

РАЗДЕЛ 1 – ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ PART 1 – RESEARCH ARTICLES

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ IBA1-АНТИГЕНА КЛЕТКАМИ МИКРОГЛИИ СПИННОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ КАК МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Гущина С.В.^{1,2}, Бо К.², Балашов В.П.¹, Панков В.Г.¹, Балашов А.В.¹

¹Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия; ²Колледж Королевы Марии Университета Лондона, Лондон, Великобритания, e-mail: sguschin@mail.ru

THE FEATURES OF THE EXPRESSION OF IBA1 PROTEIN ON THE MICROGLIAL CELLS OF THE SPINAL CORD OF MICE WITH THE EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AS A MODEL OF THE MULTIPLE SCLEROSIS

Gushchina SV^{1,2}, Bo K², Balashov VP¹, Pankov VG¹, Balashov AV¹

¹Ogarev National Research Mordovian State University, Saransk, Russia; ²Queen Mary's College of the University of London, London, United Kingdom, e-mail: sguschin@mail.ru

Для цитирования:

Гущина С.В., Бо К., Балашов В.П., Панков В.Г., Балашов А.В. Особенности экспрессии Iba1-антигена клетками микроглии спинного мозга мышей при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите как модели рассеянного склероза// Морфологические ведомости.- 2018.- Том 26.- № 2.- С. 8-11. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).02.8-11](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).02.8-11)

For the citation:

Gushchina SV, Bo K, Balashov VP, Pankov VG, Balashov AV. The features of the expression of Iba1 protein on the microglial cells of the spinal cord of mice with the experimental allergic encephalomyelitis as a model of the multiple sclerosis. *Morfologicheskie vedomosti – Morphological Newsletter*. 2018 June 30;26(2):8-11. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.18\(26\).02.8-11](https://doi.org/10.20340/mv-mn.18(26).02.8-11)

Резюме: Рассеянный склероз является наиболее распространенным аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы (далее - ЦНС). Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (далее - ЭАЭ) является его широко используемой животной моделью. Патология РС-ЭАЭ в значительной степени модулируется микроглией, резидентными иммунными компетентными клетками ЦНС. Цель исследования - на животной модели РС - острой и хронической форме ЭАЭ, изучить динамику изменений микроглиальной популяции спинного мозга у мышей методом иммунофлуоресцентного анализа. Было обнаружено, что Iba1⁺ клетки с морфологией покоящейся микроглии равномерно распределены в спинном мозге контрольных мышей. В отличие от нормы, активированные микроглиоциты были более выражены в сером веществе спинного мозга мышей с острой формой ЭАЭ. Крупные микроглиальные клетки образовывали скопления в сером веществе - «конгломераты», предположительно атакуя другие клетки спинного мозга. В спинном мозге мышей с хронической формой ЭАЭ наблюдалась другая картина распределения микроглиальной популяции - клетки локализовались в белом веществе, предположительно в местах демиелинизации. Таким образом, при острой форме ЭАЭ в спинном мозге мышей происходит активация и пролиферация микроглиоцитов, преимущественно в сером веществе. Количество активированной микроглии снижается в хронической стадии ЭАЭ с локализацией в зонах демиелинизации в белом веществе. Полученные результаты указывают на то, что морфофункциональные изменения микроглиальных клеток спинного мозга мышей в условиях развития ЭАЭ и динамика ответов микроглии в данных условиях может в значительной степени определять феноменологию патофизиологических процессов при ЭАЭ. Следовательно, понимание участия микроглии в РС может открыть новые перспективные пути терапевтического вмешательства.

Ключевые слова: микроглия, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, спинной мозг, Iba1⁺-клетки

Summary: Multiple sclerosis (MS) is the most common autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is its widely used corresponding animal model. MS/EAE pathology are substantially modulated by microglia, the resident immune competent cells of the CNS. The aim - on acute and chronic form of EAE in mice, to study the dynamics of changes in the microglial population of the spinal cord by immunofluorescence analysis. We used activated microglia marker Iba1⁺ to characterize distribution of microglia/macrophages in spinal cord of normal mice and mice with acute and chronic model of EAE. We found that Iba1⁺ cells with morphology of resting microglia equally distributed in the normal spinal cord of control mice. In contrast to controls, microglia activation was more pronounced in the gray matter of acute spinal cords compare to the white matter. Amoeboid microglial cells formed some form of aggregations in the gray matter - «conglomerates», presumably attacking other cells of the spinal cord. In chronic spinal cord, we observed different pattern of distribution of microglial population - the cells localized in the white matter, presumably in the sites of demyelination. Hereby, in spinal cord of mice with acute form of EAE, activation and proliferation of microglial cells take place, mainly in the gray matter. The amount of activated microglia decreases in the chronic stage of the EAE with localization in the areas of demyelination in the white matter. The obtained results indicate that the morphological-functional changes in the microglial cells of the mouse spinal cord under the conditions of development of the EAE and the dynamics of the microglia responses under these conditions might determine the phenomenology of pathophysiological processes in the EAE. Hence, understanding microglia involvement in MS offers new promising paths for therapeutic intervention.

