

**А. В. Смирнов^{1,2}, Д. С. Медников¹, И. Н. Тюренков¹,
Д. В. Куркин¹, Е. В. Волотова¹, Д. А. Бакулин¹**

¹ Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра патологической анатомии,
кафедра фармакологии и биофармации ИНМФО;

² Волгоградский медицинский научный центр, лаборатория морфологии,
иммуногистохимии и канцерогенеза

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ AIF В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ СТЕНОЗА ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

УДК:616-005.4:611.813.14:616-092.9

Представлены результаты иммуногистохимического исследования маркера каспазо-независимого апоптоза AIF в пирамидном слое гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий. Достоверное усиление экспрессии выявлено в зонах CA1 и CA3 как в увеличении относительной площади иммунореактивного материала, так и в интенсивности реакции. Морфометрическое исследование выявило достоверное увеличение удельного количества поврежденных нейронов в зонах CA1 и CA3.

Ключевые слова: гиппокамп, стеноз сонных артерий, апоптоз, AIF, крыса.

A. V. Smirnov, D. S. Mednikov, I. N Tyurenkov, D. V. Kurkin, E. V. Volotova, D. A. Bakulin

AIF EXPRESSION LEVEL IN A HIPPOCAMPUS OF RATS IN THE EXPERIMENTAL MODELING OF CAROTID OCCLUSION

Here we present the results of immunohistochemical study of caspase-independent marker of apoptosis AIF in a pyramidal layer of a hippocampus of rats in the carotid occlusion experimental modelling. The level of AIF expression veraciously increased in CA1 and CA3 both in the relative area of immunopositive material and in intensity of reaction. Besides, morphometric study demonstrates destructive and adaptive changes of pyramidal neurons, signs of both reversible and irreversible neuronal injury in pyramidal layer and significant increase in the number of defective neurons within CA1 and CA3.

Key words: hippocampus, carotid stenosis, apoptosis, AIF, rat.

Несмотря на значительные успехи в изучении, цереброваскулярные болезни (ЦВБ) остаются на сегодняшний день во многом нерешенной задачей. Постоянно растущая заболеваемость основными факторами риска, такими как артериальная гипертензия в сочетании с церебральным атеросклерозом обуславливают необходимость поиска новых, а также улучшения уже имеющихся подходов к диагностике, лечению и реабилитации больных ЦВБ [1, 2]. Учитывая частое развитие дисциркуляторной энцефалопатии различной степени тяжести, вплоть до деменции, при прогрессирующих хронических формах ЦВБ, особенную актуальность приобретает исследование закономерностей и особенностей повреждения структур головного мозга, отвечающих за когнитивные навыки [2, 3]. Несомненно, наиболее перспективным направлением изучения является исследование ранних прогностически значимых маркеров нейронального повреждения и

гибели. В современной литературе описано множество путей нейрональной смерти при различных повреждениях, в том числе при ишемии, при этом нет строгой специфичности в выборе клеткой того или другого механизма и внутриклеточные взаимодействия на разных этапах могут как останавливать процесс, так и переключать его на другой путь реализации [4]. В последние годы все больший интерес привлекает исследование механизмов каспазо-независимого апоптоза, реализуемого при участии AIF (apoptosis inducing factor, апоптоз-индуцирующий фактор). AIF-опосредованная нейрональная смерть – уникальный механизм, имеющий также название партанатоз – разновидность регулируемой клеточной гибели, которая зависит от активности PARP (poly-ADP-ribose polymerases, поли-АДФ-рибоза полимерызы) [4, 5]. PARP обуславливает перемещение митохондриального AIF к ядру, где происходит дальнейшая деградация хроматина и апоптози-

