

ВЛИЯНИЕ ВИНДЕБУРНОЛА НА НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Карантыш Г.В.¹, Гафиятуллина Г.Ш.², Менджеричкий А.М.³, Прокофьев В.Н.³, Жукова М.В.¹, Макаров В.А.⁴

¹ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону, karantysjgv@mail.ru

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону

³ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону

⁴Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Проведен анализ влияния виндебурнола (структурного аналога центрального вазодилатора винкамина) на неврологический статус и морфологическую структуру мозга животных в модели экспериментального аллергического энцефаломиелиита (ЭАЭ). Для оценки клинической тяжести заболевания учитывали показатели летальности, веса тела, неврологического дефицита и морфологические признаки заболевания ЭАЭ. В результате моделирования ЭАЭ неврологический дефицит установлен был у 54% иммунизированных животных, которые далее вошли в эксперимент. Тяжесть заболевания характеризовалась снижением веса и развитием неврологического дефицита; в мозге выявлены очаги деструкции нервной ткани без пролиферации глиальных элементов и геморрагического пропитывания нервной ткани, полнокровие сосудов с лейкостазом и лимфоцитарная инфильтрация. Относительно группы иммунизированных крыс, которым не вводили препарат, на фоне введения виндебурнола в модели ЭАЭ уровень снижения веса у животных был менее выражен, у них не наблюдали тяжелого паралича конечностей, а уровень неврологического дефицита был не столь выражен. Также в условиях введения виндебурнола в мозге животных с ЭАЭ установлены очаги деструкции нервных волокон с пролиферацией клеток нейроглии, дистрофические изменения нейроцитов с кариолизисом ядер.

Ключевые слова: модель рассеянного склероза, виндебурнол, неврологический дефицит, морфология мозга.

VINDEBURNOL'S INFLUENCE ON THE NEUROLOGIC STATUS AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN OF RATS IN MODEL OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

Karantys G.V.¹, Gafiyatullina G.Sh.², Mendzheritskii A.M., Prokofev V.N.³, Zhukova M.V.³, Makarov V.A.⁴

¹Don State Technical University, Rostov-on-Don, karantysjgv@mail.ru

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don

³Southern Federal University, Rostov-on-Don

⁴Federal research center "Fundamental Bases of Biotechnology", Moscow

An analysis vindeburnol (structural analog of central vasodilator of vinkamine) on the neurologic status and morphologic structure of animal's brain within the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) has been conducted. To evaluate the clinical severity of illness, the indices of lethality, body weight, neurologic deficit and morphologic symptoms of EAE illness were taken into consideration. As a result of modelling EAE, the neurologic deficit was ascertained for 54% immunized animals, which were afterwards chosen for the experiment. The severity of illness was characterized by decrease of body weight and evolution of neurologic deficit. In brain the foci of destruction of nerve tissue without proliferation of glial elements and haemorrhagic impregnation of nerve tissue has been revealed, as well as the plethora of blood vessels with leukostasis and lymphocytic infiltration. Against the background of vindeburnol introduction in the model of EAE, as compared to group of immunized rats, the animals had their body weight level decreased; they were not subjected to heavy limb paralysis and the level of neurologic deficit was less exposed. Also, in the condition of vindeburnol introduction, in animal's brain with EAE the foci of destruction of nerve fibers with proliferation of glial cells have been ascertained, as well as the dystrophic changes of neurocytes with cells' karyolysis.

Keywords: model of disseminated sclerosis, vindeburnol, neurologic deficit, morphology of brain.

