

**А. В. Смирнов^{1,2}, Д. С. Медников¹, М. В. Шмидт^{1,2},
М. Р. Экова¹, И. Н. Тюренков¹, Д. В. Куркин¹, Е. В. Волотова¹, Д. А. Бакулин¹**

Кафедра патологической анатомии ВолгГМУ,

¹ кафедра фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ;

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

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ BECLIN-1 В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

УДК:616-005.4:611.813.14:616-092.9

Представлены результаты иммуногистохимического исследования маркера аутофагии Beclin-1 в пирамидном слое гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании хронических нарушений мозгового кровотока. Выявлено достоверное усиление экспрессии Beclin-1 в зонах CA1 и CA2 как в увеличении относительной площади иммунопозитивного материала, так и в интенсивности реакции, кроме того, обнаружена тенденция к усилению экспрессии Beclin-1 в зоне CA3. При гистологическом исследовании выявлены: вазогенный отек, деструктивные и адаптивные изменения стенок артериол, признаки обратимого и необратимого повреждения нейронов пирамидного слоя.

Ключевые слова: гиппокамп, цереброваскулярные болезни, аутофагия, Beclin-1, крыса.

**A. V. Smirnov, D. S. Mednikov, M. V. Schmidt,
M. R. Ekova, I. N Tyurenkov, D. V. Kurkin, E. V. Volotova, D. A. Bakulin**

BECLIN-1 EXPRESSION LEVEL IN A HIPPOCAMPUS OF RATS IN THE CHRONIC HEMOCIRCULATORY DISORDERS EXPERIMENTAL MODELLING

Here we present the results of immunohistochemical research of an autophagy-marker Beclin-1 in a pyramidal layer of a hippocampus of rats in the chronic hemocirculatory disorders modelling. In the research, the Beclin-1 expression level veraciously increased in CA1 and CA2 both in the relative area of immunopositive material and in intensity of reaction. Besides, we found the tendency to strengthening of Beclin-1 expression level in CA3. The histologic research revealed pericellular and perivascular edema, the destructive and adaptive changes of arterioles, signs of both reversible and irreversible neuronal injury in pyramidal layer.

Key words: hippocampus, cerebrovascular diseases, autophagy, Beclin-1, rat.

Цереброваскулярные болезни (ЦВБ) на сегодняшний день представляют собой важную медико-социальную проблему не только в России, но и во всем мире. Это связано как с высокой долей в общей структуре заболеваемости, так и с высоким уровнем смертности, а также с тяжелой инвалидизацией пациентов [3, 5]. Кроме главных факторов развития ЦВБ – атеросклероза и гипертонической болезни, важная роль в постоянном повышении заболеваемости, особенно хронических форм, отводится тенденции к постарению населения [3]. С учетом частого развития 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 [1]. Наиболее перспективным подходом к лечению ЦВБ, учитывая ограниченную эффективность реабилитационных мероприятий, может служить детальное изучение начальных механизмов повреждения, структурно-функциональных изменений, способов повышения нейрональной устойчивости к ишемии. Одним из регулируемых процессов, направленных на поддержание клеточного гомеостаза и обеспечивающих выживаемость при повреждающих воздействиях, является аутофагия. Beclin-1 – белок суперсемейства белков Bcl-2, относящийся к подсемейству BH3-proteins, выполняющий множество функций, в том числе перекрестное регулирование аутофагии и апоптоза [7, 8]. Известно

