

ни равна  $24,5 \pm 3,4$  мкм, в области поверхности почечного сосочка этот показатель составляет  $32,4 \pm 4,2$  мкм, поперечный диаметр волокна – 2-3 мкм.

Процентное содержание основного вещества соединительной ткани равна  $10,0 \pm 2,4\%$  (поверхность почечного сосочка).

Таким образом, в работе представлены данные, характеризующие регионарные особенности конструкции фиброзной капсулы почек человека, а также стромального компонента паренхимы органа.

## Литература

1. Макаров А.К. Сосудисто-тканевые взаимодействия в почке при проведении экспериментальных операций // В: Мат. Украинской республиканской конференции анатомов, гистологов и эмбриологов. Харьков, 1976. – С.71.
2. Макаров А.К. Изменчивость соединительнотканного комплекса почки (экспериментальное исследование). Автореф. докт. дтсс. – М., 1979. – 34 с.

## РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У МЫШЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ

\*Мельник Н. А.<sup>1</sup>, Лабунец И. Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра гистологии и эмбриологии, Национальный медицинский университета им. А. А. Богомольца  
Лаборатория экспериментального моделирования отдела клеточных и тканевых технологий  
Институт генетической и регенеративной медицины, Киев, Украина

<sup>2</sup>Лаборатория экспериментального моделирования, Отдел клеточных и тканевых технологий  
Институт генетической и регенеративной медицины, Киев, Украина  
Corresponding author: melnikn@mail.ru

### Abstract

#### REACTIVE CHANGES OF THE NEURONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND BEHAVIORAL CHANGE IN MICE WITH MODEL OF DEMYELINATION

**Background:** To assess the relationship of behavioral and morphological and functional status of the neurons of the brain and spinal cord of different lines of mice with the “cuprizone” model of demyelination.

**Material and methods:** Adult mouse of lines C57Bl/6, 129/Sv and FVB daily for three weeks received “cuprizone” with food. The animals were evaluated for morphometric analysis determined the proportion of neurons with unmodified, and with moderate and severe structural changes (staining of histological specimens of toluidine blue) and behavioral reactions (open field test).

**Results:** In morphological investigations we observed structurally modified neurons in the gray matter of the cerebrum, cerebellum and the spinal cord of all experimental groups of mice, but in mice line 129/Sv damaged of neurons more intensive. In laboratory mice of all lines of the oppressed behavioral activity and intensity which have clear features. Have a stronger psychological impact “cuprizone” to most behavioral responses in mice line 129/Sv.

**Conclusions:** The severity of violations of behavioral and pathological changes of neurons in the CNS after taking “cuprizone” are harmonized and have clear differences. Experimental model with “cuprizone” can be used as a model the demyelination neurological degeneration and breaches of conduct.

**Key words:** mouse, “cuprizone”, behavioral reactions, demyelination, remyelination.

### Актуальность

Демиелинизирующие заболевания центральной и периферической нервной систем человека – это заболевания, при которых основным патоморфологическим признаком является разрушение миелиновой оболочки нервных волокон и, как результат, нарушение проведения нервных импульсов и двигательной активности [4, 6].

Наиболее распространенным демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), является рассеянный склероз (РС), однако, все больше исследователей считают РС нейродегенеративным заболеванием, так как повреждение нейронов может способствовать нарушению структуры и функционирования отростков этих клеток и формированию неврологических симптомов, характерных для РС человека [3,8].

В последнее время для экспериментального моделирования демиелинизации используется купризон. Купризон [бис(циклогексанон)-оксальдигидразона] – медный хелатор, который у мышей разных линий, крыс популяции Вистар, при пероральном введении, оказывает выборочное токсическое действие на зрелые олигодендроциты, что сопровождается их апоптозом и демиелинизацией нервных волокон [10]. Показано изменения чувствительности ЦНС мышей к влиянию купризона в зависимости от их линии [2].

Цель работы – оценить связь морфо-функционального состояния нейронов коры (головного мозга), мозжечка и спинного мозга и особенностей поведенческих реакций у мышей их разных линий при купризоновой модели демиелинизации.