Рассеянный склероз - хроническое заболевание центральной нервной системы, которое является наиболее распространенным хроническим неврологическим расстройством у молодых людей [1]. В основе его патологии лежит воспалительный процесс, сопровождающийся демиелинизацией. Уже на ранних стадиях заболевания у пациентов с рассеянным склерозом (РС) наблюдается когнитивный дефицит. Для лечения больных с РС за последние три десятилетия использовали разные группы препаратов, обладающих иммуномодулирующим действием [2; 3], что связано с тем, что наиболее важную роль в патогенезе рассеянного склероза отводят аутоиммунным механизмам. При этом данное заболевание сопровождается также нарушением центральной нейромедиации [4; 5], изменение которой не менее важно для определения прогрессирования заболевания. В том числе установлена роль глутамата и норадреналина в патогенезе рассеянного склероза, что было также подтверждено на модели экспериментальном аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ). Данная модель наиболее часто используется при изучении рассеянного склероза [6-8]. В модели ЭАЭ было изучено влияние структурного аналога центрального вазодилататора винкамина виндебурнола на экспрессию тирозингидроксилазы, предшественника норадреналина, в *Locus coeruleus*. Было высказано предположение о том, что препараты, подобные виндебурнолу, активируя норадренергическую медиацию в *Locus coeruleus*, могут способствовать снижению симптоматики рассеянного склероза [9].

Целью данной работы явилось изучение влияния виндебурнола на гистологические показатели в мозге и неврологический статус крыс в модели экспериментального аллергического энцефаломиелита.

Методы исследования

Эксперименты на животных выполнены с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). В эксперимент вошли 3-4-месячные самки беспородных крыс. Всех животных делили на 3 группы: 1 - контрольная группа (n=20); 2 - моделирование ЭАЭ (n=30); 3 - после моделирования ЭАЭ подкожно вводили виндебурнол в дозировке 20 мк/кг со дня первых проявлений неврологического дефицита в течение последующих 10 суток (до пика клинических проявлений заболевания). Расчет дозы виндебурнола производили путем вычисления LD₅₀ для данного вида животных с границей доверительного интервала 95%. Материалом для иммунизации животных с целью воспроизведения ЭАЭ служил спинной мозг беспородных белых крыс без неврологической симптоматики с модифицированным полным адьювантом Фрейнда. Реакцию животных на введение препарата оценивали по уровню проявления неврологического дефицита и

патоморфологических изменений в головном мозге крыс экспериментальных групп на пике острой фазы заболевания. Для оценки клинической тяжести заболевания использованы следующие стандартные показатели [10], в том числе общие (вес тела, летальность) и показатели неврологического дефицита:

1. Клинический индекс, который вычисляли в баллах по следующим показателям:

0 баллов – нет очевидных клинических проявлений; 1 балл – сниженный тонус хвоста; 2 балла – слабость и легкий паралич задних конечностей, переваливающаяся походка, медленное восстановление положения тела из положения на боку; 3 балла – тяжелый паралич задних конечностей или всех; 4 – тетраплегия (паралич четырех конечностей); 5 – агональное состояние; 6 – смерть.

2. Оценку неврологического дефицита также проводили с использованием метода [11]. Итоговый балл по данному методу формируется как сумма баллов в 3 двигательных тестах, определяющих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие, что позволяет оценить функциональное состояние экстрапирамидной системы. При этом 0 баллов свидетельствует о максимальной выраженности нарушений, а 9 баллов - об их отсутствии. Тяжесть неврологических нарушений фиксировали на видеокамеру.

Для гистологического исследования животных декапитировали под нембуталовым наркозом (35 мг/кг веса), ткань головного мозга животных фиксировали в 10%-ном нейтральном буферированном формалине, заливали в парафин, из тканевых блоков готовили срезы толщиной 6-8 микрон, окрашивали гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы исследовали под световым микроскопом с возможностью фоторегистрации. Секции мозга оценивали независимо для определения центров воспаления слепым методом, без информации о характере обработки животного до умерщвления. Образцы для каждого животного подготавливали идентичным образом и определяли степень воспалительной инфильтрации [12]. Обработку фотографий проводили с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health (NIH) <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0.