ческая гибель нейрона без участия эффекторных каспаз [5, 6]. Изучение AIF тем более актуально в свете большого разнообразия вариантов нейрональной смерти, ограниченной возможности регистрировать каспаз-зависимые формы апоптоза, а также имеющихся сообщений об исключительном участии AIF при некоторых формах ЦВБ [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Качественными и количественными методами описать особенности экспрессии AIF в пирамидном слое гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 25 белых аутбредных крысах-самцах (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область) в возрасте 7–8 месяцев. Животные были разделены на две группы: 1-я – контрольные крысы ($n = 10$), 2-я – крысы с моделируемым нарушением кровообращения ($n = 15$). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Стеноз общих сонных артерий моделировался путем частичного ограничения кровотока с помощью наложения лигатур. Наркотизированное животное (хлоралгидрат, интраперитонеально, 400 мг/кг) фиксировали, область шеи выбривали, обрабатывали 0,05%-м раствором хлоргексидина биглюконата. Далее выделяли сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом, который орошали 2%-м раствором лидокаина. После выделения сонной артерии под нее подводили три лигатуры, располагаемые на расстоянии 2–3 мм друг от друга. Параллельно артерии закрепляли иглу (29G 1/2) от шприца (SFM Hospital Products GmbH, Германия), к которой привязывалась сонная артерия и которая затем убиралась таким образом, чтобы лигатуры оставались на заданном расстоянии. В результате описанных выше манипуляций кровотока по сонным артериям ограничивался в головном мозге на 40–50 % от изначальных значений. Оценку уровня локального кровотока (ЛМК, у. е.) осуществляли до и после стенозирования сонной артерии в двух точках, в месте сразу после наложения лигатур и в проекции средней мозговой артерии. После операции рану послойно ушивали, обрабатывали 0,05%-м раствором хлоргексидина биглюконата и 5%-м раствором йода, животных переносили в домашние клетки.

Через 20 дней после операции оценивалось психоневрологическое состояние, сохранность рефлексов и поведение и двигательная активность. На 22-е сутки животные выводились из эксперимента с применением в качестве наркотика хлоралгидрата (400 мг/кг, интраперитонеально), декапитировали гильотинным методом («Гильотина для крыс» АЕ0702, производитель «Open Science»), получали образцы головного мозга. Образцы головного мозга животных фиксировали в 10%-м растворе формалина, приготовленном на 0,2 mM фосфатном буфере с дальнейшей гистологической проводкой и изготовлением серийных парафиновых срезов толщиной 5 мкм, которые окрашивали по стандартным методикам гематоксилином и эозином, тионином по Нисслю. Иммуногистохимическое исследование проводили непрямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием поликлональных антител к AIF (1:100) согласно протоколу производителя, с использованием полимерной системы (Thermo Scientific, Fremont, CA). В качестве хромогена использовали DAB (диаминобензидин).

Оценку изменения уровня экспрессии определяли путём подсчёта относительной площади иммунопозитивного материала (ИМ), а также интенсивности реакции в соответствии с 4-балльной адаптированной шкалой Allred (0 – отсутствие реакции, 1 – слабая интенсивность, 2 – умеренная интенсивность, 3 – выраженная интенсивность) во всех зонах гиппокампа с использованием модуля Image Analysis программы ZEN 1.1.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Обобщенные данные представляли в виде медианы (Me) с указанием интерквартильного интервала [Q1;Q3]. Различия между группами оценивали по критерию Манна – Уитни (Mann – Whitney, U-test) и считали статистически значимыми при $p < 0,05$, о тенденции говорили при диапазоне $0,05 < p < 0,06$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании гиппокампа крыс 2-й группы наиболее выраженные изменения были обнаружены в пирамидном слое зоны CA1, где выявлено достоверное

увеличение удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения на 23 % по сравнению с контролем ($p < 0,001$) (см. табл.). Среди поврежденных нейронов доминировали гиперхромные, часть из которых сочетала в себе как гиперхромную ядра и цитоплазмы, так и деформацию перикариона. Сосудистые нарушения проявлялись умеренным периваскулярным отеком и эритроцитарными стазами в просветах микроциркуляторных сосудов. Иммуногистохимическое исследование зоны CA1 с применением антител к AIF выявило достовер-

ное усиление экспрессии как в увеличении относительной площади иммунопозитивного материала на 3,1 % ($p < 0,001$) (рис. 1), так и в степени экспрессии по сравнению с 1-й группой. У контрольных животных степень экспрессии достигала 1 балла, тогда как в группе с моделируемым стенозом сонных артерий увеличивалась до 2 баллов (см. табл.). Иммунопозитивный материал носил равномерное мелкоглобулярное цитоплазматическое распределение в виде узкого ободка вокруг ядер перикарионов пирамидных нейронов (рис. 2).