### Материал и методы

Работа выполнена на самках взрослых инбредных мышей (4-4,5 мес) линий C57Bl/6 (генотип H-2<sup>b</sup>), FVB «дикого типа» (генотип H-2<sup>a</sup>), 129/Sv (генотип H-2<sup>b</sup>) из вивария ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ». Мыши линии C57Bl/6 широко используются в экспериментальном моделировании демиелинизации с помощью купризона, FVB – чувствительны к некоторым типам вирусов и характеризуются возрастными изменениями функций надпочечников, 129/Sv – высокочувствительны к действию половых гормонов [8, 10].

Животные находились в стандартных условиях вивария при световом режиме 12:12. Биологический материал для исследований брали у животных в утренние часы под эфирным наркозом.

Все работы с экспериментальными животными проводили с соблюдением «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и другой научной целью» [7].

Мыши подопытных групп (n=24) получали купризон (Sigma-Aldrich, Германия) с пищей (из расчета 0,2 % от суточного корма), ежедневно, в течение трех недель. При таком курсовом приеме препарата у мышей наблюдали демиелинизацию нервных волокон в ЦНС [8, 10].

Группы контрольных мышей (n=15) были на обычном рационе вивария. Подопытных животных взвешивали до и через 7, 14 и 21 сутки после начала приема купризона, поскольку потеря веса – одно из проявлений токсического влияния купризона на организм животных [10]. Одновременно взвешивали мышей контрольных групп.

Для морфологических исследований ЦНС мышей использовали окрашивание гистологических срезов головного мозга (кора), мозжечка и спинного мозга (поясничной отдел) толуидиновым голубым (по Нисслю) через три недели употребления купризона. Этот краситель выборочно связывается с мембранными структурами, что позволяет диагностировать на уровне световой микроскопии состояние ядра и цитоплазмы нейронов, а именно хроматофильной субстанции [2,3].

При морфометрическом анализе определяли долю неизмененных нейронов и нейронов с умеренными и выраженными структурными изменениями. Выявленные нарушения проявлялись в изменении формы тела и ядра нейрона, особенностей размещения хроматофильной субстанции [3]. Умеренные изменения нейронов являлись реактивными на повреждения и характеризовались смещением ядрышка к ядерной оболочке и увеличением размеров ядра; цитоплазма тел нейронов была гипохромной – хроматофильное вещество не определялось. Выраженные изменения нейронов были деструктивными, апоптотическими и характеризовались уменьшением размеров ядра, контуры которого имели неправильную форму, ядрышко не визуализировалось. Размеры перикарионов были значительно уменьшены и гиперхромны.

Для изучения у животных поведенческих реакций использовали тест «открытого поля», который является одним из адекватных критериев оценки двигательных нарушений при использовании нейротоксинов, в том числе купризона [9].

Тест также дает возможность оценить у животных исследовательскую и эмоциональную активность [1].

Регистрировали, в течение трех минут, количество пересеченных квадратов животными (горизонтальная двигательная активность, ГДА), вертикальных стоек с опорой и без опоры на стенку (вертикальная двигательная активность, ВДА), заглядываний в норки (норковый рефлекс), фекальных болюсов (эмоциональное поведение). Норковый рефлекс вместе с ВДА характеризует исследовательскую деятельность животного. Поведение оценивали до и через три недели употребления купризона или обычного корма.

При статистическом анализе результатов использовали t-критерий Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

После завершения приема купризона, мышцы всех линий существенно теряли в весе, в отличие от контрольных групп, что соответствует данным литературы [10].

В сером веществе коры головного мозга, мозжечка и спинного мозга мышей всех линий после приема купризона были определены структурно измененные нейроны; при этом у мышей линии 129/Sv изменения нейронов были наиболее выражены. При морфометрическом анализе установлено, что структурные изменения нейронов ЦНС подопытных мышей исследованных линий имеют разный характер – от реактивных (умеренных) до выраженных (деструктивных). Процентные соотношения неизмененных тел нейронов, а также нейронов с разным характером изменений в серого вещества головного и спинного мозга у мышей линии 129/Sv представлены в таблице 1.