Результаты исследования

На первом этапе исследования оценивали продолжительность латентного, клинического периодов, а также общее число заболевших и тяжело больных крыс (в % от числа крыс в группе), средний клинический индекс на пике заболевания и средний кумулятивный индекс болезни. Было иммунизировано 30 крыс, у 14 из которых выявлены были неврологические нарушения, т.е. развивался ЭАЭ. Процент выживаемости среди заболевших крыс составил 86%. Продолжительность латентного периода у заболевших

животных в среднем составила 6,5 суток. В этот период животные не теряли массу. До иммунизации средний вес крыс составлял 248 г, к 7-м суткам после иммунизации вес заболевших животных незначительно снизился (до 227 г). С 8-х суток после иммунизации у заболевших крыс наблюдали достоверное снижение веса ($p < 0,05$), который постепенно увеличивался в период ремиссии заболевания (с 21 суток после иммунизации). К концу эксперимента вес животных был ниже, чем в 1-й день иммунизации (рис. 1). В острую стадию заболевания у животных наблюдали недержание мочи и неврологические нарушения двигательных функций. Клинический индекс на пике заболевания (7-20 сутки) составил $2,4 \pm 0,2$ балла.

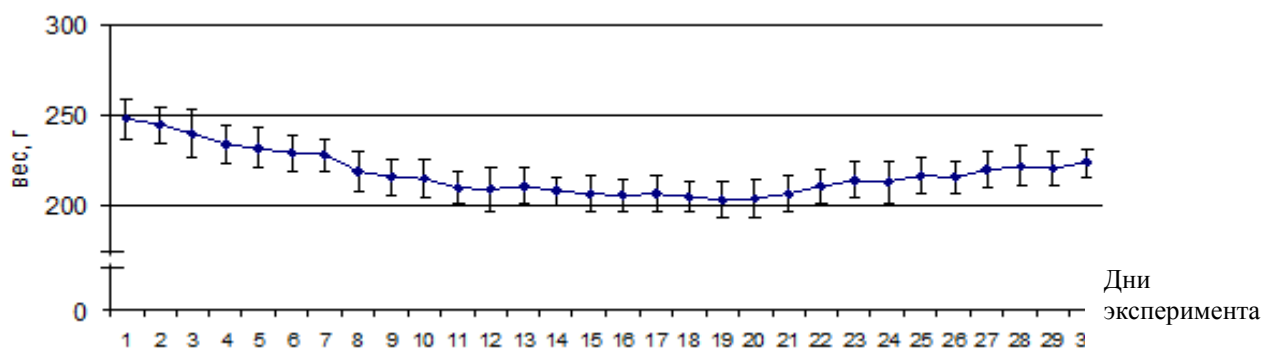
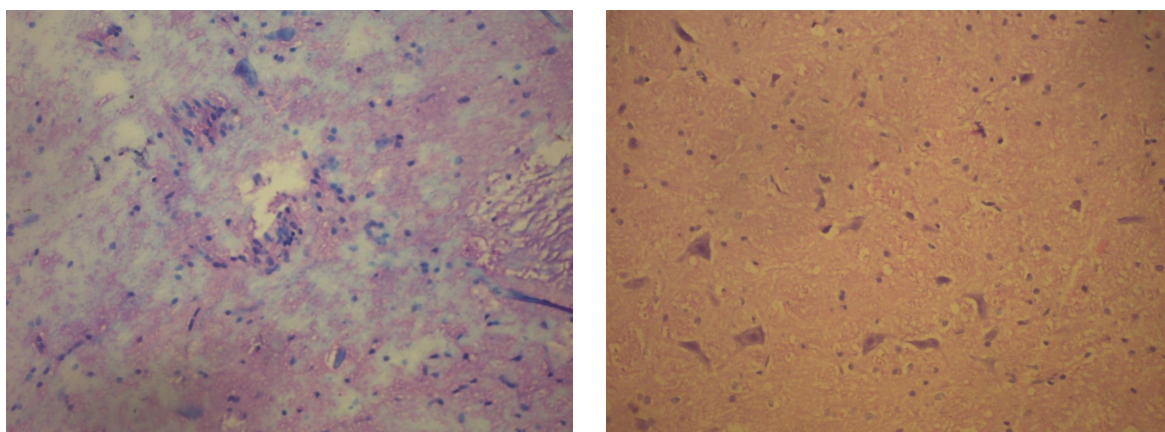