Динамика изменения удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения и изменение параметров экспрессии AIF-позитивного материала в пирамидном слое гиппокампа крыс с моделируемым стенозом общих сонных артерий

Параметр	Контроль				Моделируемый стеноз общих сонных артерий			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Удельное количество нейронов с признаками повреждения, %	8,2 [6,8;9,7]	6,8 [4,5;8,9]	6,3 [4,6;9]	4,4 [2,9;7,0]	31,2 [22,4;41]***	10,2 [7,1;18]	15 [8,2;22,1]**	7,7 [3;10,2]
Относительная площадь ИРМ, AIF, %	4,1 [3,5;4,4]	2,9 [1,8;3,4]	4,7 [4;5,5]	3 [2,3;3,5]	7,2 [5,8;7,9]***	4,1 [3,2;4,5]	7,5 [6,3;8,1]***	3,3 [2,9;3,8]
Интенсивность ИРМ, AIF, баллы	+	+	+	+	++	+	++	+

Примечание. ** – $p < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой; *** – $p < 0,001$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна – Уитни).

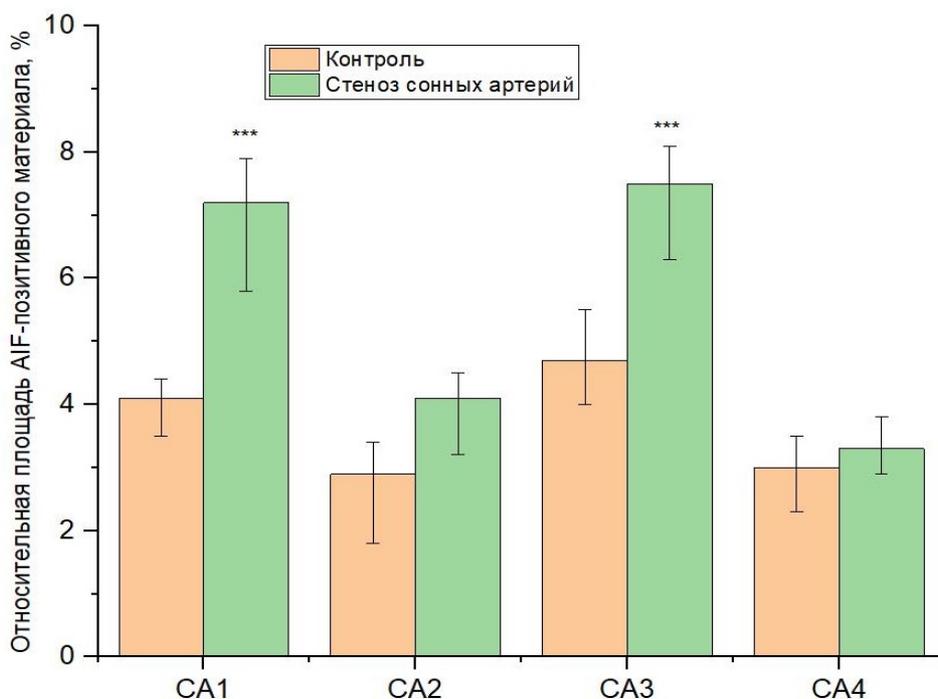


Рис. 1. Изменение относительной площади AIF-позитивного материала при моделировании стеноза общих сонных артерий:

