

МОРФОЛОГИЯ. ПАТОЛОГИЯ

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА

**В. Б. Писарев, А. М. Бутенко, А. В. Смирнов, Н. В. Хугоречкая, А. Я. Почепцов,
М. В. Шмидт, В. А. Глухов**

*Кафедра патологической анатомии ГОУ ВПО ВолГМУ,
Отдел общей и экспериментальной патологии ГУ ВНИЦ РАМН и АВО,
ГУ НИИ вирусологии РАМН им. Д. И. Ивановского*

Аннотация: в эксперименте на 12 белых мышах, внутрибрюшинно зараженных лихорадкой Западного Нила (ЛЗН), определены ультраструктурные изменения нейронов головного мозга. При этом обнаружены ультраструктурные повреждения нейронов, соответствующие стадийности инфекционного процесса более выраженные в вентральных отделах продолговатого мозга по сравнению с гипоталамусом.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, ультраструктурные изменения, головной мозг, продолговатый мозг, гипоталамус.

В последние годы происходит глобализация экосистемы вируса Западного Нила (ВЗН), передающегося насекомыми и вызывающего инфекционный процесс в организме человека, лихорадку Западного Нила (ЛЗН), важнейшим проявлением которой является менингоэнцефалит [11]. В 1999–2002 гг. в г. Волгограде и Волгоградской области была зарегистрирована крупная вспышка ЛЗН [2]. Наибольшую долю клинических вариантов течения в структуре заболеваемости ЛЗН составили 76 % случаев с поражением ЦНС, кото-

рые проявлялись параличами, парезами, приводили к инвалидизации и летальным исходам [1–3].

При энцефалите Западного Нила на светоптическом уровне отмечены обратимые и необратимые изменения в продолговатом мозге и других отделах ствола головного мозга [6–9]. При использовании электронной микроскопии в ядрах нейронов различных отделов головного мозга обнаружены конденсация и маргинация гетерохроматина с формированием крупных агрегатов электронно-плотного гранулированного материала

ла, т. е. отмечены ультраструктурные признаки апоптоза [4, 14]. В миелиновых нервных волокнах обнаружены участки разволокнения ламелл с очаговой деструкцией, набухание и лизис крист в митохондриях. Электронная плотность аксоплазмы была снижена, в отдельных осевых цилиндрах отмечено образование светлых крупных вакуолей [11]. Показаны ультраструктурные изменения элементов гемато-энцефалического барьера, которые были более выражены в астроцитах и эндотелии кровеносных капилляров на уровне продолговатого мозга [5]. Однако сравнительная характеристика ультраструктурных изменений в нейронах различных отделов головного мозга при экспериментальном воспроизведении ВЗН остается малоизученной.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявить ультраструктурные изменения нейронов головного мозга при экспериментальном воспроизведении ЛЗН.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование ЛЗН производилось в лаборатории арбовирусных инфекций (зав. лаб. проф. А. М. Бутенко) ГУ НИИ вирусологии РАМН им. Д. И. Ивановского (директор, академик РАМН Д. К. Львов). В работе использовали астраханский штамм (Астр 901), тождественный ВЗН африканской группы в разведении $10^{-3} \cdot 0,3$ мл.

Белые мыши-самцы (12 штук) в возрасте 30 суток были заражены ВЗН внутрибрюшинно. Животных под эфирным наркозом забивали на 2-е сутки (1-я группа, инкубационный период), на 6-е сутки (2-я группа животных с выраженной клинической симптоматики, период разгара заболевания). Контролем служили 6 белых мышей-самцов, содержащихся в стандартных условиях вивария. Эвтаназию производили под эфирным наркозом в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных".

Фиксацию кусочков головного мозга размером 1 мм^3 производили в течение 12 ч в 4%-м растворе параформа на 0,1М какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 2 часов в 1%-м растворе тетраокиси осмия на 0,1М какодилатном буфере (рН = 7,4) при температуре $+4^\circ \text{C}$ [10]. После промывки в нескольких порциях раствора какодилатного буфера материал подвергали дегидратации в спиртах возрастающей концентрации и заливали в смесь эпо-на и аралдита.