Рис. 1. Динамика веса заболевших крыс

В контрольной группе крыс показатели неврологического статуса были в норме. В том числе в тесте на мышечную силу крысы удерживались на проволочном экране более 15 с: в среднем 24,7 с. В тесте на равновесие с использованием деревянного стержня животные удерживались более 30 с (в среднем 47,2 с), а в тесте на цепкость-тягу животные демонстрировали способность подтягивать 1 или 2 задние лапки. Время до момента падения этих животных в среднем составило 18,7 с. По данной неврологической шкале крысы контрольной группы получили $8,7 \pm 0,3$ балла. В контрольной группе крыс в коре больших полушарий и стволовых структурах головного мозга отмечали слабо выраженный перипеллюлярный и периваскулярный отек, нейроны и структура нервных волокон были сохранены. Незначительный перипеллюлярный и периваскулярный отек является нормой для здорового мозга (рис. 2).

При оценке неврологического дефицита на пике заболевания крыс в модели ЭАЭ установлено, что в тесте на мышечную силу крысы данной группы удерживались на проволочном экране в среднем не более 6,7 с. Большинство животных в модели ЭАЭ стремились удержать равновесие путем захвата конечностями проволочного экрана с двух сторон. В тесте на равновесие с использованием деревянного стержня животные в модели ЭАЭ удерживали равновесие менее 30 с (в среднем 11,3 с). В тесте на цепкость-тягу крысы в

модели ЭАЭ смогли удержаться на веревке в среднем 3,6 с. 29% заболевших крыс после помещения их на веревку не могли удержаться на ней: сразу падали. Сумма баллов по данной шкале у крыс в модели ЭАЭ составила 3,8 балла. Таким образом, иммунизация крыс приводила к развитию выраженной неврологической симптоматики. При этом у крыс в модели ЭАЭ в коре больших полушарий нейроны были сохранены, отмечалась очаговая периваскулярная инфильтрация лимфоцитами, выраженный периваскулярный и перицеллюлярный отек, а также мелкие очаги дезорганизации нервных волокон.



а

б

Рис. 2. Морфология ткани мозга крысы контрольной группы: а) слабо выраженная периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация в мозге; б) умеренный перицеллюлярный отек. Гематоксилин и миозин об. 40. ок. 10

В стволовых структурах у крыс в модели ЭАЭ выявлены нейроны с выраженными дистрофическими изменениями, некоторые вакуолизированы, диффузно периваскулярный и перицеллюлярный отек, на всем протяжении отмечали крупные очаги дезорганизации нервных волокон и умеренную диффузную периваскулярную лимфоцитарную инфильтрацию, в части сосудов установлен лейкостаз (рис. 3).

Процент выживаемости крыс 3-й группы составил 100%; динамика их веса в процессе развития заболевания представлена на рисунке 4. В острую стадию заболевания у животных не было признаков недержания мочи, но неврологические нарушения двигательных функций сохранялись, но в меньшей степени относительно 2-й группы животных. Клинический индекс на пике заболевания (7-20 сутки) у крыс 3-й группы составил $1,3 \pm 0,1$ балла: им был характерен низкий тонус хвоста и признаки слабости и легкого паралича задних конечностей, у ряда животных выявлена переваливающаяся походка, медленное восстановление положения тела из положения на боку. Но в отличие от крыс 2-й группы (модель ЭАЭ) тяжелого паралича конечностей у них не наблюдали.

В тесте на мышечную силу крысы 3-й группы удерживались на проволочном экране в среднем $16,4 \pm 0,7$ с, что на 34% ($p < 0,05$) было ниже, чем в контрольной группе. В тесте на

равновесие животные 3-й группы демонстрировали увеличение времени удержания на деревянном стержне (в среднем до 23,4 с) относительно крыс 2-й группы. В тесте на цепкость-тягу животные 3-й группы в среднем удерживались на горизонтальной веревке 12,3 с, что на 34% ($p < 0,05$) было ниже, чем в контрольной группе. Суммарно по неврологической шкале животные 3-й группы получили 5,4 балла.