*** – $p < 0,001$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна – Уитни)

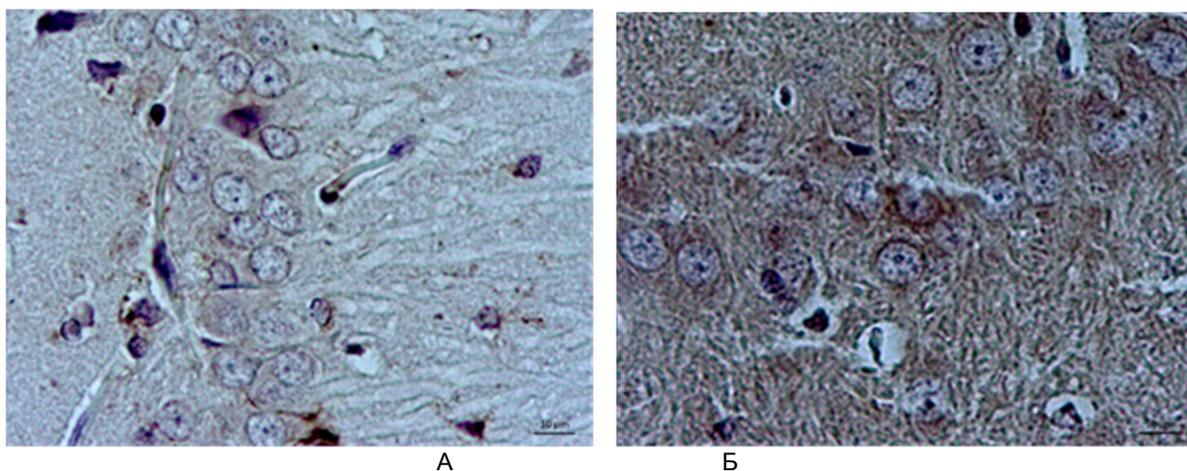


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование СА1 зоны гиппокампа крыс с применением антител против AIF: А – контрольная группа; Б – группа крыс с моделируемым стенозом общих сонных артерий, увеличение площади и усиление интенсивности ИРМ. Ув. х 400, докраска гематоксилином

Гистологическое исследование зоны СА2 гиппокампа крыс 2 групп не выявило достоверных отличий от контроля в удельном количестве нейронов с признаками повреждения. Встречались отдельные нейроны с комбинированной гиперхромией ядра и цитоплазмы и сморщенными перикарионами. При иммуногистохимическом исследовании с применением антител к AIF зоны СА2 крыс 2-й группы достоверных отличий от контроля не выявлено ни в относительной площади иммунопозитивного материала, ни в степени экспрессии, оставшейся на уровне 1 балла.

При гистологическом исследовании зоны СА3 гиппокампа крыс 2-й группы выявлено достоверное увеличение удельного количества пирамидных нейронов с признаками повреждения на 8,7 % по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (см. табл.). Как и в зонах СА1 и СА2, для СА3 было характерно преобладание гиперхромных или гиперхромных в сочетании с пикноморфно деформированными перикарионами пирамидных нейронов. Нарушения гистархитектоники в данной зоне также проявлялось в умеренных сосудистых нарушениях. При иммуногистохимическом исследовании пирамидного слоя зоны СА3 обнаружено достоверное усиление экспрессии AIF-позитивного материала на 2,8 % по сравнению с 1-й группой ($p < 0,001$) (рис. 1). Кроме того, отмечено изменение степени экспрессии с преимущественно слабой (1 балл) в контрольной группе до умеренной (2 балла) в группе крыс с моделируемым стенозом сонных артерий (см. табл.).

При гистологическом исследовании зоны СА4 пирамидного слоя гиппокампа крыс 2-й группы достоверных отличий от 1-й группы в удельном количестве нейронов с признаками

повреждения не обнаружено. При качественном исследовании обнаружены умеренный перичеллюлярный и периваскулярный отек, а также отдельные тотально гиперхромные нейроны в сочетании со сморщиванием перикариона. При иммуногистохимическом исследовании с применением антител к AIF пирамидного слоя зоны СА4 крыс из 2-й группы достоверных отличий от контроля не выявлено как в значениях относительной площади иммунопозитивного материала, так и в степени экспрессии, которая оставалась слабо выраженной (1 балл).