Key words: microglia, experimental allergic encephalomyelitis, spinal cord, Iba1⁺-cells

Введение. Рассеянный склероз (далее - РС) – аутоиммунное воспалительное заболевание, характеризующееся прогрессирующей демиелинизацией аксонов в результате действия иммунных клеток и с постепенным развитием моторной и сенсорной неврологической дисфункции [1]. Несмотря на многочисленные исследования, точные структурные и патофизиологические механизмы РС до сих пор остаются в значительной степени неясными. Уже давно постулируется, что воспалительный ответ, вызванный Т-клетками (периферически активированными Т-хелперами 1 (T1⁺) или T17⁺),

способными мигрировать в центральную нервную систему (далее - ЦНС), инициирует цепочку событий, приводящих к прогрессирующей демиелинизации и повреждению аксонов [2]. Однако существует множество доказательств того, что клетки врожденной иммунной системы (микроглия, дендритные клетки, естественные киллерные клетки и тучные клетки) не менее важны для инициирования и поддержания воспаления, в том числе и при РС [3]. Микроглиоциты (резидентные для нервной ткани иммунные эффекторные клетки ЦНС миеломоноцитарного ряда) – один из главных эффекторов врожденного иммунитета, опосредующих воспалительные реакции в ЦНС, в норме представляют собой мелкие клетки с удлинённым ядром и тонкими, разветвленными клеточными отростками. Микроглиоциты реагируют на действие широкого спектра патологических факторов быстрым изменением клеточного метаболизма и своей морфологии: они активируются и трансформируются в клетки с фенотипом классического макрофага с формой тела от круглого до овального с короткими широкими амёбовидными выростами. В зависимости от интенсивности активации микроглиоциты могут оказывать нейропротективный или цитотоксический эффект. В последнее время микроглия рассматривается как активный участник патофизиологических процессов при РС [4].

Цель исследования – на животной модели рассеянного склероза - острой и хронической форме экспериментального аллергического энцефаломиелита, изучить динамику изменений микроглиальной популяции спинного мозга у мышей методом иммунофлуоресцентного анализа.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 24 белых лабораторных мышах (обоих полов, возраст 8 недель). Протокол эксперимента и все вмешательства были одобрены локальным этическим комитетом медицинского института Мордовского государственного университета. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (далее - ЭАЭ) индуцировали введением животным энцефалитогенной смеси [5]. Мышам вводили подкожно в основание хвоста 1 мг рекомбинантного мышинного MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein), эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда и *Mycobacterium butyricum* в начале эксперимента и повторно на 7-й день. Животные были клинически оценены на наличие параличей и парезов по следующей шкале: 1 – парез хвоста, 2 – паралич хвоста и односторонний парез задней конечности, 3 – полный паралич хвоста и паралич задних конечностей, 4 – тетраплегия, 5 – преморбидное состояние или смерть. Моделью острой ЭАЭ считались животные с клинической оценкой тяжести заболевания 4 (полный паралич задних конечностей в течение 2-х дней), проявляющейся на 15-18 день после первой инокуляции. Для проведения иммунофлуоресцентного анализа спинного мозга контрольных животных и мышей на разных сроках развития ЭАЭ (15-18 день для острой и 90 день для хронической модели ЭАЭ) под общим гексеналовым наркозом (40,0 мг/кг) выводили из опыта транскардиальной перфузией охлажденного 4% раствора параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4). После извлечения спинной мозг помещали в раствор фиксатора на 6–8 часов при 4°C. После криопротекции (15% и 30% сахара в 0,1 М фосфатном буфере) в течение 24 часов материал заливали в среду OCT (Optimal Cutting Temperature) и хранили при -80°C. Срезы люмбального отдела спинного мозга толщиной 16 мкм изготавливали на замораживающем микротоме OTF5000 (Bright, Великобритания). В качестве первичных антител использовали коммерческие антитела на Iba1+ (Ionized calcium-binding-adaptor molecule 1) (козы, «Novus» Co, 1:400). Визуализацию первичных антител осуществляли с помощью соответствующих вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами Alexa Fluor 488 (ослиные против козьих Molecular Probes, 1:1000) [6]. Ядра докрашивали путем инкубации срезов с DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Molecular Probes) 3-5 мин. Количественную характеристику окраски срезов спинного мозга проводили с использованием программы анализа изображений ImageJ. Полученные данные обработаны статистически с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение. Клинические признаки ЭАЭ возникали на 13-14-е сутки после иммунизации у 50% животных. Морфологические нарушения были отмечены у 100% животных вне зависимости от клинической выраженности заболевания. Гистологическое исследование спинного мозга мышей с ЭАЭ, проведенное в разные сроки наблюдения, позволило проследить динамику изменения микроглиальной популяции спинного мозга и сопоставить клиническую стадию ЭАЭ с морфологическими данными. Для идентификации микроглиальных клеток в спинном мозге контрольных мышей и мышей с острой и хронической моделями ЭАЭ было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов спинного мозга с помощью антител против маркера активированных микроглиоцитов/макрофагов Iba1+. Iba1 - положительные клетки спинного мозга контрольных мышей имели типичную морфологию покоящейся микроглии: равномерно распределенные на срезе немногочисленные мелкие клетки с несколькими длинными и тонкими отростками (рис. 1, верхний ряд).

