



ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ
АУТОИММУННОЙ АГРЕССИИ АНТИТЕЛ К
НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИМ БЕЛКАМ У КРЫС С
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПРОРЫВОМ ГЭБ

ЧЕХОНИН В. П., ЛИДЖИЕВА Р. Ц., КОРОТЕЕВА Е. А., РЯБУХИН Н. А.
ЛЕБЕДЕВ А. С., БУРКИНА А. Ю., БЕЛЯЕВА Н. Ю.

ВНИИОСП им. В. П. Сербского, 2-й МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова, Москва

Целью настоящей работы явилось иммунохимическое изучение процессов аутоантителообразования к нейроспецифическим белкам, а также анализ морфологических изменений в ткани мозга крыс, возникающих вследствие аутоантительной агрессии. Иммунизация крыс препаратами α_2 -гликопротеина и глиофибрилярного антигена приводила к появлению в сыворотке крови антител к данным препаратам в концентрации от 51,2 до 115,2 мг/мл. Нами проводилось морфологическое изучение ткани мозга крыс после экспериментального прорыва ГЭБ, вызванного введением нейролентика, что приводило к элиминации антител через поврежденный ГЭБ. Показано развитие в ткани мозга неспецифических острофазовых реакций по типу отека или воспаления.

Образование аутоантител к целому ряду нейроспецифических белков (НСБ) показано как в клинике [1—4], так и в эксперименте [5, 6]. В то же время остается неясным вопрос, могут аутоантитела к НСБ проникать через поврежденный ГЭБ в направлении кровь—мозг.

Целью настоящей работы явилось иммунохимическое изучение процессов аутоантителообразования к НСБ, а также анализ морфологических изменений в ткани мозга крыс, возникающих вследствие аутоантительной агрессии.

Материалы и методы

Иммунохимическому и морфологическому анализу подвергали сыворотку крови и ткань мозга 25 белых беспородных крыс массой 200 ± 10 г, которым подкожно и внутрибрюшинно вводили препараты α_2 -гликопротеина (α_2 -ГП) и глиофибрилярного антигена (GFAP), полученные из мозга крыс по методам, описанным ранее [1, 7]. Препараты вводили в дозе 65 мкг на 1 кг веса по следующей схеме: 1 мл препарата НСБ, содержащего α_2 -ГП и GFAP в концентрации по 5 мкг/мл, смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда («Sigma», США) и вводили каждому из 20 подопытных животных подкожно в зону лимфатических узлов брюшной цепочки.

Через 7 дней 1 мл препарата НСБ, содержащего 2 мкг α_2 -ГП и GFAP, вводили внутрибрюшинно каждому из 20 подопытных животных.

3 и 4 инъекции проводили с интервалом 7 суток внутрибрюшинно препаратом НСБ, содержащим по 3 мкг α_2 -ГП и GFAP.

Концентрацию антител к НСБ определяли иммуноферментным методом, как описано ранее [7]. Регистрацию результатов иммуноферментного анализа проводили на многоканальном фотометре Titeltek Multiskan („Flow Laboratories“, Англия).

Прорыв ГЭБ осуществляли внутрибрюшинной инъекцией галоперидола („Gedeon Richter“, Венгрия) в дозе 50 мг на 1 кг веса животного. Крыс декапитировали через сутки после инъекции галоперидола, мозг фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин. Срезы окрашивали по Нисслю и изучали при помощи световой микроскопии.

Для изучения распределения [125 J] меченных антител к α_2 -ГП и GFAP белым беспородным крысам (массой 220 ± 10 г) внутрисердечно вводили по 0,125 мг препаратов антител к α_2 -ГП и GFAP, полученных способом, описанным ранее [7], с удельной радиоактивностью 0,008 мКи/мкг. Декапитировали через 24, 72, 144 и 216 ч после инъекции; паренхиматозные органы (мозг, печень, селезенку, легкое, почки, сердце) массой 1 г, а также кровь подвергали сканированию на γ -счетчике Compu Gamma (LKB, Швеция).