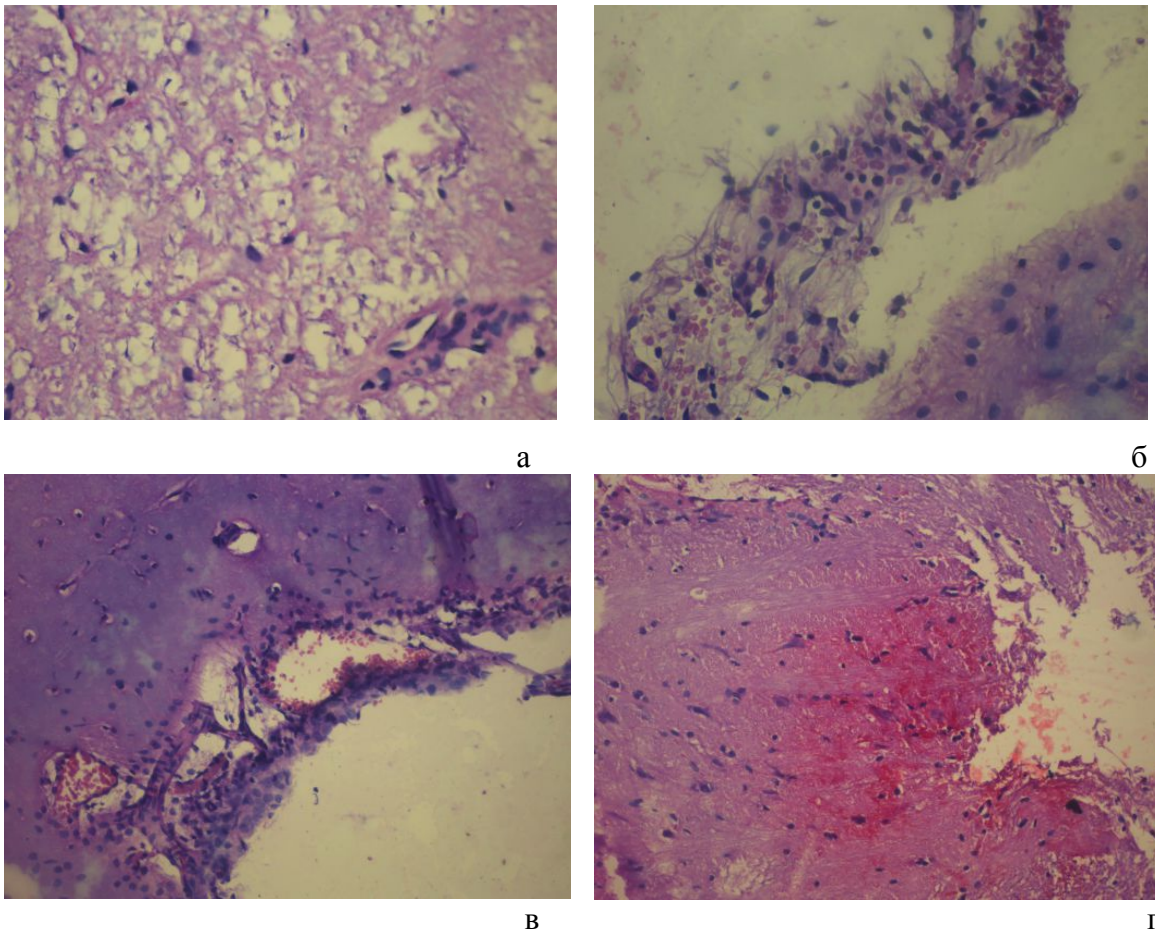


Рис. 3. Морфологические изменения в ткани мозга крыс в модели ЭАЭ: а) очаги деструкции нервной ткани без пролиферации глиальных элементов; б) оболочка головного мозга с отеком, полнокровием и очаговой лимфоцитарной инфильтрацией; в) полнокровие сосудов с лейкостазом; г) очаги геморрагического пропитывания нервной ткани. Гематоксилин и миозин об. 40. ок. 10.