На стадии острого ЭАЭ плотность Iba1 - положительных клеток спинного мозга мышей значительно увеличивалась (рис. 1, средний ряд). Микроглиальные клетки серого и белого вещества спинного мозга переходили в активное состояние, характеризующееся увеличенным округлым телом клетки и короткими утолщенными отростками (амёбовидная микроглия). При этом отмечалось неравномерное распределение микроглиальной популяции в спинном мозге: более высокая плотность активированной амёбовидной микроглии наблюдалась в сером веществе по сравнению с белым. Крупные микроглиальные клетки образовывали скопления в сером веществе - «конгломераты», предположительно атакующие другие клетки спинного мозга (нейроны, олигодендроциты). Данный феномен наблюдался и другими авторами в различных условиях развития дегенеративных процессов в структурах ЦНС, что приводило к гибели «атакуемых» нейронов [7]. Во всех исследованных образцах спинного мозга уже на стадии острого ЭАЭ отмечалась статистически достоверное увеличение Iba1 - положительного сигнала как в сером так и в белом веществе ($p < 0,05$), причем его величина была в 7,5 раз больше в сером веществе по сравнению с белым (рис. 2).

При хронической форме ЭАЭ количество микроглии снижалось с изменением морфологии клеток: у большинства клеток форма тела становилась более близкой к покоящейся (рис. 1, нижний ряд). Изменялась и картина распределения микроглиальной популяции в спинном мозге: более высокая плотность микроглии наблюдалась в белом веществе по сравнению с серым. Микроглиоциты белого вещества аккумулировались преимущественно в периферической его части,

предположительно в очагах демиелинизации, причем клетки здесь характеризовались активированным амебовидным строением тела.