Результаты и обсуждение

Разработанные в процессе эксперимента иммуноферментные системы определения антител к α_2 -ГП и GFAP позволили выявлять их в биологических жидкостях в интервале концентраций соответственно от 0,9 до 115,2 и от 0,8 до 102,4 нг/мл. Оптимальная работа систем достигалась при использовании для активации полистироловых плат соответственно 0,0015 и 0,0042% растворов антител к GFAP и α_2 -ГП и в качестве промежуточных антигенов 0,0003 и 0,0004% растворов этих антигенов, оптимальное разведение конъюгата антител осла к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой («Sigma», США) составило 1:1500. На рис. 1 приведена кривая зависимости концентрации антител к α_2 -ГП и GFAP от оптической плотности при 450 нм.

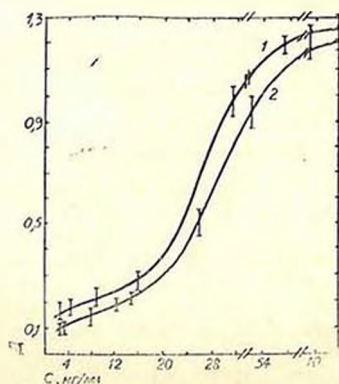


Рис. 1. Калибровочные кривые иммуноферментного определения антител к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину

построенная на основании результатов 30 экспериментов. Статистический анализ среднего квадратичного отклонения точек не превышает соответственно 0,9 и 1,1%, что позволяет судить о надежности и хорошей воспроизводимости разработанных систем, которые были использованы для иммунохимического анализа уровня антител в сыворотке крови крыс.

Иммунизация препаратами α_2 -ГП и GFAP приводила к появлению в сыворотке крови крыс антител к данным препаратам в концентрации от 51,2 до 115,2 нг/мл. Таким образом, принципиальная возможность образования аутоантител к НСБ в процессе прорыва ГЭБ в направлении мозг—кровь не вызывает сомнений.

При анализе клинического состояния животных опытной и контрольной групп с экспериментально нарушенным ГЭБ выявляются выраженные различия в статусе животных. 3 из 25 крыс, в сыворотке крови которых присутствовал антител к НСБ, погибли в первые 5 мин после инъекции галоперидола при явлениях нарушения дыхания по центральному типу. У остальных животных данной группы в течение длительного времени (до 24 ч) сохранялись судорожный синдром, акинетико-ригидный синдром, нарушение поведенческих реакций, отмечались явления вегето-сосудистой недостаточности (тахикардия, акцианоз). У контрольных животных наблюдалась нейролептическая симптоматика, которая полностью исчезала к 6 ч после инъекции.

Учитывая тот факт, что в литературе имеются неоднородные данные о морфологических изменениях, возникающих при аутоантителной агрессии в мозг [8, 9], проводили морфологическое изучение ткани мозга крыс после экспериментального прорыва ГЭБ, вызванного введением нейрелептика, что приводило к элиминации антител через поврежденный ГЭБ. При морфологическом исследовании ткани мозга крыс, полученного декапитацией через 24 ч после инъекции галоперидола, отчетливо выявляются очаговая пролиферация клеток нейроглии, прежде всего глиальных нейрофатов, перикапиллярный отек, возбуждение астроцитов, пролиферация олигодендроцитов с образованием их отечных форм. Нейроны просветлены, наблюдаются периферический хроматоллиз, появление светлых вакуолей, признаков дистрофии в их цитоплазме. Здесь же следует отметить, что в препаратах из ткани мозга крыс контрольной группы, несмотря на прорыв ГЭБ, вышеуказанные изменения не отмечались (рис. 2).

