

*Е.Г. Гилерович¹, Е.А. Федорова¹, И.Н. Абдурасулова², М.Н. Карпенко², А.В. Соколов³,
Е.Т. Захарова³, Ю.Л. Житнухин³, Д.Э. Коржевский¹ и В.Б. Васильев³*

АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В СПИННОМ МОЗГУ КРЫС ВИСТАР НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии; ² физиологический отдел им. И.П. Павлова (руков. — проф. В.М. Клименко); ³ отдел молекулярной генетики (руков. — проф. В.Б. Васильев), Институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Изучены морфологические изменения в спинном мозгу на пике развития экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс с разной выраженностью симптомов заболевания. Использованы светооптические и иммуногистохимические методы исследования. Изучено распределение ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), маркера астроцитов — глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), маркера микроглиоцитов и макрофагов (Iba-1). Показана неоднородность морфологических проявлений экспериментального аллергического энцефаломиелита. В зависимости от преимущественного вовлечения в патологический процесс оболочек спинного мозга, сосудов, клеточных ядер или проводящих путей выделены 4 типичных варианта морфологических проявлений заболевания.

Ключевые слова: спинной мозг, иммуногистохимия, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, крыса.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит является общепризнанной моделью демиелинизирующих заболеваний человека, в частности рассеянного склероза [15]. Индуцировать экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) у крыс, мышей, морских свинок, кроликов и других восприимчивых животных можно гомогенатом гомологичной или гетерологичной ткани мозга, очищенным миелином или белками, входящими в его состав [9, 12]. После введения энцефалитогенного антигена у животных развивается сенсibilизация к белкам миелина, что проявляется воспалительной и аутоиммунной реакциями, приводящими к дегенерации аксонов нейронов и нарушению проводящих путей мозга [17]. На наш взгляд, наиболее адекватной моделью рассеянного склероза должен считаться ЭАЭ, вызываемый введением гомогената гомологичного спинного мозга [1, 2, 4]. В этой модели иммунный ответ возможен на все компоненты миелина, и проявляется развернутая клиническая симптоматика заболевания (развитие парезов, параличей и пр.). Однако закономерности структурных изменений спинного мозга, сопровождающих развитие ЭАЭ в данной модели, остаются не вполне понятными.

Целью настоящего исследования явилось изучение воспалительных и дегенеративных процессов в поясничном утолщении спинного мозга крыс при моделировании ЭАЭ.

Материал и методы. Работа выполнена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экс-

периментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) на 14 самках крыс линии Вистар массой 180–200 г, у которых индуцировали ЭАЭ однократной подкожной инъекцией энцефалитогенной смеси, состоящей из гомогената спинного мозга крысы и полного адьюванта Фрейнда [1]. Для оценки тяжести заболевания использовали оригинальную шкалу [2]. Контролем служил спинной мозг интактных крыс (n=3). На пике развития симптомов энцефаломиелита (14-е сутки после индукции ЭАЭ) животных под эфирным наркозом декапитировали, извлекали участок спинного мозга на уровне L₁–L₇ [3]. Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [7] в течение 1 сут, обезжизнили и заливали в парафин. Поперечные срезы спинного мозга толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином — эозином и тионином по методу Ниссля, а также использовали иммуногистохимические реакции на различные маркеры.

Имуногистохимическую реакцию на ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) проводили с использованием моноклональных (клон PC-10, RTU) первичных антител (Dako, Дания) [6] и вторичного реагента EnVision+ (Dako, Дания). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген из набора DAB+ (Dako, Дания). При проведении иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) — маркер астроцитов — использовали кроличьи поликлональные антитела (Dako, Дания) [8]. Для выявления микроглии и макрофагов применяли поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (Abscam, Великобритания) и амплифицирующий набор LSAB+ (Dako, Дания) [5].