Обнаруженное нами достоверное увеличение удельного количества нейронов с признаками повреждения в зонах СА1 и СА3 свидетельствует, на наш взгляд, о большей уязвимости данных зон к длительной ишемии, вызванной стенозированием сонных артерий по сравнению с зонами СА2 и СА4. Так, признаки компенсаторно-приспособительных процессов в виде изменения формы и размеров перикарионов пирамидных нейронов, также как и изменения в микроциркуляторном русле, были характерны и равномерно выражены для всех зон, при этом признаки обратимо и необратимо поврежденных пирамидных нейронов значительно усиливались лишь в зонах СА1 и СА3, что соотносится с литературными данными, где сообщается о более выраженных изменениях именно в этих областях гиппокампа при различных воздействиях, в том числе при ишемии [7, 8]. Кроме того, необходимо отметить, что нами была выявлена межполушарная асимметрия повреждений гиппокампа, при сопоставимых по выраженности сосудистых нарушениях в виде умеренного перичеллюлярного и периваскулярного отека как в левом, так и в правом гиппокампе, количественные морфо-

метрические параметры более выражено изменялись в правом.

В ряде работ [7, 9] сообщается о неравномерной выраженности повреждений гиппокампа правого и левого полушарий, что связывают с индивидуальными особенностями сосудистой системы и подобную асимметрию выявляют у крыс с менее активным типом поведения. Сообщается о разной степени васкуляризации зон СА1 и СА3 по сравнению с зонами СА2 и СА4, а также вариабельности относительной площади сосудов микроциркуляторного русла в гиппокампе левого и правого полушарий, с чем, по-видимому, связаны менее выраженные компенсаторные способности зон СА1 и СА3 правого гиппокампа в условиях персистирующего отека, нарастающей гипоксии и эксайтотоксического повреждения. Важную роль в процессах повреждения, более характерных для зон СА1 и СА3, на наш взгляд, играет каспаз-независимый путь активации апоптоза, с чем мы связываем достоверное усиление экспрессии маркера AIF-опосредуемой клеточной гибели в этих зонах у крыс с моделируемым стенозом сонных артерий. Необходимо отметить, что существует два внутриклеточных пула AIF: митохондриальный и цитозольный [6]. Высвободившийся из митохондрий и транслоцируемый при участии PARP к ядру клетки, AIF может расцениваться как уже запустивший необратимую деградацию хроматина и подобное повреждение считается необратимым [4, 6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном моделировании стеноза сонных артерий в пирамидном слое гиппокампа крыс отмечается достоверное усиление экспрессии AIF в зонах СА1 и СА3 в сочетании с достоверным увеличением количества поврежденных нейронов, что свидетельствует о большей уязвимости этих зон к длительной ишемии и большей выраженности процессов как обратимого, так и

необратимого повреждения по сравнению с зонами СА4 и СА2.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артюхина, Н. И.* Межполушарная асимметрия повреждений гиппокампа после двусторонней перевязки общих сонных артерий [Текст] / Н. И. Артюхина, К. Ю. Саркисова // Российский физиологический журнал. – 2004. – Т. 90, № 2. – С. 146–156.
2. Морфометрическое исследование гиппокампа правого полушария крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии. [Текст] / А. В. Смирнов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2016. – Т. 52, № 4. – С. 7–11.
3. Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика [Текст] / З. А. Суслина [и др.]. – М. : Медпресс-информ. – 2016. – 536 с.
4. Определение белков наружной мембраны митохондрий, взаимодействующих с белком AIF Acta Naturae [Текст] / Н. П. Фадеева [и др.]. – 2018. – Т. 10, № 4. – С. 100–109.
5. Особенности экспрессии Beclin-1 и LAMP-2 в гиппокампе крыс при гравитационном воздействии в каудо-краниальном векторе [Текст] / А. В. Смирнов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165, № 1. – С. 122–126.
6. Особенности экспрессии HSP70, HSP90 и GFAP в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии [Текст] / А. В. Смирнов [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – Т. 22, № 2. – С. 59–64.
7. *Шаповалова, В. В.* Структурно-функциональная реорганизация гиппокампа правого и левого полушарий и функциональная межполушарная асимметрия в постреанимационном периоде [Текст] / В. В. Шаповалова, В. В. Семченко // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 169–173.
8. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [Text] / M. S. D'Arcy // Cell. Biol. Int. – 2019. – Vol. 43, № 6. – P. 582–592.
9. Neuronal cell death [Text] / M. Fricker [и др.] // Physiol. Rev. – 2018. – Vol. 98, № 2. – P. 813–880.