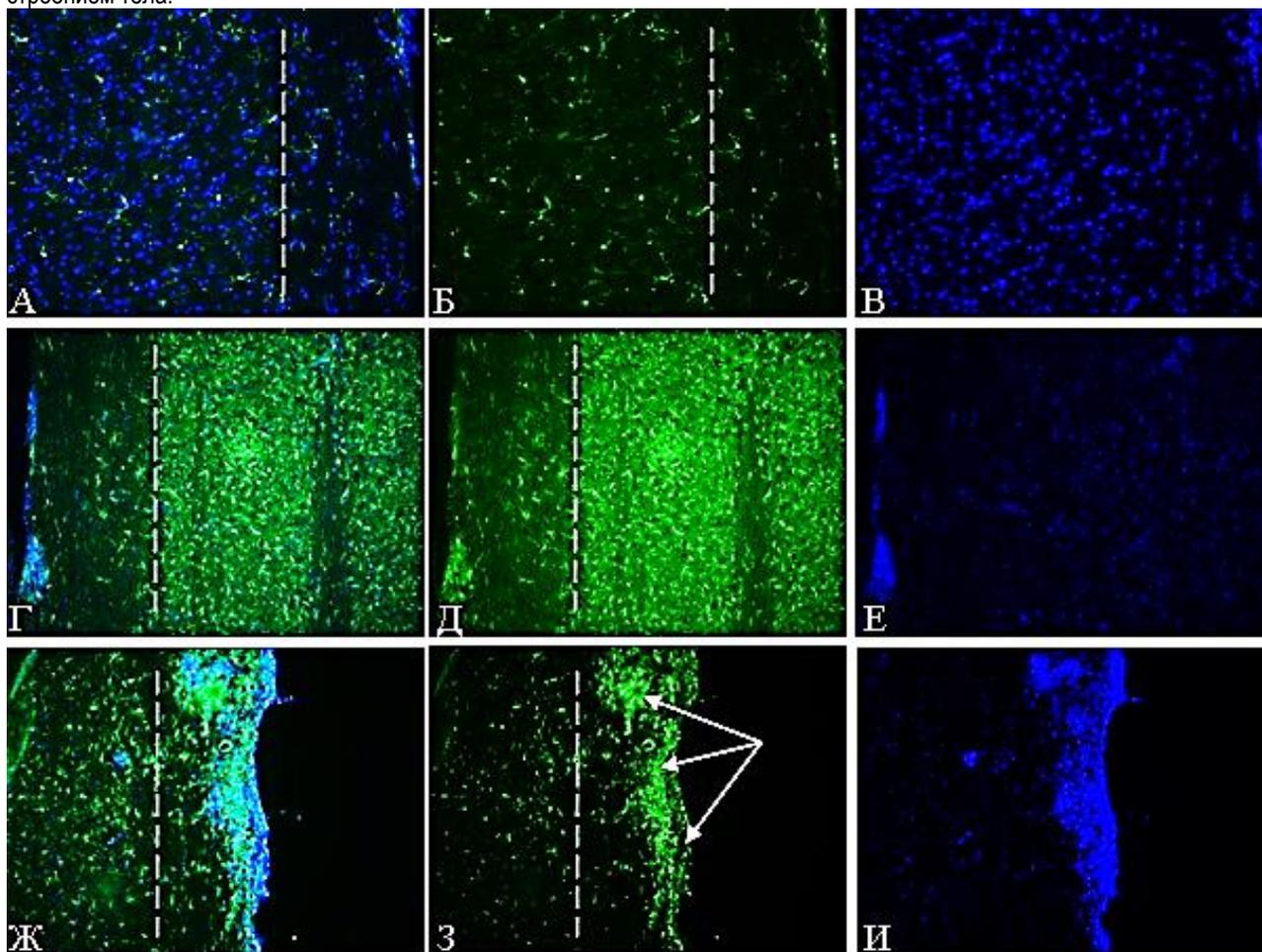


Рис. 1. Распределение популяции микроглиоцитов, экспрессирующих Iba-1 в спинном мозге мышей в норме и при моделировании острой и хронической форм ЭАЭ. Вертикальными пунктирами белого цвета обозначены границы между серым и белым веществом.

1. Животные группы контроля: А - совмещенное изображение Iba-1⁺ (зеленый) и DAPI (синий); Б - мелкие микроглиальные клетки Iba-1⁺ с типичной морфологией, покоящейся микроглии в спинном мозге мыши в норме, клеточные отростки длинные, тонкие и ветвящиеся; В - ядра клеток окрашены DAPI. Ув.: x20.
2. Активированная микроглия в белом и сером веществе мышей при острой форме ЭАЭ: Г - совмещенное изображение Iba-1⁺ (зеленый) и DAPI (синий); Д - активированные крупные микроглиальные клетки Iba-1⁺, с типичной морфологией амeboида с короткими утолщенными процессами сосредоточены преимущественно в сером веществе и образуют скопления - «конгломераты» (стрелка); Е - ядра клеток окрашены DAPI. Ув.: x10.
3. Активированная микроглия в белом и сером веществе мышей при хронической форме ЭАЭ: Ж - совмещенное изображение Iba-1⁺ (зеленый) и DAPI (синий); З - микроглиальные клетки Iba-1⁺ серого вещества больше похожи на покоящиеся, клетки амeboидного типа сосредоточены в области белого вещества в зонах демиелинизации (стрелки); И - ядра клеток окрашены DAPI. Ув.: x10.

Количественный анализ срезов спинного мозга на стадии хронического ЭАЭ показал статистически достоверное увеличение Iba1 - положительного сигнала в белом веществе в 2,8 раза больше ($p < 0,05$), чем в сером веществе (рис. 2). Полученные результаты указывают на то, что морфофункциональные изменения микроглиальных клеток спинного мозга мышей в условиях развития ЭАЭ и динамика ответов микроглии в данных условиях могут в значительной степени определять феноменологию патофизиологических процессов при ЭАЭ.