Так как до сих пор в литературе нет однозначных доказательств, свидетельствующих о попадании в ткань мозга через поврежденный ГЭБ аутоантител к НСБ, нами проводилось радиоиммунологическое изучение распределения [125I] меченных антител к α_2 -ГП и GFAP в организме животных с нарушенной резистентностью ГЭБ. С этой целью подопытной группе животных (40 белых беспородных крыс) вводили галоперидол (как описано выше), что вызывало нарушение резистентности ГЭБ. Внутривенно вводили по 0,125 мг препарата [125I] меченных антител к GFAP и α_2 -ГП с удельной радиоактивностью 0,008 мКи/мкг. Контрольным группам животных (каждая по 20 крыс) вводили эквивалентное количество меченых антител к α_2 -ГМ и α_2 -ГМ, а также препарат [125I]. Эксперимент полностью повторяли на животных с ненарушенной проницаемостью ГЭБ. Крыс забивали спустя 24, 72, 144 и 216 ч после инъекции соответствующих препаратов и скенировали участки паренхиматозных органов на γ -счетчике Compu Gamma (ЛКВ, Швеция). Для скенирования брали по 1 г следующих органов: мозг, печень, почки, легкое, селезенка, сердце, а также кровь. Результаты распределения метки в опытных и контрольных

ных образцах приведены в табл. 1, рис. 3, из которых видно, что при полноценном ГЭБ аутоантитела в ткань мозга не проникают, а имеющаяся радиоактивность 0,0013 мКи обусловлена, на наш взгляд, радиоактивностью крови в сосудах головного мозга. В эксперименте на животных с пораженным ГЭБ антитела к GFAP и α_2 -ГП накапливаются в мозгу, причем количественное содержание метки в 1 г ткани



Рис. 2. Микроскопическая картина ткани мозга крыс с экспериментально вызванной аутоантительной агрессией к нейроспецифическим белкам: а—отек и инфильтрация мягких мозговых оболочек ($\times 250$); б—расширение сосуда и резко выраженный перипаскулярный отек ($\times 300$); в—дистрофические изменения нейронов, появление клеток-теней, выраженный перикеллюлярный отек ($\times 250$); г—глиальная реакция вокруг сосуда, появление темных нейронов ($\times 350$).

Окраска по Нисслю

мозга превышало, как минимум, на 60% ее концентрацию в других исследуемых органах. Изучение локализационного индекса в тканях показало, что максимум его значения приходится на 3-и сутки от момента инъекции. Напротив, введение меченых антител к α_1 -ГМ и α_2 -ГМ, не специфичных для мозга крысы, не характеризуется накоплением их в ткани, а локализационный индекс в этом случае не превышает 1.

Обсуждая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что прорыв аутоантител к НСБ через поврежденный ГЭБ в мозг со-

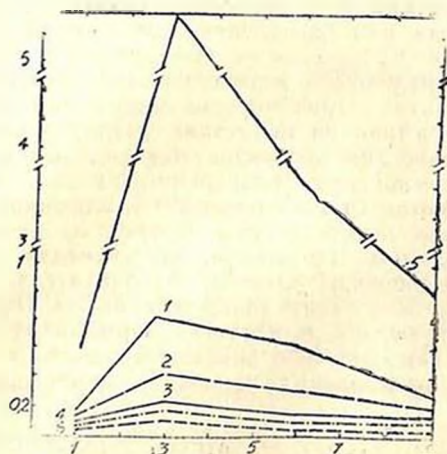


Рис. 3. Графическое изображение локализационных индексов для меченых $[^{125}\text{I}]$ антител к нейроспецифическим белкам в различные сроки после инъекции животным с экспериментально нарушенной барьерной функцией ГЭБ. По оси абсцисс—время после инъекции (в сутках), по оси ординат—локализационный индекс (в отн. ед.). Цифрами указано графическое изображение локализационного индекса при инъекции антител к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину для ткани печени (1), к α_1 - и α_2 -гликопротеину для ткани печени (2), к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину для ткани почек (3), к α_1 -протеину и α_2 -гликопротеину для ткани почек (4), к глиофибрилярному антигену и α_2 -гликопротеину для ткани мозга (5), к α_1 - и α_2 -гликопротеину для ткани мозга (6)

Таблица

Процентное распределение $[^{125}\text{I}]$ меченых антител к GFAP и α_2 [1] на третий сутки после введения препаратов

Органы (Iг)	Меченные $[^{125}\text{I}]$ антитела, введенные животным с нарушенной резистентностью ГЭБ	Меченные $[^{125}\text{I}]$ антитела, введенные интактным крысам
Мозг	0.630 ± 0.040	0.021 ± 0.003
Сердце	0.025 ± 0.003	0.028 ± 0.002
Легкое	0.013 ± 0.003	0.012 ± 0.002
Печень	0.110 ± 0.008	0.080 ± 0.009
Почки	0.038 ± 0.004	0.022 ± 0.004
Селезенка	0.040 ± 0.004	0.018 ± 0.003
Кровь	0.120 ± 0.020	0.800 ± 0.040

Примечание. Расчет вели от общего количества вводимой метки.