о важной роли *Beclin-1* в формировании аутофагосом [8], а ряд исследователей описывает развитие нейродегенеративных процессов в гиппокампе и мозжечке у линии мышей с условным нокаутом *Beclin-1* [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Качественными и количественными методами описать особенности экспрессии *Beclin-1* в пирамидном слое гиппокампа крыс при экспериментальном моделировании хронических нарушений мозгового кровообращения.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 12-месячных крысах линии Вистар ($n = 20$), полученных из питомника лабораторных животных (Рапполово). Животные были разделены на две группы: 1-я – контрольные крысы, 2-я – крысы с моделируемым нарушением кровообращения ($n = 10$). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Моделирование проводилось на бодрствующих крысах с использованием специальной центрифуги, животных размещали в пеналах в строго каудо-краниальном направлении и подвергали гравитационному воздействию силой 9G в течение 5 минут дважды в день с интервалом в 12 часов на протяжении 28 дней [2, 4]. На 29-е сутки наркотизированных хлоралгидратом крыс декапитировали и забирали образцы головного мозга. Головной мозг фиксировали в 10%-м забуференном формалине, с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля. Иммуногистохимическое исследование проводили прямым пероксидазно-антипероксидазным методом с использованием поликлональных антител к *Beclin-1* (1:100. GeneTex, Irvine, CA) 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 СА1 зоны гиппокампа крыс 2-й группы обнаружено значительное изменение цитоархитектоники пирамидного слоя. Было отмечено резкое увеличение числа нейронов с признаками повреждения, среди которых доминировали тотально гиперхромные со сморщенными перикарионами и усиленной извитостью отростков. Выявлено менее компактное расположение перикарионов, участки очаговых выпадений пирамидных нейронов. Расстройства микрогемодикуляции выражались в резком отеке, локализованном как вокруг нейрональных, так и вокруг глиальных элементов не только пирамидного, но и молекулярного, и краевого полиморфного слоев. В сосудах микроциркуляторного русла выявлялись эритроцитарные стазы, полнокровие, очаговый диапедез эритроцитов. Кроме того, стенки сосудов претерпевали значительные изменения, связанные, прежде всего, с утолщением за счет плазматического пропитывания, в артериолах отмечены деструктивные и адаптивные изменения, проявляющиеся в появлении циркулярных и сегментарных фибриноидных некрозов, а также милиарных аневризм. При иммуногистохимическом исследовании СА1 зоны гиппокампа крыс 1-й группы с применением антител против *Beclin-1* выявлена равномерная цитоплазматическая реакция в пирамидных нейронах, преимущественно слабой интенсивности (1 балл), встречались единичные нейроны с умеренной экспрессией ИРМ (2 балла). При ИГХ исследовании СА1 зоны гиппокампа гиппокампа крыс 2-й группы обнаружено достоверное усиление экспрессии *Beclin-1*-позитивного материала как в интенсивности реакции, так и в относительной площади ИРМ (см. табл.). Значение ОП ИМР увеличилось на 1 % по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Интенсивность при этом сменялась на преимущественно умеренно выраженную (2 балла), в отдельных клетках достигая резко выраженной (3 балла).

Таблица 1

Изменение параметров экспрессии при иммуногистохимическом исследовании гиппокампа крыс с применением антител против Veclin-1

Параметр экспрессии	Контроль				Моделируемые хронические нарушения мозгового кровообращения			
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA1	CA2	CA3	CA4
Относительная площадь ИРМ, Vcl-2, %	0,4 [0,1;0,7]	0,9 [0,6;0,9]	1,5 [0,9;1,8]	1,3 [1,0;2,2]	1,4 [1,2;2]**	1,5 [1,2;1,7]*	2,3 [1,7;2,8]	2,6 [2,0;2,8]
Интенсивность ИРМ, Veclin-1, баллы	+	++	+	+	++	+++	+++	++

** $p < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой;

* $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна-Уитни).

При гистологическом исследовании CA2 зоны гиппокампа крыс 2-й группы обнаружены схожие с CA1 нарушения кровообращения, проявляющиеся, прежде всего, в выраженном перичеселлюлярном и периваскулярном отеке и полнокровии сосудов микроциркуляторного русла, с утолщением стенок за счет плазматического пропитывания. Пирамидный слой характеризовался неоднородностью нейронального состава – среди пирамидных нейронов преобладали клетки с признаками обратимого и необратимого повреждения, вплоть до клеток-теней. Абсолютное большинство составляли нейроны с веретеновидно смор-

щенными перикарионами, резкой гиперхромией ядра, в которых не определялось ядрышко, встречались единичные гипохромные нейроны. При ИГХ исследовании CA2 зоны гиппокампа крыс 1-й группы выявлено равномерное цитоплазматическое распределение Veclin-1-позитивного материала (рис. 1), интенсивностью преимущественно 2 балла. Во 2-й группе отмечено достоверное усиление экспрессии: относительная площадь ИРМ увеличилась на 0,6 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (см. табл.), а интенсивность ИРМ сменялась на преимущественно резко выраженную (3 балла).