Роль микроглии в развитии РС/ЭАЭ заключается в способности продуцировать вещества (цитокины и хемокины), как поддерживающих физиологический гомеостаз мозга, так и усиливающих патологические состояния [8], а также, по-видимому, в непосредственном повреждении структурных элементов мозга (нейронов и их отростков) путем фагоцитоза [9]. Наши результаты показывают, что пролиферация микроглии, возможно, является одним из ключевых моментов в развитии патофизиологических процессов при ЭАЭ. Это указывает на важную роль врожденного иммунного звена ЦНС, в частности микроглии, в прогрессировании заболевания и необходимость разработки дополнительных методов терапии при РС, направленных на модулирование микроглиальной популяции ЦНС, так как существующая в настоящий момент иммуномодулирующая терапия не позволяет полностью остановить прогрессирование заболевания [10-11].

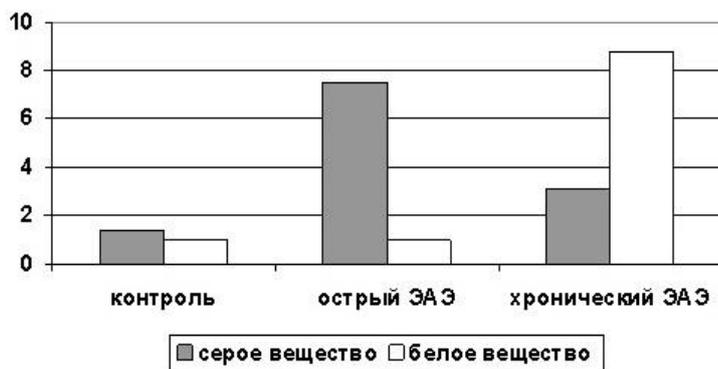


Рис. 2. Распределение популяции микроглиоцитов в спинном мозге у мышей контрольной группы и в условиях моделирования острой и хронической форм ЭАЭ (в относительных единицах).

Примечания: * - отличия от соответствующего значения в контроле достоверны при $p < 0,05$, # - отличия от значения показателя в сером веществе достоверны при $p < 0,05$.

Заключение. Таким образом при острой форме ЭАЭ в спинном мозге у мышей происходит активация и пролиферация микроглиоцитов, преимущественно в сером веществе. Количество активированной микроглии снижается в хронической стадии ЭАЭ с локализацией в зонах демиелинизации в белом веществе. Полученные результаты указывают на то, что морфофункциональные изменения микроглиальных клеток спинного мозга мышей в условиях развития ЭАЭ и динамика ответов микроглии в данных условиях может в значительной степени определять феноменологию патофизиологических процессов при ЭАЭ. Следовательно, понимание участия микроглии в РС может открыть новые перспективные пути терапевтического вмешательства.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Sep 15;15(9):545-58. DOI:10.1038/nri3871.
2. Legroux L, Arbour N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 Dec;10(4):528-46. DOI: 10.1007/s11481-015-9614-0.
3. Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H. Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *BRAIN.* 2017;140:1900–1913. DOI:10.1093/brain/awx113.
4. Goldmann TI, Prinz M. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:208093. DOI:10.1155/2013/208093.
5. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Meuth Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. *J Vis Exp.* 2014;86:51275. DOI:10.3791/51275.
6. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91:461–553. DOI:10.1152/physrev.00011.2010.
7. Yamada J, Nakanishi H, Jinno S. Differential involvement of perineuronal astrocytes and microglia in synaptic stripping after hypoglossal axotomy. *Neuroscience* 2011;182:1–10. DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.03.030.
8. Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2013;7:1-8. DOI:10.3389/fncel.2013.00044.
9. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP. Microglia and Multiple Sclerosis. *J Neurosci Res.* 2005;81:363–373 DOI: 10.1002/jnr.20482.
10. Trapp BD, Nave KA Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:247-69. DOI: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313.
11. Bojko A.N., Favorova O.O., Kulakova O.G., Gusev E.I. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза.- *Рассеянный склероз.- Под ред. Гусева Е.И., Завалишина И.А., Боjко А.Н.- М.: Real Tajm, 2011.- 528s.*

Авторская справка

Гущина С.В., доктор биологических наук, профессор кафедры цитологии, гистологии, эмбриологии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия; e-mail: sguschin@mail.ru

Бо К., доктор медицины и доктор философии, заведующая лабораторией молекулярных нейронаук отделения нейронаук и травмы, Колледж Королевы Марии Университета Лондона, Лондон, Великобритания; e-mail: sguschin@mail.ru

Балашов В.П., доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой цитологии, гистологии, эмбриологии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия; e-mail: bvr63@yandex.ru

Панков В.Г., аспирант кафедры цитологии, гистологии, эмбриологии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия; e-mail: pvg13rus@gmail.com

Балашов А.В., кандидат медицинских наук, доцент кафедры цитологии, гистологии, эмбриологии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия; e-mail: alexei11111985@yandex.ru