Показано, что процентные соотношения нейронов с разными структурными изменениями имеют локальные особенности. Локальные изменения нейронов от умеренных и до выраженных наиболее заметны в коре головного мозга и в ганглионарном слое коры мозжечка. Так, наличие участков с большим количеством нейронов с умеренными изменениями свидетельствует об активации синтетических процессов в ответ на повреждение [3].

Таблица 1

### Процентное соотношение тел нейронов серого вещества головного и спинного мозга у экспериментальных групп мышей линии 129/Sv

Экспериментальные группы	Неизмененные нейроны, %	С умеренными изменениями, %	С выраженными изменениями, %
<b>Кора головного мозга</b>			
Контроль	88	12	0
Купризон	2	35	63
<b>Клетки Пуркинье мозжечка</b>			
Контроль	86	14	0
Купризон	15	49	36
<b>Поясничный отдел спинного мозга</b>			
Контроль	93	7	0
Купризон	0	6	94

Увеличение и набухание ядра при незначительных повреждениях нейронов, по-видимому, связано с компенсаторной реакцией нейрона, направленной на увеличение площади поверхности ядра, что необходимо для синтеза группы белков, которые участвуют в восстановлении повреж-

денных структур нейрона. Хроматолиз в основном указывает на активацию белкового синтеза в клетке. Признаком синтетической активности нейрона является также изменение состояния ядрышка, которое при активации синтетических процессов увеличивается в размерах, изменяет свою локализацию, смещаясь к ядерной оболочке. В перикарионах нейронов с умеренными изменениями (увеличение размеров ядра, смещение ядрышка к ядерной оболочке и хроматолиз) происходит активация восстановительных процессов, что особенно выражается в нейронах ЦНС.

Не исключено, что у мышей линии 129/Sv в отдельных участках серого вещества головного мозга повреждение нейронов происходило в более ранние сроки и опережало начало демиелинизации, которая, по данным авторов, развивается через три недели приема купризона с наибольшими проявлениями через 5 недель [12].

Значительные повреждения нейронов, которые характеризуют апоптоз, мы наблюдали в спинном мозге подопытных мышей линии 129/Sv.

В литературе есть данные о возможных механизмах апоптоза не только зрелых олигодендроцитов, но и нейронов в областях демиелинизации коры головного мозга животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом. Есть мнение, что дегенерация нейронов может иметь отношение или следовать за активацией микроглии, которая секретирует провоспалительные цитокины (туморнекротический фактор-альфа, интерферон-гамма), которые являются патогенетическим звеном развития РС [8,10].

Таким образом, полученные результаты морфологических исследований свидетельствуют о том, что у мышей, которые получали купризон – наблюдаются структурные изменения в нейронах коры головного мозга, ганглионарного слоя мозжечка и сером веществе поясничного отдела спинного мозга с наибольшим повреждением нейронов спинного мозга у мышей линии 129/Sv. Это, возможно, связано с особенностями их нейрохимического и эндокринного баланса. Таким образом, купризонная модель демиелинизации может характеризоваться как нейродегенеративная.

*Поведенческие реакции у мышей.* У мышей выявлены определенные линейные отличия проявлений исходного поведения: ГДА, ВДА ориентировочно-исследовательской деятельности и эмоциональной активности. После употребления купризона у мышей всех линий наблюдается угнетение практически всех исследованных поведенческих реакций, проявления и интенсивность которых имели межлинейные особенности. Так, существенное снижение ГДА характерно для мышей линий 129/Sv и C57Bl/6, ВДА – FVB и C57Bl/6 (соответственно в 1,3 и 2,4 раза), «норкового» рефлекса – 129/Sv и C57Bl/6 (соответственно в 4,5 и 2,3 раза), эмоциональной активности – у мышей всех линий, особенно FVB и 129/Sv.

