30-ту та 90-ту доби експерименту, хоча міжгрупова різниця (МЕАі vs. МЕА) не досягала рівня статистичної значущості.

Таким чином, результати проведених експериментів показали, що порушення кровотоку в церебральній півкулі призводить до збільшення кількості клітин Iba-1+-мікроглії в корі головного



Р и с. 3. Накопичення Iba-1-позитивних клітин у зоні інфаркту в сенсомоторній корі лівої півкулі через три дні після мікроемболізації.
Імуногістохімічна реакція, забарвлення гематоксиліном.



Р и с. 4. Збільшення кількості Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин у сенсомоторній корі лівої півкулі через три дні після мікроемболізації.
Імуногістохімічна реакція, забарвлення гематоксиліном.

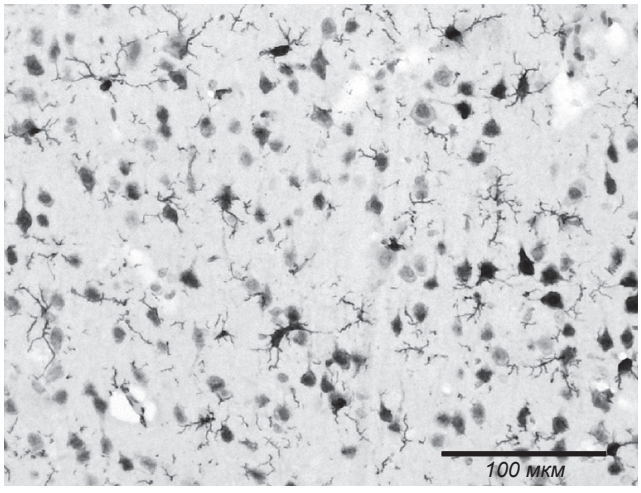
мозку. Виразність цього явища залежить від ступеня ішемічного пошкодження, що цілком очікувано [16].

Найбільш значне збільшення кількості мікроглії спостерігалося в осередках кортикальних інфарктів у гострий період ішемії. Тут багато мікрогліоцитів втрачали свої відростки і набували кулястої форми. У відновлювальний період кількість таких клітин у гліальних рубцях та капсулах псевдокіст поступово зменшувалась, а з 30-ї доби вони набували своєї звичайної форми (з численними відростками).

У ділянках кори, які не зазнали деструктивних змін при транзиторній ішемії, щільність мікроглії в гострий період також різко зростала. Потім цей показник знижувався, хоча навіть через 90 діб він залишався більшим, ніж у контролі. Беручи до уваги в цілому негативний вплив нейрозапалення на відновлювально-компенсаторні процеси, це можна розглядати як несприятливий феномен [17, 18]. Останнє твердження не є однозначним. Є дані, що мікроглія, продукуючи протизапальні цитокіни, здатна пригнічувати запалення [19, 20], а також попереджати апоптоз нейронів; функціонування мікроглії необхідне для процесів відновлення [16]. Баланс згаданих явищ може залежати від ступеня ішемічного ушкодження та загальної спрямованості компенсаторно-відновлювальних процесів.

Звертає на себе увагу зростання кількості клітин Iba-1+-мікроглії в контралатеральній півкулі, що не можна пояснити виключно дисциркуляторними змінами внаслідок перев'язування лівої сонної артерії. Тут ми, вірогідно, стикаємось із системними змінами, які можуть реалізовуватися за рахунок імунних регуляторних впливів на ці клітини [12, 21, 22].

Введення імунофану вірогідно підвищує кількість Iba-1+-мікроглії на боці ураження в гострий період після транзиторної ішемії та зумовлює



Р и с. 5. Різке збільшення кількості Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин у сенсомоторній корі лівої півкулі через три дні після мікроемболізації в умовах дії імунофану.
Імуногістохімічна реакція, забарвлення гематоксиліном.