Ультратонкие срезы толщиной 50–90 нм получали на ультрамикротоме LKB-8800 и монтировали на медные сетки. После контрастирования в 2,5%-м растворе уранилацетата на 50%-м этаноле в течение 40 минут и 0,3%-м растворе цитрата свинца в течение 20 минут срезы изучались в электронном микроскопе Tesla BS-500 при ускоряющем напряжении 60 кВ. Фотодокументирование производили с использованием фотопластинок "Для ядерных исследований". Электронные микрофотограммы изготавливали на фотографической черно-белой бумаге "Унибром 160 БТ".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При электронно-микроскопическом исследовании дорсальных отделов (область ядра одиночного пути) продолговатого мозга мышей 1-й группы обнаружено преобладание мультиполярных нейронов с малыми и средними размерами перикарионов. Ядра нейронов характеризовались наличием большого количества эухроматина. Небольшие скопления гетерохроматина обнаруживались в виде скоплений со стороны внутренней мембраны ядерной оболочки. Ядрышко, как правило, имело средние размеры, локализовалось в центральной части ядра. Цитоплазма перикарионов нейронов характеризовалась наличием значительного количества цистерн гранулярной эндоплазматической сети. В вентральных отделах продолговатого мозга (область вентролатерального ретикулярного ядра) перикарионы большинства нейронов имели средние размеры. В ядрах отмечено преобладание эухроматина. В цитоплазме периферических отделов перикарионов обнаружено умеренное расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети.

В промежуточном мозге (дорсомедиальные отделы гипоталамуса) отмечено умеренное набухание митохондрий, расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети (ГЭПС). Наблюдалась очаговая вакуолизация периферических отделов перикарионов нейронов с образованием множества мелких мембранных везикул с содержимым низкой электронной плотности. В ядрах отмечено преобладание эухроматина. Ядрышко правильной округлой формы расположено в центральной части ядра.

При ультраструктурном исследовании дорсальных отделов продолговатого мозга мышей 2-й группы (забитых в период разгара на 6-е сутки заболевания) обнаружены изменения митохондрий различной выраженности. Степень повреждения данных органелл варьировала как в различных нейронах, так и в пределах одной клетки. Как правило, имело место набухание митохондрий с очаговым разрушением крист. Наряду с этим в цитоплазме встречались так называемые "юные" формы митохондрий: мелкие, с повышенной электронной плотностью матрикса. Большинство цистерн ГЭПС были умеренно расширены, количество их уменьшено. Отмечено появление в цитоплазме крупных вакуолей, образующихся из элементов эндоплазматической сети, а также мембранных комплексов в виде миелиноподобных телец.

В вентральных отделах продолговатого мозга обнаружены аналогичные изменения митохондрий. В средней и периферической зонах цитоплазмы перикарионов нейронов помимо крупных вакуолей с материалом низкой электронной плотности обнаруживались мелкие округлые вакуоли, располагающиеся небольшими группами. Отмечено наличие в отдельных перикарионах множество миелиноподобных телец, образованных осмиофильными ламеллярными структурами (см. рис.).

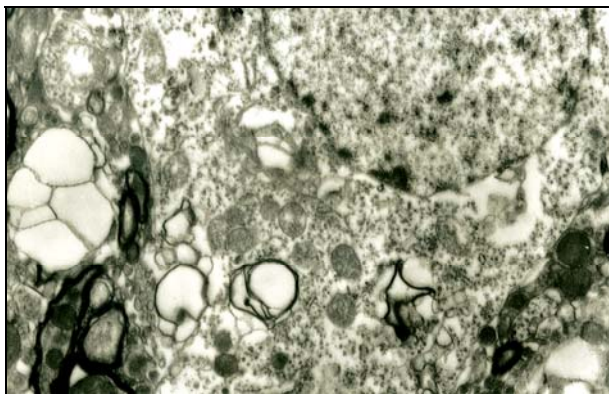


Рис. Ультраструктура нейрона вентрального отдела продолговатого мозга мыши при моделировании энцефалита, вызванного внутрибрюшинным введением вируса Западного Нила, 2-я группа. Электронная микрофотограмма. Ув. ×10000

В дорсомедиальных отделах гипоталамуса выявлен ряд неспецифических ультраструктурных изменений в перикарионах нейронов в виде вакуолизации и умеренного набухания митохондрий с частичным лизисом крист. В цитоплазме обнаружено большее количество расширенных цистерн ГЭПС, увеличена их протяженность. Форма отдельных цистерн стала дугообразной с образованием гигантских вакуолей. Однако в целом вакуолизация цитоплазмы нейронов носила менее выраженный характер, чем на уровне продолговатого мозга. В ядрах некоторых нейронов выявлены глубокие инвагинации кариолеммы без расширения перинуклеарного пространства. В отдельных нейронах отмечена маргинация гетерохроматина.