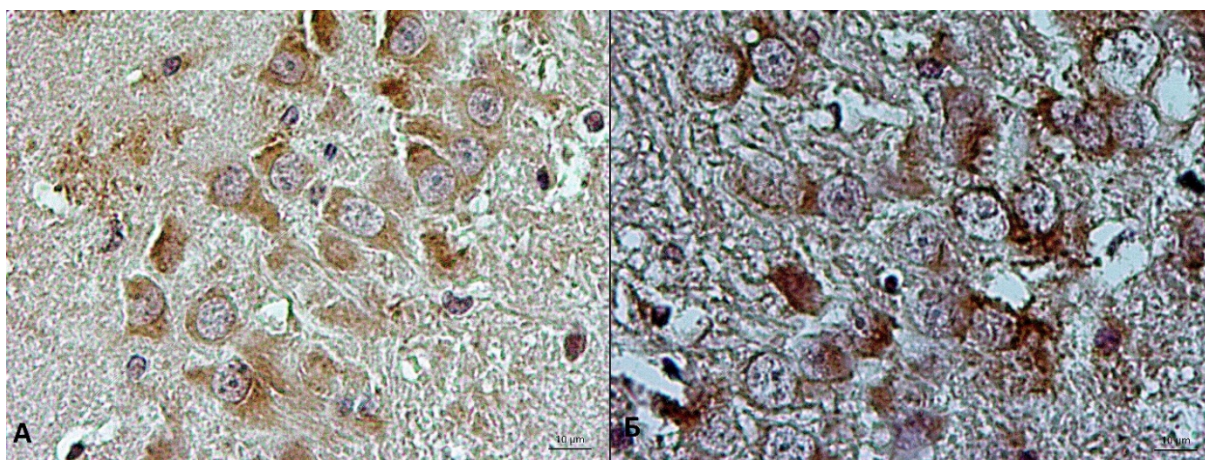


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование CA2 зоны гиппокампа крыс с применением антител против Veclin-1: А – контрольная группа, интенсивность ИРМ преимущественно 2 балла; Б – группа крыс с моделируемыми хроническими нарушениями мозгового кровообращения, увеличение площади и усиление интенсивности ИРМ. Ув x 400, докраска гематоксилином

Зона CA3 гиппокампа крыс 2-й группы характеризовалась максимально выраженным спонгиозом, менее плотным прилеганием перикарионов пирамидных нейронов, а также участками очаговых выпадений нейронов. В отдельных полях зрения пирамидный слой был представлен гомогенизированной полоской, состоящей исключительно из тотально гиперхромных нейронов, многие из которых приобретали веретеновидную или близкую к веретеновидной форму. Описанные для зоны CA1 и CA2 сосудистые нарушения, про-

являющиеся в утолщении стенок, развитии в них деструктивных и адаптивных процессов, встречались и в CA3 зоне. При иммуногистохимическом исследовании с применением антител против Veclin-1 зона CA3 контрольных крыс характеризовалась максимальным уровнем экспрессии в значениях относительной площади ИРМ (рис. 2) интенсивностью преимущественно 1 балл. В группе животных с моделируемыми нарушениями кровообращения выявлена тенденция к увеличению ОП ИРМ, а также более интенсивная цитоплазм-

матическая реакция Beclin-1 позитивного материала, составляющая преимущественно 3 балла.

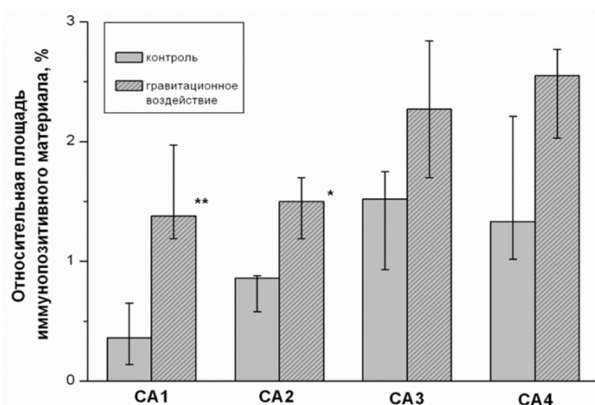


Рис. 2. Изменение относительной площади Beclin-1-позитивного материала при моделировании хронических нарушений мозгового кровообращения: ** – $p < 0,01$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой; * – $p < 0,05$ – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (использован критерий Манна-Уитни)