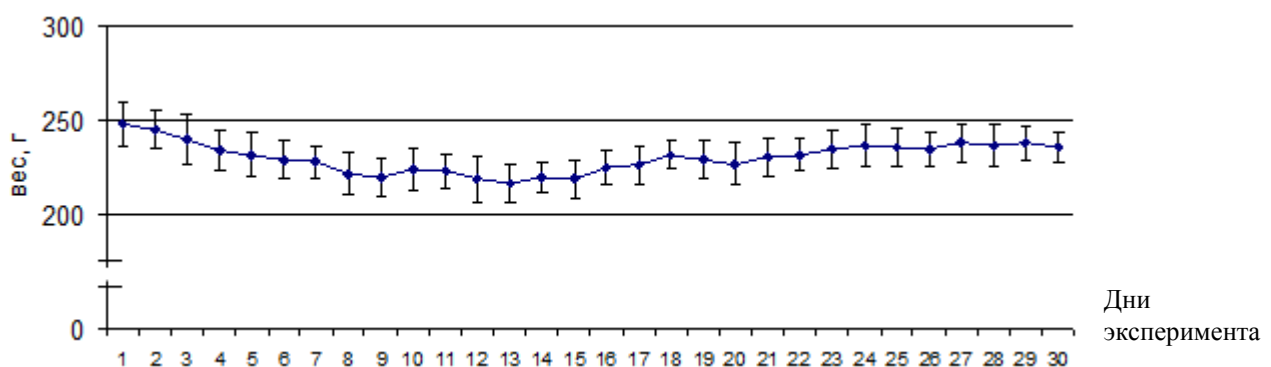


Рис. 4. Динамика веса крыс при введении виндебурнола в модели ЭАЭ

У крыс 3-й группы были выявлены также очаги деструкции нервных волокон с пролиферацией клеток нейроглии, дистрофические изменения нейроцитов с кариолизисом ядер, на некоторых участках обнаружена деструкция нервных волокон (рис. 5).

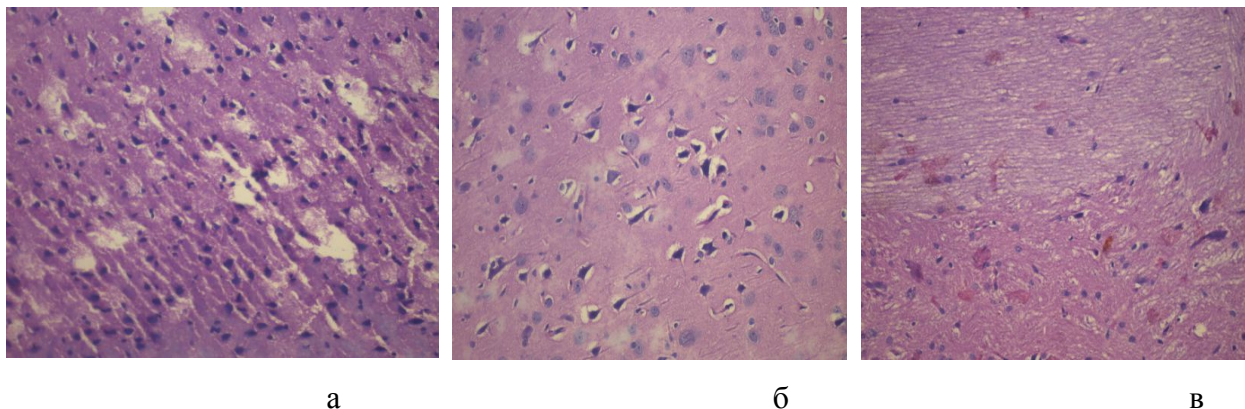


Рис. 5. Морфологические изменения ткани мозга крыс в модели ЭАЭ и введения виндебурнола: а) очаги деструкции нервных волокон с пролиферацией клеток нейроглии; б) дистрофические изменения нейроцитов с кариолизисом ядер; в) участки деструкции нервных волокон. Гематоксилин и миозин об. 40. ок. 10

Относительно крыс 2-й группы у иммунизированных животных с введением виндебурнола не установлена очаговая периваскулярная инфильтрация лимфоцитами, периваскулярный и перицеллюлярный отек, также лейкостаз сосудов. Следовательно, введение виндебурнола снижает данные проявления ЭАЭ.