тенденцію до збільшення відповідного показника в контралатеральній півкулі. У відновлювальний період, починаючи вже з 10-ї доби експерименту, вплив імунофану призводить до значного зменшення кількості детектовних клітин мікроглії; це корелює зі сприятливішим перебігом постішемічного процесу в цілому. Даний феномен співпадає з відносно менш виразним зменшенням кількості Т-лімфоцитів, у тому числі й Т-хелперів [12, 21, 22]. Активація Т-регуляторних клітин виступає як один з істотних нейропротекторних факторів, що запускаються після ішемії [21, 22]. Кількість таких клітин зростає під впливом імунофану [9–12]. Разом з тим, вірогідно, не можна виключити можливості безпосереднього впливу імунофану на мікроглію.

Таким чином, порушення кровопостачання кори великих півкуль головного мозку призводить до збільшення в ній кількості клітин Iba-1+-мікроглії. Інтенсивність таких зрушень залежить від ступеня ішемічного пошкодження. Реакція мікроглії на ішемічне ураження має системний характер, оскільки проявляється і в ділянках кори, які не зазнають деструктивних (некротичних) змін і розташовані поза зонами ішемії.

Імунофан підвищує кількість елементів Iba-1+-мікроглії в гострий період після транзиторної ішемії, але у відновлювальний період його дія призводить до істотного зменшення кількості детектовних клітин мікроглії. Це корелює зі сприятливішим перебігом постішемічного процесу в цілому. Останнє можна розглядати як прояв нейропротекторних властивостей імунофану.

Експерименти на тваринах проводились у відповідності з положеннями Хельсинкської Декларації 1975 р., переглянутої та доповненої в 2000 р., положеннями Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших цілей (Страсбург, 1985), та директивами Національних Комітетів з етики наукових досліджень; проведення експериментів було погоджено з Комісією з питань етики Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця МОЗ України.

У авторів – Л. М. Яременко та О. М. Грабового – відсутні будь-які конфлікти 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. M. L. Block and J. S. Hong, "Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism," *Prog. Neurobiol.,* **76**, 77-98 (2005).
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**, 132-146 (2009).
3. 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," *JPET,* **341,** No. 1, 59-67 (2012).
4. H. Wake, A. J. Moorhouse, and S. Jinno, "Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals," *J. Neurosci.*, **29**, 3974-3980 (2009).
5. M. W. Salter and S. Beggs, "Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS," *Cell*, **158**, No. 1, 15-24 (2014).
6. Q. Wang, X. N. Tang, and M. A. Yenari, "The inflammatory response in stroke," *J. Neuroimmunol.,* **184**, 53-68 (2007).
7. M. Platten, A. Kretz, U. Naumann, et al., "Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas," *Ann. Neurol*., **54** (3), 388-392 (2003).
8. K. Ohsawa, Y. Imai, Y. Sasaki, et al., "Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fibrin and enhances its actin-bundling activity," *J. Neurochem.,* **88**, 844-856 (2004).
9. В. В. Лебедев, С. А. Новиков, "Гидрофильный гексапептид имунофан – 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 имунофана 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", *Забайк. мед. вест.,* № 2, 42-45 (2008).
12. 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).
13. P. D. Hurn and I. M. Macrae, "Estrogen as a neuroprotectant in stroke," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **20**, 631-652 (2000).
14. 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.
15. 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. нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*, № 4, 28-33 (2009).
16. M. Lalancette-Hébert, V. Swarup, J. Beaulieu, et al., "Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury," *J. Neurosci.,* **32**, No. 30, 10383-10395 (2012).
17. R. Gregersen, K. Lambertsen, and B. Finsen, "Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor

in permanent middle cerebral artery occlusion in mice," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **20**, No. 1, 53-65 (2000).
18. T. Shichita, R. Sakaguchi, M. Suzuki, et al., "Post-ischemic inflammation in the brain," *Front. Immunol.,* **31**, No. 3, 132 (2012).
19. F. De Bilbao, D. Arsenijevic, T. Moll, et al., "*In vivo* over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice," *J. Neurochem.*, **110**, No. 1, 12-22 (2009).
20. E. Parada, J. Egea, I. Buendia, et al., "The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2," *Antioxidants Redox Signal.,* **19**, No. 11, 1135-1148 (2013).
21. 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).
22. 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).