Результаты исследования. Введение гомогената гомологичного спинного мозга в полном адьюванте Фрейнда вызвало у крыс развитие энцефаломиелита различной тяжести — от бессимптомного течения (n=3) до тяжелого — с

развитием параличей всех конечностей (n=11). Первые симптомы заболевания появились на 7–8-е сутки после индукции и достигали максимальной степени выраженности на 14-е сутки (пик болезни).

При морфологическом исследовании препаратов, окрашенных по методу Ниссля, часто выявлялись воспалительные инфильтраты в области конского хвоста, а также в вентральных рогах и белом веществе вокруг них (рисунок, а). Клеточный состав этих инфильтратов был представлен лейкоцитами, в том числе лимфоцитами, и микроглиоцитами.

Клеточные инфильтраты определялись в белом веществе спинного мозга по ходу тонкого и клиновидного пучков, а также в сером веществе спинного мозга преимущественно дорсальных рогов в участках, пограничных с белым веществом. Кроме того, инфильтраты обнаруживались вокруг сосудов, как белого, так и серого вещества. Они состояли из лимфоцитов, эозинофильных гранулоцитов и микроглиоцитов, образуя своеобразные муфты. Воспаление стенки сосудов в спинном мозгу по типу пролиферативного васкулита, характерного для ЭАЭ, наблюдалось у большинства крыс.

При исследовании серого вещества поясничного утолщения спинного мозга выявлены гетероморфия воспалительного процесса, а также повреждения нейронов. В ряде случаев (n=3) инфильтратов в сером веществе спинного мозга обнаружено не было. Однако в вентральных рогах (IX пластинка Рекседа) отмечались деформация мотонейронов, гиперхроматоз, вакуолизация цитоплазмы. Крупные клетки латеральной группы мотонейронов вентральных рогов спинного мозга иногда были окружены глиоцитами. Средние и мелкие нейроны были изменены меньше, чем крупные.

У двух крыс отмечены резко выраженные патологические изменения клеток серого вещества спинного мозга. В вентральных рогах в области IX и VIII пластинок Рекседа одновременно присутствовали периваскулярные инфильтраты, клеточные инфильтраты, не связанные со стенкой сосуда, обнаруживались деформированные и сморщенные мотонейроны (см. рисунок, б). Клетки V, VI, VII пластинок Рекседа были изменены все, но в меньшей степени, чем крупные нейроны.

Имуногистохимическое исследование с антителами к PCNA показало наличие пролиферирующих клеток, как в сером, так и в белом веществе спинного мозга, но не у всех животных и в разном количестве. У некоторых животных

иммунопозитивные клетки не выявлялись, у других — пролиферация наблюдалась повсеместно в сером и белом веществе, в том числе и в выстилке центрального канала спинного мозга. В ряде случаев иммунопозитивные клетки концентрировались вокруг сосудов и в области клеточных инфильтратов.

Имуногистохимическая реакция на GFAP выявила наличие астроцитарного глиоза в сером веществе спинного мозга (см. рисунок, в). Размер астроцитов был увеличен, часто они имели 2 ядра и неправильную форму, а их отростки были расширены и укорочены. Глиоз наблюдался не только в сером, но и в белом веществе спинного мозга и был выражен в различной степени у разных животных.