Заключение

Работы, посвященные изучению эффектов виндебурнола в модели ЭАЭ, немногочисленны. Установленные изменения неврологического статуса и морфологической картины в мозге у крыс с развившимся ЭАЭ и при введении виндебурнола можно объяснить его влиянием на норадренергическую нейромедиацию. Снижение уровня норадренергического уровня ЦНС и деструктивные изменения нейронов в *Locus Coeruleus* были описаны как в модели ЭАЭ, так и у пациентов с хроническим рассеянным склерозом [7]. При этом повреждение *Locus Coeruleus* способствует усилению симптомов при экспериментальном аутоиммунном энцефалите, тогда как повышение уровней норадреналина или его предшественников в этой структуре мозга смягчает течение заболевания [13]. Согласно данным литературы лечение мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефалитом с помощью виндамина виндебурнола, способствующего повышению уровня норадреналина и его метаболизма в *Locus Coeruleus*, приводит к снижению симптомов данного заболевания [8]. Таким образом, выявлены индикаторы, хотя и немногочисленные, показывающие, что уровень норадреналина в *Locus Coeruleus* в модели рассеянного склероза снижен, а стимуляция его метаболизма при введении виндебурнола может улучшить симптомы данного заболевания. Это косвенно подтверждают и результаты

морфологических исследований в мозге крыс, которым вводили виндебуринол в модели ЭАЭ.

Список литературы

1. Szabadi E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system // J. Psychopharmacol. 2013. Vol. 27. P. 659–693.
2. Kappos L., Radue E.W., O'Connor P. et al. A placebo-controlled study of oral Fingolimod in relapsing multiple sclerosis // N. Engl. J. Med. 2010. Vol. 362. P. 387-401.
3. Cohen J.A., Barkhof F., Comi G. et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis // N. Engl. J. Med. 2010. Vol. 362. P. 402-415.
4. Groom A.J., Smith T., Turski L. Multiple sclerosis and glutamate // Ann N.Y. Acad. Sci. 2003. Vol. 993. P. 229–275.
5. Centonze D., Muzio L., Rossi S. et al. Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis // J. Neurosci. 2009. Vol. 29. P. 3442–3452.
6. Carnevale D., De Simone R., Minghetti L. Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative disease: role of cholinergic and noradrenergic system // CNS Neurol. Disord. Drug. Targets. 2007. Vol. 6. P. 388–397.
7. Musgrave T., Benson C., Wong G. et al. The MAO inhibitor phenelzine improves functional outcomes in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) // Brain Behav. Immun. 2011. Vol. 25. P. 1677–1688.
8. Polak P.E., Kalinin S., Feinstein D.L. Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis // Brain. 2011. Vol. 134. P. 665–677.
9. Polak P.E., Kalinin S., Braun D. et al. The vincamine derivative vindeburnol provides benefit in a mouse model of multiple sclerosis: effects on the Locus coeruleus // J. Neurochem. 2012. Vol. 121. P. 206–216.
10. Degano A.L., Roth G.A. Passive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis in Vistar rats: dissociation of clinical symptoms and biochemical alterations // J. Neurosci. Res. 2000. Vol. 59 (2). P. 283-290.
11. Combs D.J., D'Alecy L.G. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol // Stroke. 1976. Vol. 7 (5). P. 485-488.
12. Okuda T., Baes A.U., Nishijima W., Okada M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed // Water Research. 1999. Vol. 33 (15). P. 3373-3378.
13. Simonini M.V., Polak P.E., Sharp A. et al. Increasing CNS noradrenaline reduces EAE severity // J. Neuroimmune Pharmacol. 2010. Vol. 5. P. 252-259.

