

ВЛИЯНИЕ ДВАДЦАТИСУТОЧНОГО ХОЛЕСТАЗА НА ЛИЗОСОМАЛЬНЫЙ АППАРАТ НЕЙРОНОВ В ТЕМЕННОЙ ДОЛЕ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Бунькевич А. В.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Республика Беларусь

Актуальность. Оригинальность исследования заключается в том, что впервые проведено сравнение количества белка-активатора аутофагии AMBRA1 и параллельно изучена активность лизосомального аппарата в нейронах теменной коры больших полушарий головного мозга при нарушении тока желчи в острый период.

Цель. Установить степень активности лизосомальных ферментов и иммунохимический показатель аутофагии – количество белка AMBRA1 в нейронах теменной доли коры мозга у крыс через двадцать суток после перевязки общего желчного протока.

Материалы и методы исследования. Экспериментальная часть работы выполнена на базе лаборатории кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет». При проведении исследований мы соблюдали принципы гуманного обращения с животными и учитывали рекомендации Рабочей группы Федерации европейского сообщества по науке о лабораторных животных, и на выполнение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета.

Материал для исследования взят от 10 животных (пять опытных и пять контрольных). Моделирование холестаза проводили общепринятыми методами.

Обработку взятых образцов коры мозга от всех животных проводили параллельно и в одинаковых условиях. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин. Стандартные парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Срезы окрашивали 0,1% толудиновым синим по методу Ниссля на выявление в нейронах хроматофильной субстанции, общей оценки состояния нервных клеток.

Для выявления кислой фосфатазы – маркерного фермента лизосом (КФ; фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2) срезы предварительно фиксировали в 10 % нейтральном формалине и обрабатывали по методу G. Gomori.

Для выявления белка-активатора аутофагии AMBRA1, применяли первичные кроличьи поликлональные антитела фирмы Bioassay Technology Laboratory (Китай, AP00299) в разведении 1:150. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System Elabscience (Китай, E-IR-R213).

Результаты исследования обрабатывали методами статистики с помощью программы Statistica 10.0 для Windows с нахождением U-test (Mann-Whitney). Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях $p < 0,05$ [3].

Результаты и обсуждение. Наиболее выраженные изменения в теменной коре отмечены в нейронах на 20-е сутки после перевязки/перерезки общего желчного протока. Так, в гистологических препаратах определяются участки сморщенных нейронов. В других нейронах ядра набухшие, ядрышки расположены эксцентрично. Определяются гиперхромные нейроны с расширенными апикальными отростками. Отмечена вакуолизация цитоплазмы и лизис хроматофильной субстанции. Во всех слоях коры отмечены погибшие клетки. Можно проследить последовательные стадии сморщивания нейронов, поскольку данные фигуры часто встречаются во всех слоях. Появляется большое количество клеток-теней, не редки явления саттелитоза и нейронофагии.

Активность КФ в клетках возрастает: в нейронах 2 слоя на 42 % ($p=0,001$), в нейронах 3 слоя активность усиливается на 71 % ($p=0,001$), в нейронах 5 слоя повышение активности отмечено на уровне 5,9 % ($p=0,037$).

20-суточный холестаз приводит во всех слоях нейронов к увеличению экспрессии AMBRA1 – во втором слое – на 16,4 % (0,0001), в третьем слое – на 2,5 % (0,005), в пятом слое – на 8,6 % (0,001).

Выводы. Усиление иммунореактивности белка-активатора аутофагии AMBRA1 необходимо клеткам для ускоренного устранения повреждаемых в условиях стресса мембран и органелл, что совпадает с данными, полученными в ходе гистохимического исследования – максимальной активацией лизосомального аппарата нейронов в эти сроки.

Список литературы:

1. Corona Velazquez, A. F. So many roads: the multifaceted regulation of autophagy induction / A. F. Corona Velazquez, W. T. Jackson // Mol. Cell Biol. – 2018. – № 21, Vol. 38–P. e00303–e00318.
2. Mei, Y. Conformational flexibility of BECN1: essential to its key role in autophagy and beyond / Y. Mei [et al.] // Protein Sci. – 2016. – Vol. 25. – P. 1767–1785.
3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 312 с.