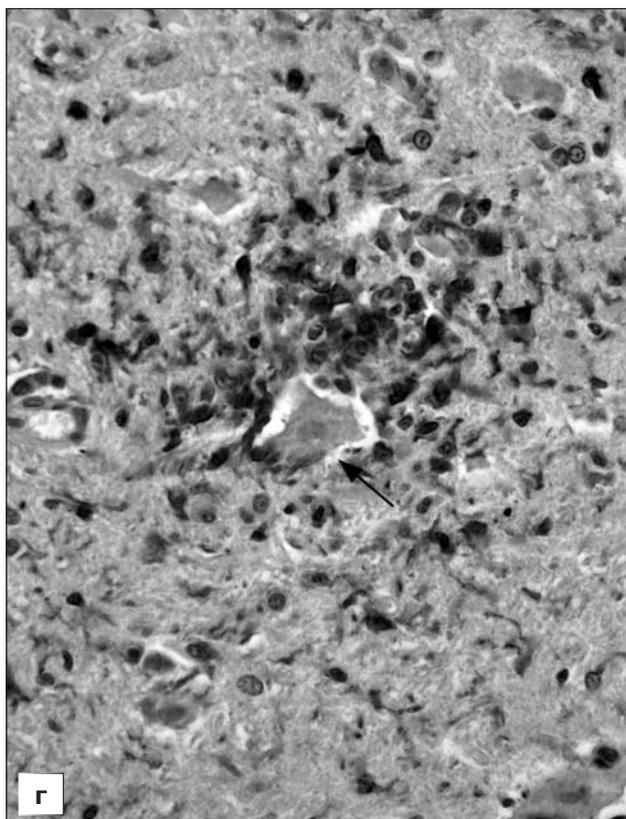
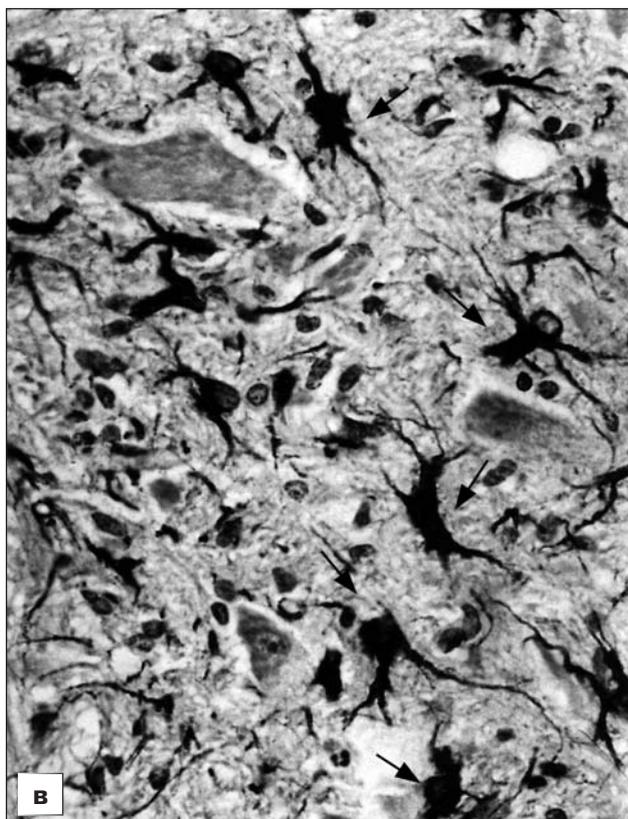
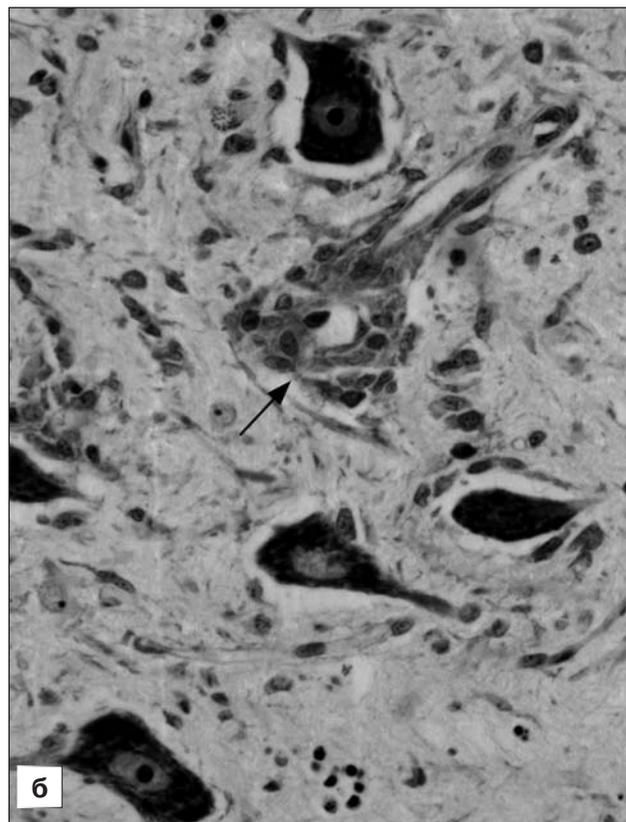
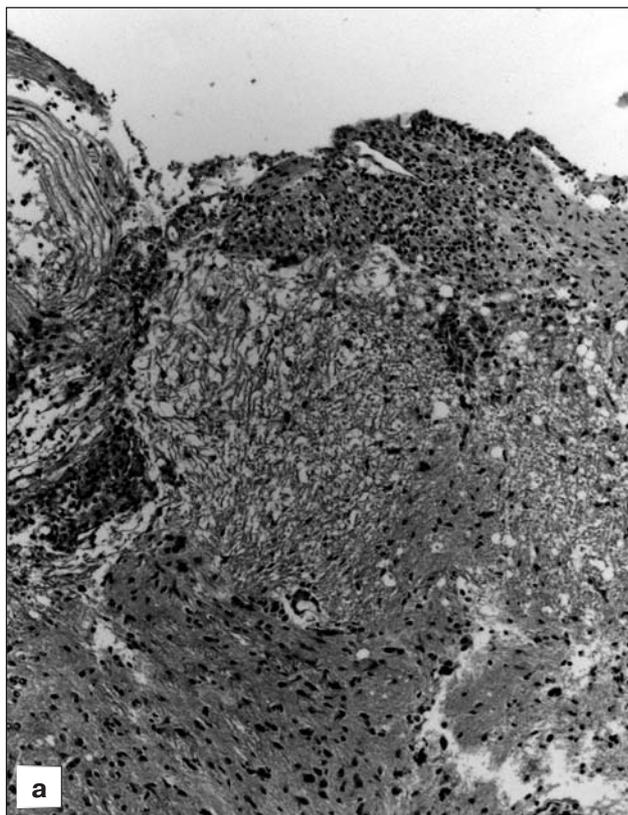
Определение Iba1, маркера микроглии и макрофагов, показало, что инфильтраты в основном состояли из микроглиоцитов (см. рисунок, г). Это — небольшого размера и неправильной формы клетки, с отростками, нередко выходящими за пределы воспалительного инфильтрата. Иммунопозитивные клетки были обнаружены не только в инфильтратах, но и в белом, и даже в сером веществе спинного мозга.