Обнаруженные ранее на светооптическом уровне в инкубационном периоде ЛЗН в нейронах коры и ствола головного мозга признаки слабо выраженной гидропической дистрофии и наличие незначительного перипеллюлярного отёка [1, 2] подтверждаются при электронно-микроскопическом исследовании гипоталамуса и продолговатого мозга. Выявление помимо умеренной вакуолизации цитоплазмы перикарионов ультраструктурных признаков повреждения митохондрий свидетельствует о нарушении энергетического обмена в нейронах.

В перикарионах нейронов продолговатого мозга на 6-е сутки эксперимента обнаружено более выраженное по сравнению с гипоталамусом нарастание ультраструктурных признаков дистрофических изменений, особенно в вентральной части. Отмеченная вакуолизация и набухание митохондрий в сочетании с выраженным расширением цистерн ГЭПС в перикарионах нейронов гипоталамуса свидетельствует о прогрессивном нарастании ультраструктурных признаков повреждения органелл в этот период заболевания, а также о появлении ультраструктурных изменений в ядрах нейронов. Полученные нами результаты можно объяснить индуцирующим нейротропным влиянием ВЗН, способствующего повреждению и гибели нейронов в различных отделах головного мозга [9, 11], а также цитотоксическим воздействием

иммунной системы [1, 13]. Несмотря на важность изучения патологических изменений в различных отделах ЦНС при ЛЗН, механизмы, обуславливающие поражение нейронов при западнонильском энцефалите и других арбовирусных инфекциях остаются в значительной степени неизвестными. Установлено, что при ВЗН каспаза-3 зависимый апоптоз вносит значительный вклад в патогенез летального энцефалита [12], при максимальном повышении активности каспазы-3 в гомогенатах коры полушарий конечного мозга и мозжечка мышей с 6-х по 10-е сутки опыта. В наших исследованиях продемонстрировано преобладание в стволе головного мозга и гипоталамусе нейронов с ультраструктурными признаками обратимых повреждений, нарастающих к 6-м суткам моделирования ЛЗН, что косвенно подтверждается данными о наличии в этот период выраженных ультраструктурных признаков повреждения эндотелия кровеносных капилляров и астроцитов в стволе головного мозга [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном моделировании ЛЗН (штамм 901) путем внутрибрюшинного заражения мышей обнаружены ультраструктурные повреждения нейронов, соответствующие стадийности инфекционного процесса и более выраженные в вентральных отделах продолговатого мозга по сравнению с гипоталамусом. Обнаруженные морфологические изменения свидетельствуют о нарастающих нарушениях водно-электролитного и энергетического видов обмена в нервной ткани, по-видимому, индуцированных ВЗН.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта ВолГМУ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьева Н. В. Патоморфология органов и систем при лихорадке западного Нила (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – Волгоград, 2005. – 42 с.
2. Львов Д. К., Писарев В. Б., Петров В. А. и др. Лихорадка Западного Нила: по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999–2002 гг. – Волгоград, 2004. – 104 с.
3. Писарев В. Б., Григорьева Н. В., Петров В. А. и др. // Арх. патологии. – 2004, № 5. – С. 15–18.
4. Писарев В. Б., Смирнов А. В., Почепцов А. Я. и др. // Бюлл. ВНИЦ РАМН и АВО. – 2006. – № 3. – С. 11–13.
5. Шмидт М. В., Писарев В. Б., Смирнов А. В. и др. // Арх. патологии. – 2006. – Т. 68, № 4. – С. 25–27.
6. Cantile C., Di Guardo G., Eleni C., et al. // Equine Vet. – 2000. – № 32. – P. 31–35.
7. Crichlow R., Bailey J., Gardner C. // The Journal of the American Board of Family Practice. – 2004. – № 17. – P. 470–472.
8. Del Piero F., Wilkins P. A., Dubovi E. J., et al. // Vet. Pathol. – 2001. – № 38. – P. 451–456.
9. Edward B., Hayes M. D., O'Leary D. R. // Pediatrics. – 2004, Vol. 113, № 5. – P. 1375–1381.
10. Guarner J., Shieh W. J., Hunter S., et al. // Hum. Pathol. – 2004, № 35. – P. 983–990.

11. *Keith J., Nicolle M., Tugaleva E., et al. // Can. J. Neurol. Sci. – 2007. – Vol. 34, № 1. – P. 92–98.*

12. *Kleinschmidt-DeMasters B. K., Marder B. A., Levi M. E., et al. // Arch. Neurol. – 2004. – № 61. – P. 1210–1220.*

13. *Samuel M. A., Morrey J. D., Diamond M. S. // Journal of Virology. – 2007. – Vol. 81, № 6. – P. 2614–2623.*

14. *Shrestha B., Gottlieb D., Diamond M. S. // J. Virol. – 2003. – Vol. 77, № 24. – P. 13203–13213.*