При гистологическом исследовании CA4 зоны гиппокампа крыс 2-й группы обнаружено значительное изменение строения пирамидного слоя, выражающееся в увеличении числа поврежденных нейронов, большинство из которых составляли пикноморфные тотально гиперхромные клетки. Признаки нарушения кровообращения, выявленные в CA4, носили схожий характер с обнаруженными в остальных зонах и проявлялись, главным образом, в спонгиозе и формировании криблюр. Признаки нарушения кровообращения также проявлялись в виде полнокровия и эритроцитарных стазов, очаговом диапедезе эритроцитов. Адаптивные изменения сосудов микроциркуляторного русла проявлялись в виде утолщения стенок. При ИГХ исследовании с применением антител против Beclin-1 в CA4 зоне гиппокампа крыс 2-й группы не обнаружено достоверных различий в значениях относительной площади ИРМ, однако интенсивность сменялась с преимущественно слабой (1 балл) на преимущественно умеренную (2 балла).

Обнаруженная картина спонгиоза связана, по нашему мнению, с персистенцией отека и набуханием головного мозга при многократно повторяющихся воздействиях отрицательных продольных перегрузок. Однократное воздействие – 9Gz приводит к гемодинамическим нарушениям, связанным с перераспределением циркулирующей крови и смещению ее в верхнюю половину тела, срыву ауторегуляции мозгового кровотока, а также нарушению венозного оттока. Подъем давления в артериолах и капиллярах приводит к альтеративным изменениям, связанным с набуханием эндотелия сосудов и плазматическим пропитыванием стенок. Систе-

матически повторяющиеся – 9Gz воздействия приводят к дальнейшим деструктивным изменениям и адаптивной перестройке сосудов с появлением участков фибриноидного некроза, склероза и утолщения стенок. Нарастающий отек, по нашему мнению, формируется за счет повреждения гематоэнцефалического барьера, деструкции астроцитарных отростков, заполнению периваскулярных пространств жидкостью и постепенным их расширением с формированием криблюр. Являясь по патогенетическому признаку вазогенным, нарастающий отек обуславливает прогрессирование морфофункциональных изменений. Так, в условиях отека, в гиппокампе отмечены нейродегенеративные изменения, проявляющиеся резким увеличением числа пирамидных нейронов с признаками повреждения и участками очаговых выпадений нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном моделировании хронических нарушений мозгового кровообращения методом многократных длительных отрицательных продольных перегрузок в пирамидном слое гиппокампа крыс отмечается достоверное усиление экспрессии Beclin-1 в зонах CA1 и CA2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганнушкина И. В., Лебедева Н. В. Гипертоническая энцефалопатия / И. В. Ганнушкина, Н. В. Лебедева. – М., 1987. – 224 с.
2. Морфометрическое исследование гиппокампа правого полушария крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии / А. В. Смирнов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2016. – Т. 52, № 4. – С. 7–11.
3. Нарушения мозгового кровообращения: диагностика, лечение, профилактика / З. А. Суслина [и др.]. – М.: Медпресс-информ, 2016. – 536 с.
4. Особенности экспрессии HSP70, HSP90 и GFAP в гиппокампе крыс при моделировании гипертензивной энцефалопатии / А. В. Смирнов [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – Т. 22, № 2. – С. 59–64.
5. Смирнов, А. В. Патологическая анатомия цереброваскулярной болезни. Стратегии стимуляции нейрогенеза. / А. В. Смирнов, Н. В. Григорьева, Е. В. Горелик // Вестн. ВолгГМУ. – 2013. – Т. 46, № 2. – С. 3–8.
6. Beclin 1 regulates neuronal transforming growth factor- β signaling by mediating recycling of the type I receptor ALK5 / С. Е. O'Brien [et al.] // Molecular Neurodegeneration. – 2015. – № 10. – P. 69.
7. Moderate hypothermia significantly decreases hippocampal cell death involving autophagy pathway after moderate traumatic brain injury / Y. Jin [et al.] // J. of neurotrauma. – 2015. – № 32. – P. 1090–1100.
8. The Beclin-1 network regulates autophagy and apoptosis / R. Kang [et al.] // Cell Death and Differentiation. – 2011. – № 18. – P. 571–580.