Особо следует описать зону центрального канала спинного мозга (X пластинку Рекседа). У ряда животных с сильно выраженными морфологическими изменениями эпендимные клетки, выстилающие центральный канал, часто располагались в несколько рядов, среди них определялись клетки разной формы, а иногда и митотически делящиеся.

Все перечисленные морфологические изменения зависели от интенсивности воспалительного аутоиммунного процесса, а не от уровня среза поясничного утолщения.

Обсуждение полученных данных. Морфологический анализ поясничного утолщения спинного мозга показал, что выраженность патологических изменений, свидетельствующих о развитии острого ЭАЭ на 14-е сутки эксперимента, у разных животных различается.

С одной стороны, это может быть вызвано генетической разнородностью использованных животных. Кроме того, известно, что разные линии крыс обладают неодинаковой восприимчивостью к ЭАЭ: от высоко восприимчивых (Dark Agouty) с хроническим рецидивирующим течением ЭАЭ и с острым течением (Lewis) до невосприимчивых (Brown Norway, Fisher) [14]. С другой стороны — одна и та же линия животных неодинакова по возможности индукции ЭАЭ с помощью разных антигенов. Поэтому выявленные различия могут быть связаны и с тем, что мише-



Спинальный мозг крыс на пике развития клинических симптомов экспериментального аллергического энцефаломиелита.