проводяется развитием в ткани неспецифических —острофазовых реакций по типу отека или воспаления, при этом в данных процессах нарушение функций ГЭБ является, по-видимому, вторичной реакцией—следствием выраженных метаболических нарушений в клетках мозга и эндотелиоцитах. Причина этих нарушений, вероятно, кроется в суммарном воздействии на них таких факторов как гипоксия, ишемия, влияние токсических продуктов метаболизма клеток организма, активированных компонентов калекреин-кининовой системы и т. д. Нарушение резистентности ГЭБ приводит к элиминации в кровь НСБ, обладающих высокой антигенностью. В ответ на их проникновение в кровь иммунная система организма, не имеющая толерантности к ним, реагирует выработкой антител. Аутоантитела, в свою очередь, могут проникать в мозг через поврежденный ГЭБ, блокируя функции специфических белков и нарушая нормальный метаболизм клеток-мишеней, что само по себе может приводить к активации комплекса процессов, вызывающих первичное нарушение проницаемости ГЭБ.

IMMUNOCHEMICAL STUDY OF MECHANISMS OF AUTOIMMUNE AGGRESSION OF ANTIBODIES TOWARDS NEUROSPECIFIC PROTEINS IN RATS WITH EXPERIMENTAL RUPTURE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER

CHEKHONIN V. P., LIDZHIEVA R. Ts., KOROTEEVA E. A., RYABUKHIN I. A.,
LEBEDEV A. C., BURKINA A. YU., BELYAEVA N. YU.

Serbshii Institute of Forensic Psychiatry, Moscow

N. J. Pirogov Moscow Second Medical Institute

In this paper we have attempted to perform an immunochemical study of antibody formation against neurospecific proteins and to analyze morphological changes in rat brain due to the attack by autoantibodies. Immunization of rats with α_2 -glycoproteins and glial fibrillar acidic protein resulted in the appearance in antiserum of antibodies against these molecular species in concentrations varying from 51.2 to 115.2 ng/ml. We examined brain tissue morphologically after experimental rupture of blood-brain barrier induced by a neuroleptic; this resulted in depletion of antibodies occurring through the damaged blood-brain barrier. We have demonstrated the development of non-specific acute phase reactions resembling oedema or inflammation of brain tissue.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eng L. F. Scand. J. Immunol. v. 15, suppl. 9, p. 41—51, 1982.
2. Karcher D., Soler Federspiel B. S., Lowenthal F. D., Lowenthal A. Acta Neuropathologica (Bell.), v. 72, p. 82—85, 1986.
3. Perry G., Friedman R., Kang D. R. Brain Res., v. 420, p. 233—242, 1987.
4. Sato S., Baba H., Inuzuka I., Miyatake I. Acta Neurol. Scand., v. 74, p. 115—120, 1986.
5. Полетаев А. Б. Мозгоспецифические белки группы S-100, их эндогенные акцепторы и лиганды, и регуляция метаболических процессов в нервной ткани, Автореф. докт. дис., М., 1987.
6. Festoff B. W., Israel R. S., Engel W. K., Rosenbaum R. B. Neurol., v. 27, p. 82—85, 1977.
7. Чехонин В. П., Морозов Г. В., Кашипов Н. А., Рябухин И. А. Биотехнология, т. 4, №5, с. 648—651, 1988.
8. Heath R. G., Krupp I. M. Arch. Gen. Psychiatry, v. 16, p. 1—9, 1967.
9. Logan D. G., Deodhar S. D. JAMA, v. 212, p. 1703—1704, 1970.

Поступила 25.II.1990