Из данных литературы известно, что инбредные линии мышей различаются по поведенческим реакциям; это отчасти связано с особенностями их нейрохимического и эндокринного баланса [5]. Не исключено существование подобных различий и в условиях употребления купризона.

По нашим данным, мыши линии C57Bl/6 чувствительны не только к угнетающему влиянию купризона на двигательную активность [8,10], но и на все исследованные проявления поведения. При сравнении поведенческих реакций у мышей этой линии и линии 129/Sv оказалось, что у последних купризон оказывает более выраженное угнетающее влияние на ориентировочно-исследовательское и эмоциональное поведение, а наименьшее угнетающее влияние препарата на поведение обнаружено у мышей линии FVB.

Результаты морфологических исследований у мышей в значительной степени согласуются с данными оценки поведенческих реакций. Так, в обеспечении двигательной активности мотонейроны спинного мозга взаимодействуют с рядом структур головного мозга, в частности, с корой и мозжечком. Последствиями нарушений функционирования коры головного мозга могут быть изменения как ГДА, так и ВДА. Кроме того, кора головного мозга, совместно с гипоталамусом и структурами лимбической системы, является важным компонентом эмоциональных проявлений поведенческих реакций. Указанные выше данные литературы дают нам основание полагать, что проявления двигательных нарушений и эмоционального поведения, которые разви-

ваются в условиях приема купризона, являются результатом не только демиелинизации ЦНС [11], но и связаны с повреждением нейронов коры головного мозга, клеток Пуркинье мозжечка и спинного мозга.

### Выводы

У мышей под влиянием купризона изменяется структура нейронов коры головного мозга, клеток Пуркинье мозжечка и поясничного отдела спинного мозга, а также угнетаются поведенческие реакции. Выраженность нарушений патологических изменений нейронов ЦНС и поведенческих реакций согласованы и имеют межлинейные различия. Купризоновая модель демиелинизации является также адекватной экспериментальной моделью нейродегенерации и нарушений поведения, поэтому может быть полезной при изучении патогенеза РС и обоснования подходов к его терапии.

### Литература

1. Амикишиева А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование. Вестник ВО-ГиС. 2009; 13(3):529-542.
2. Лабунец И.Ф., Мельник Н.А., Кузьмина И.А., Бутенко Г.М. Способ моделирования структурных изменений нейронов центральной нервной системы при демиелинизирующих заболеваниях. Патент № 94458 и UA МПК G09B 23/28 (2006.01) Опубликовано 10.11.2014. Бюл. № 21. 3 с.
3. Мельник Н. А. Структура некоторых органов нервной и иммунной систем в условиях демиелинизации и ремиелинизации. Автореф. дисс... д -ра мед. наук. – К., 2005. 38 с.
4. Пивнева Т.А. Механизмы демиелинизации при рассеянном склерозе. Нейрофизиология. 2009; 41(5):429-37.
5. Пишель И. Н., Дубилей Т. А., Рушкевич Ю. Е. Полиморфизм возрастных иммунологических, эндокринных и нейрхимических изменений у мышей разных линий. Пробл. старения и долголетия. 2006; 15(4):310–318.
6. Суслина З. А., Завалишин И. А. Рассеянный склероз: от представлений о патогенезе к лечению. Неврологический вестник. 2010; 1:6-8.
7. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации. Под общ. ред. Ю. Б. Белоусова. М.; 2005. 156 с.
8. Acs P, Kalman B. Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. *Methods Mol Biol.* 2012; 900:403-31.
9. Franco-Pons N., Torento M., Colomina M.T., Vilella E. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology Letters.* 2007; 169(3):205-213.
10. Kipp M.I., Clarner T., Dang J., Copray S., Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol.* 2009; 118(6):723-36.
11. Wegener C., Esiri M.M., Chance S.A. Neurocortical neuronal, synaptic and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology.* 2006; 67:960-967.
12. Xu H., Yang H.J., Zhang Y., Clough R., Browning R., Li X.M. Behavioral and neurological changes in C57Bl/6 mice exposed to cuprizone. *Behav. Neurosci.* 2009; 123:418-429.