а — клеточная инфильтрация в основании конского хвоста спинного мозга; б — группа деформированных мотонейронов вентральных рогов. Клеточная «муфта» вокруг сосуда (стрелка), микроглиальные инфильтраты в сером веществе; в — глиоз в сером веществе спинного мозга (стрелки — астроциты); г — микроглиальная реакция вокруг поврежденного мотонейрона (стрелка); а, б — окраска тионином по методу Ниссля; в — иммуногистохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок, докраска гематоксилином; г — иммуногистохимическая реакция на белок Iba1, докраска гематоксилином. а — об. 10, ок. 10; б — г — об. 40, ок. 10.

ниями аутоагрессии выступают различные белки миелина, содержащиеся в гомогенате спинного мозга, который использовали в качестве аутоантигена [1].

У части крыс, как свидетельствуют морфологические данные, клеточные инфильтраты, в первую очередь, определяются в области конского хвоста (расположенного на уровне V поясничного позвонка) и задних корешков спинномозговых нервов. Воспалительная инфильтрация корешков и волокон конского хвоста в дальнейшем приводит к восходящему повреждению проводящих путей спинного мозга. Именно эта область спинного мозга характеризуется наличием большого количества резидентных Т-клеток [10], которые могут быстро активироваться после введения аутоантигена и способствуют развитию воспаления. При отчетливо выраженном аутоиммунном процессе признаки воспаления выявляются в более ростральных отделах спинного мозга, причем выраженность и распространенность воспалительной реакции, как показано в ряде исследований, зависит от свойств антигена, активирующего Т-лимфоциты [13]. Поэтому выявленное различие в топографии воспалительных инфильтратов может отражать неодинаковую антигенную специфичность энцефалитогенного Т-клеточного ответа.

Воспалительный иммунный процесс в волокнах конского хвоста и корешков спинномозговых нервов, развивающийся в ответ на введение антигена, является результатом активации антигенпрезентирующих клеток в ЦНС — клеток эндотелия сосудов мозга, астроцитов, перицитов и микроглии, что приводит к нарушению целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [11, 16]. Воспалительные инфильтраты, выявленные нами в сером и белом веществе спинного мозга, состояли преимущественно из микроглиоцитов, а очаги инфильтрации наблюдались на большем протяжении (под мягкой оболочкой мозга с вовлечением прилежащего белого вещества спинного мозга, в белом и в сером его веществе). Это свидетельствует об участии активированной микроглии в распространении аутоиммунного процесса. Иммунные процессы, если они приводят к развитию воспалительной реакции в волокнах белого вещества спинного мозга, способствуют увеличению проницаемости ГЭБ и развитию васкулитов [17].

Таким образом, нарушение целостности барьерной системы спинного мозга имеет первостепенное значение в развитии острого экспериментального аллергического энцефаломиелимита, а изменение проницаемости барьеров может опре-

делять неоднородность как морфологических, так и клинических проявлений болезни.

На основании полученных результатов, можно выделить несколько типичных вариантов ЭАЭ, характеризующихся преобладанием различных морфологических изменений в спинном мозгу и его оболочках. Это — ЭАЭ с первичным миелитом, без поражения серого вещества спинного мозга; ЭАЭ с проявлениями васкулита; ЭАЭ с первичным менингитом; ЭАЭ с распространенным миелитом (поражением серого и белого вещества спинного мозга и вторичным вовлечением в воспалительный процесс мозговых оболочек). Такая гетероморфность проявлений экспериментальной патологии у разных животных может определяться рядом причин: генетической разнородностью животных, фазой развития аутоиммунного процесса, антигенной специфичностью цитотоксических Т-клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-00742.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдурасулова И.Н., Житнухин Ю.Л., Тарасова Е.А. и Клименко В.М. Экспрессия мРНК цитокинов в селезенке и спинном мозге крыс с различной тяжестью ЭАЭ. Мед. иммунол., 2004, т. 6, № 1–2, с. 37–46.
2. Абдурасулова И.Н., Сердюк С.Е. и Гмиро В.Е. Сравнительное исследование профилактического и лечебного действия ИЭМ-1966 и мемантина у крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелимитом. Бюл. exper. биол., 2007, т. 144, № 8, с. 184–187.
3. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Федорова Е.А. и др. Морфофункциональная характеристика поясничного утолщения спинного мозга крыс. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 33–37.
4. Житнухин Ю.Л., Никитина Е.Ю., Абдурасулова И.Н. и др. Изменение уровней циркулирующего фактора некроза опухолей-альфа и интерлейкина-10 при индукции аллергического энцефаломиелимита. В кн.: Рассеянный склероз: основы здоровья, СПб., Лики России, 1999, с. 18–21.
5. Кирик О. В., Сухорукова Е.Г. и Коржевский Д.Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF1 в клетках головного мозга крысы. Морфология, 2010, т. 137, вып. 2, с. 5–8.
6. Коржевский Д.Э. Использование моноклональных антител к ядерному белку PCNA для выявления пролиферирующих клеток в развивающемся головном мозге эмбриона человека. Морфология, 2000, т. 118, вып. 5, с. 68–70.
7. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейростологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
8. Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нисслю. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
9. Berger T., Weerth S., Kojima K. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes deter-

- mines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab. Invest.*, 1997, v. 76, № 3, p. 355–364.
10. Bradl M., Bauer J., Flügel A. et al. Complementary contribution of CD4 and CD8 T lymphocytes to T-cell infiltration of the intact and the degenerative spinal cord. *Am. J. Pathol.*, 2005, v. 166, № 5, p. 1441–1450.
 11. Girvin A.M., Gordon K.B., Welsh C.J. et al. Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells. *Blood*, 2002, v. 99, № 10, p. 3692–3701.
 12. Gold R., Lington C. and Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 2006, v. 129, p. 1953–1971.
 13. Kuerten S., Javeri S., Tary-Lehmann M. et al. Fundamental differences in the dynamics of CNS lesion development and composition in MP4- and MOG peptide 35–55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Immunol.*, 2008, v. 129, № 2, p. 256–267.
 14. Lorentzen J.C., Issazadeh S., Storch M. et al. Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. *J. Neuroimmunol.*, 1995, v. 63, № 2, p. 193–205.
 15. Scundric D.S. Experimental models relapsing-remitting multiple sclerosis: current concepts and perspective. *Curr. Neurovasc. Res.*, 2005, v. 2, p. 349–362.
 16. Soos J.M., Morrow J., Ashley T.A. et al. Astrocytes express elements of the class II endocytic pathway and process central nervous system autoantigen for presentation to encephalitogenic T cells. *J. Immunol.*, 1998, v. 161, p. 5959–5966.
 17. Vilcaes A.A., Degano A.L., Lopez P.H. et al. Antibodies which block anti-myelin basic protein antibodies associated with development of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats. *J. Neuroimmunol.*, 2005, v. 164, p. 31–36.
- Поступила в редакцию 03.03.10
- ### ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL MANIFESTATIONS OF THE INFLAMMATORY REACTION IN WISTAR RAT SPINAL CORD IN EXPERIMENTAL MODEL
- Ye.G. Gilerovich, Ye.A. Fyodorova, I.N. Abdurasulova, M.N. Karpenko, A.V. Sokolov, Ye.T. Zakharova, Yu.L. Zhitnukhin, D.E. Korzhevskiy and V.B. Vasiliyev*
- Morphological changes in the spinal cord of rats with different intensity of pathological symptoms were studied at the peak of the experimental encephalomyelitis development. Light-microscopical and immunohistochemical methods were used. Distribution of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), astrocyte marker — glial fibrillar acidic protein (GFAP), and microglia and macrophage marker Iba-1, was studied. Heterogeneity in morphological manifestations of the experimental allergic encephalomyelitis was shown. Four typical patterns of morphological manifestations of the disease were demonstrated depending on the preferential involvement of pia mater, vessels, spinal cell nuclei or conductive tracts in the pathological process.
- Key words:** *spinal cord, immunohistochemistry, experimental allergic encephalomyelitis, rat*
- Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, I.P. Pavlov Physiological Department, Department of Molecular Genetics, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg