

ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 616.832-002-056.3-092.9.001.57:616-036.65-036.12

*Л.Д. Пічкур, В.М. Семенова, О.М. Величко, С.А. Вербовська, Д.М. Єгорова,
С.Т. Акінола, В.В. Васлович*

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ

**ОПТИМІЗАЦІЯ МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ
З ХРОНІЧНИМ РЕЦИДИВУЮЧИМ ПЕРЕБІГОМ**

З метою стандартизації моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) з розвитком хронічного ремітуючого перебігу провели дослідження впливу різних доз повного ад'юванту Фрейнда (АФ) і енцефалітогенної суміші на ступінь вираженості поведінкових реакцій у тесті «відкрите поле» щурів і процесу демієлінізації спинного мозку. При тестуванні у «відкритому полі» щурів з індукованим ЕАЕ одинарною дозою АФ на 12-ту добу виявили пригнічення орієнтовно-дослідницької та активацію емоційної активності. Порівняльний патоморфологічний аналіз особливостей гістоструктури спинного мозку щурів з ЕАЕ на 35-ту добу показав, що застосування як подвійної, так і потрійної дози АФ з метою індукції забезпечує розвиток більш поширеного демієлінізуючого процесу у порівнянні з одинарною дозою АФ. Використання одинарної дози АФ є оптимальним для отримання ефективної моделі експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів з хронічним рецидивуючим перебігом.
Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, поведінкові реакції, демієлінізація.

Вступ

Незважаючи на багаторічні різнобічні дослідження патогенезу демієлінізуючих захворювань центральної нервової системи (ЦНС) і, зокрема, розсіяного склерозу, їх лікування залишається невирішеною проблемою сучасної медицини. В той же час протягом останніх 15 років у цій галузі досягнуті значні успіхи: сформувалася концепція гетерогенності нозологічних форм цих захворювань, описані нові й атипичні клінічні їх форми у центральних і периферичних відділах нервової системи, ідентифіковані нові антигени, розроблені і впроваджені в практику діагностичні панелі аутоантитіл, апробовані нові лікарські засоби для імунотерапії, досліджуються біомаркери демієлінізуючих захворювань нервової системи, розробляються програми їх патогенетичної терапії [1].

Поряд з тим, значна увага приділяється розробці альтернативних методів лікування демієлінізуючих захворювань ЦНС з вико-

ристанням клітинної терапії фетальними й стовбуровими клітинами різного генезу. У зв'язку з цим особливу актуальність набуває наявність надійної експериментальної моделі, яка відтворює демієлінізуючий процес у ЦНС, подібний до такого при розсіяному склерозі. У численних спостереженнях показано, що за клінічними проявами та гістологічною картиною експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ), який індукується антигенами мієліну та опосередковується Т-клітинами, має значну схожість з розсіяним склерозом і може вважатись його модельним еквівалентом. Жодна з описаних моделей ЕАЕ не повторює всіх особливостей патоморфологічного перебігу розсіяного склерозу. У зв'язку з цим проводяться подальші пошуки методів відтворення більш адекватних експериментальних моделей розсіяного склерозу з розвитком хронічного демієлінізуючого процесу в ЦНС [2].

Відомо, що вивчення і моделювання ЕАЕ має багаторічну історію [3]. Після введення в

©Л.Д. Пічкур, В.М. Семенова, О.М. Величко та ін., 2017

клінічну практику антирабічних щеплень з'явилися перші повідомлення про випадки розвитку у пацієнтів гострого енцефаломієліту, який пов'язували з їх токсичним впливом або сенсibilізуючими властивостями нервової тканини. При застосуванні нейротоксичних сироваток у піддослідних тварин іноді виникали паралічі кінцівок. Подібний ефект спостерігався після введення тваринам великої дози гомогенату з нормальної мозкової речовини. Виявилось, що нервова тканина має слабкі сенсibilізуючі алергійні властивості, і розвиток паралічів кінцівок у тварин спостерігався лише після тривалої багаторазової імунізації [4]. Подібний ефект впливу на мозкову тканину виявлений після введення токсинів, чужорідних сироваток, інфікування вірусами [5]. Але рухові розлади виникали не у всіх тварин, що не дозволяло зробити однозначні висновки. В деяких дослідженнях також показана можливість індукції ЕАЕ у тварин введенням окремих фракцій мозкової тканини [5, 6], дендритних клітин [7], коклюшного токсину [6, 8].

Подальший пошук методу отримання адекватної моделі ЕАЕ пов'язаний із застосуванням очищеного мієліну, енцефалітогенних білків, поліпептидів [6, 9, 10], при використанні яких характер розвитку симптоматики захворювання у тварин був більш однотиповим.

Для розуміння патогенезу ЕАЕ важливе значення має також вивчення природи енцефалітогенного фактора та механізму дії стимуляторів, які підсилюють антигенні властивості мозкової тканини [11]. Так, встановлено, що біла речовина мозку є більш енцефалітогенною, ніж сіра, що пояснюється наявністю мієліну у білій речовині.

Обнадійливі результати при моделюванні ЕАЕ були отримані після застосування повного ад'юванту Фрейнда, який є водно-масляною емульсією з інактивованими клітинами *Mycobacterium tuberculosis* H37RA або містить інактивовані клітини *Mycobacterium tuberculosis*, мінеральну олію, деривати ланоліну та емульгатор [4]. При введенні тваринам ад'юванту Фрейнда з антигеном значно зростає продукція антитіл до останнього. Показано, що одночасне введення ад'юванту Фрейнда з суспензією мозкової тканини ЦНС як гомологічного, так і гетерологічного походження значно прискорює розвиток ЕАЕ у тварин [5, 12]. Такий підхід дозволяє вивчати процеси де- і ремієлінізації у ЦНС та імуно-

логічні зміни при демієлінізуючих захворюваннях нервової системи [5, 13, 14].

З метою моделювання ЕАЕ найчастіше енцефалітогенну емульсію вводять внутрішньошкірно в подушечки пальців ступні тварин [12]. При цьому важкість перебігу ЕАЕ залежить від кількості введеної мозкової речовини, складу стимулятора і співвідношення його інгредієнтів, а також від взаємодії між компонентами енцефалітогенної емульсії та шляхів інокуляції [15].

Характерним для ЕАЕ є гострий перебіг з високою летальністю експериментальних тварин, яка може сягати 50–70% [2, 3, 5, 14, 16]. Інкубаційний період становить від 8 до 30 діб. Захворювання швидко прогресує та характеризується такими клінічними проявами, як схуднення тварин, зменшення рухливості, розвиток парезів і паралічів кінцівок, порушення координації рухів та функції тазових органів [17]. При хронічному ремітуючому перебігу ЕАЕ у тварин відзначається випадіння волосся, розвиваються трофічні виразки на кінцівках [5, 15]. При патоморфологічному дослідженні спостерігається переважання ознак демієлінізації нервових волокон над запальними змінами.

Наведені дані літератури дають підстави стверджувати, що гострий ЕАЕ у тварин не є цілком адекватною моделлю демієлінізуючих захворювань з хронічним перебігом подібно розсіяному склерозу людини [12, 15]. При цьому жодна з існуючих моделей ЕАЕ не відтворює розсіяний склероз з хронічним перебігом і ремітуючим характером клінічної картини. Крім того, гістологічні особливості різняться при різних методах індукції демієлінізуючого процесу в нервовій тканині, а клінічні ознаки захворювання не завжди корелюють з патоморфологічними змінами – досить часто у тварин при відсутності клінічних симптомів виникають множинні вогнища запалення у ЦНС. У зв'язку з цим необхідні подальші пошуки експериментального підбору адекватної дози ад'юванту Фрейнда і відповідно концентрації інактивованих туберкульозних бактерій для отримання удосконаленої моделі ЕАЕ. Особливого значення набуває наявність надійної моделі ЕАЕ в розробці нових сучасних підходів до лікування демієлінізуючих захворювань ЦНС з використанням клітинної терапії.

Метою даного дослідження було удосконалення методу моделювання ЕАЕ у щурів шляхом індукції демієлінізуючого процесу

різними дозами ад'юванту Фрейнда з оцінкою ефективності моделі за допомогою патофізіологічних і патоморфологічних критеріїв.

Матеріал і методи

Дослідження проведені на 32 безпородних статевозрілих щурах-самцях масою 200–230 г розведення віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України». Всі процедури з дослідними тваринами виконували у відповідності з міжнародними правилами і нормами European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC та згідно принципів «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [18] і Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.20.06 №3447-IV [19].

Експериментальний алергічний енцефаломієліт індукували за стандартною методикою [4] шляхом одноразового введення підшкірно у подушечки задніх кінцівок 4 мл суспензії, яка містила гомогенат спинного мозку дорослих щурів, гомогенізований у фізіологічному розчині і емульгований у співвідношенні 1:1, 1:2, 1:3 з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma, США), що містить 2–3 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis*.

Тварин поділили на 4 експериментальні групи: 1-ша – інтактні щури (n=12); 2-га – щури з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда (n=8); 3-тя та 4-та групи – щури з ЕАЕ, індукованим подвійною (n=6) та потрійною (n=6) дозою ад'юванту Фрейнда відповідно. В останніх двох групах тварин проведені лише патоморфологічні дослідження поперекового відділу спинного мозку на 35-ту і 60-ту добу спостереження. Поведінкові реакції цих дослідних тварин спостерігати не вдалося у зв'язку з різким погіршенням їх загального стану і смертю половини тварин із кожної групи. У тварин з подвійною дозою вже на 12-ту добу відмічалися численні парези задніх лап і хвоста, болісність лап, наявність трофічних язв, що перешкоджало їх обстеженню у «відкритому полі».

Дослідження поведінкових реакцій за тестом «відкрите поле» інтактних щурів і щурів 1-ї групи проводили на 12-ту добу (початок виявлення патологічних неврологічних симптомів [12]) згідно [20, 21] протягом 10 хв за показниками горизонтальної (перетин центральних і периферійних квадратів) і вертикальної локомоторної активності (вставання на

задні лапи – вертикальні стійки), дослідницької активності (заглядання у нирки), емоційної активності (грумінг і дефекація, кількість болюсів). За допомогою програмно-комп'ютерного комплексу дослідження поведінкових реакцій тварин реєстрували: латентний період (LP), кількість епізодів за перші 5 хв (n1), кількість епізодів у наступні 5 хв (n2), загальну кількість епізодів за 10 хв спостережень (ns), тривалість епізодів за перші 5 хв (T1), тривалість епізодів у наступні 5 хв (T2), загальну тривалість епізодів (Ts), середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хв (t1), середню тривалість окремого епізоду у наступні 5 хв (t2) та середню тривалість окремого епізоду за 10 хв спостережень (ts).

Отримані дані статистично обробили. Вірогідність відмінностей оцінювали з використанням непарного непараметричного U-критерію Манна–Уїтні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при $p < 0,05$.

Забір тканини поперекового потовщення спинного мозку експериментальних тварин проводили на 35-ту і 60-ту добу експерименту після внутрішньочеревинного передозування засобів для наркозу. Для світлової мікроскопії виділені фрагменти поперекового відділу спинного мозку фіксували у 10%-вому розчині нейтрального формаліну і проводили через стандартну парафінову заливку. З отриманих блоків на мікротомі Місгом HM430 (Німеччина) готували серійні тонкі зрізи завтовшки 5–7 мкм, які забарвлювали класичними оглядовими барвниками – гематоксилін-еозином і гематоксилін-пікрофуксином. Для селективного дослідження тонкої цитоструктури нейронів сірої речовини спинного мозку застосовували також нейрогістологічний метод Ніссля (забарвлення тіоніном, Janssen Chimica). Гістологічні препарати досліджували на біокулярному мікроскопі NIKON (Японія) з наступною мікрофотодокументацією на цитоаналізаторі зображення IBAS-2000 (Німеччина) при збільшеннях мікроскопа 400 та 800.

На гістологічних препаратах спинного мозку піддослідних тварин з модельованим ЕАЕ оцінювали патологічні зрушення у гістоструктурі тканини спинного мозку: наявність і поширеність демієлінізації аксонів, запальної інфільтрації та ознак набряку, вираженість дистрофічних і некробіотичних змін у нервових клітинах. Для виявлення змін у складі нейрональної популяції сірої речовини спин-

ного мозку тварин з модельованим ЕАЕ використали морфометричний метод відсоткового визначення нейронів з ознаками дистрофічних і некробіотичних змін, які підраховували у 10 полях зору на гістологічних препаратах. Цитоструктурні ознаки патології нейроцитів оцінювали згідно класичного критерію за загальноприйнятою класифікацією [22]. Отримані результати наведені у вигляді вибірових середніх значень (середнє арифметичне, медіана), стандартної похибки вибірового середнього арифметичного та інтерквартильного діапазону. Оскільки перевірка отриманих даних не підтвердила, що закон розподілу нормальний, для статистичної обробки результатів застосовували непараметричні методи варіаційної статистики: непараметричний критерій Манна–Уїтні для порівняння двох незалежних груп і ранговий дискримінантний аналіз, заснований на сумах рангів Фрідмана з використанням пакета програми MS Excel 2003 [23] та STATISTICA 6.1. Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро–Уїлка.

Результати та їх обговорення

При тестуванні поведінкових реакцій щурів після індукції ЕАЕ одинарною дозою ад'юванту Фрейнда у «відкритому полі» у порівнянні з інтактними тваринами виявили: вірогідне зниження горизонтальної локомоторної активності (зменшення кількості перетинів периферійних квадратів: **n1** – в 1,7 раза ($p < 0,0015$), **n2** – в 1,9 раза ($p < 0,004$), **ns** – в 1,8 раза ($p < 0,0002$); вертикальної локомоторної активності (вірогідне зменшення латентного періоду **LP** – в 4 рази ($p < 0,0001$) та тенденцію до зниження кількості вертикальних стійок – **n2**, **ns**, їх тривалості – **T2**, **Ts** та середньої тривалості – **t1**, **t2**, **ts**), вірогідне зниження дослідницької активності (збільшення

латентного періоду **LP** – в 2 рази ($p < 0,031$) та зменшення тривалості **Ts** – в 2,4 рази ($p < 0,047$) і середньої тривалості заглядань у нирки **ts** – в 2,6 рази ($p < 0,004$). Також спостерігали тенденцію до підвищення емоційної активності (збільшення тривалості епізодів грумінгу – **T1**, **T2**, **Ts** при зменшенні кількості епізодів грумінгу – **n1**, **n2**, **ns** (табл. 1).

Результати показали, що у щурів з модельованим ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, на 35-ту добу спостереження при гістологічному дослідженні поперекового відділу спинного мозку у білій речовині виявлені структурні ознаки процесу демієлінізації мієлінової оболонки у переважній більшості аксонів з утворенням навколо них циркулярних спустошень. При цьому більшість аксонів набула витонченого та деформованого вигляду (рис. 1).

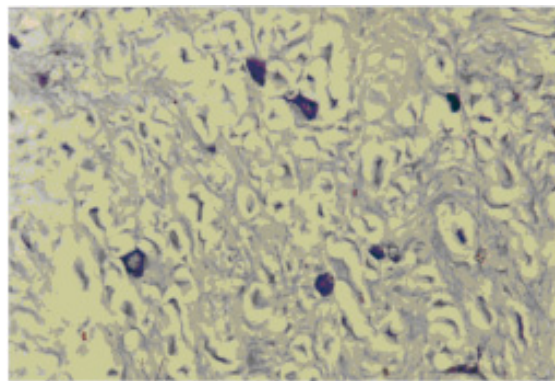


Рис. 1. Біла речовина спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення тіоніном, $\times 800$

Подібні деструктивні зміни мієлінових оболонок спостерігалися також навколо нервових волокон у складі корінців. Місцями спустошення навколо залишкових аксонів злива-

Таблиця 1. Результати дослідження поведінкових реакцій інтактних і піддослідних щурів після індукції експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) одинарною дозою ад'юванту Фрейнда ($M \pm m$)

Активність	Показники	Інтактні щури (n=12)	Щури з ЕАЕ (n=8)
Горизонтальна активність. Периферійні квадрати	n1	67,75±5,4	39,88±4,19 $p < 0,0015^*$
	n2	50,25±4,04	26,5±5,02 $p < 0,004^*$
	ns	118±7,31	66,38±8,73 $p < 0,0002^*$
Вертикальна активність	LP	44,74±10,13	10,39±1,98 $p < 0,0001^*$
Дослідницька активність (нирки)	LP	202,41±47,44	398,5±77,51 $p < 0,031^*$
	Ts	9,09±1,67	3,75±1,64 $p < 0,047^*$
	ts	2,8±0,3	1,09±0,42 $p < 0,004^*$

Примітка. Позначення: LP – латентний період; n1 – кількість епізодів за перші 5 хв; n2 – кількість епізодів за другі 5 хв; ns – загальна кількість епізодів; Ts – загальна тривалість епізодів за 10 хв спостережень; ts – середня тривалість окремого епізоду за 10 хв спостережень.

лися, утворюючи ділянки ячейкуватих структур. Серед клітин гліального компонента білої речовини виявлялися лише поодинокі дифузно розташовані дистрофовані олігодендроцити та астроцити із пікнотизованою цитоплазмою при відсутності візуалізації ядер.

У сірій речовині спинного мозку щурів на 35-ту добу дослідження виявлені лише окремі нейрони із збереженою типовою цитоструктурою, наближеною до нормальної (рис. 2).

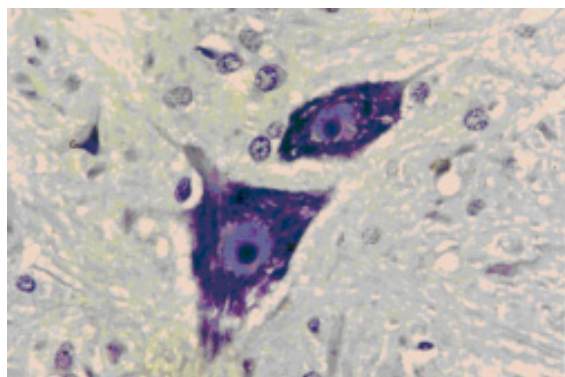


Рис. 2. Нейроцити із відносно збереженою структурою у сірій речовині спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення тіоніном, $\times 800$

У більшості нейроцитів [(52,64 \pm 3,69)%] реєструвалася ущільненість тигроїдної субстанції з підвищеним забарвленням, що відбиває порушення тінкторіальних властивостей рибонуклеїдного комплексу цитоплазми внаслідок патологічного підвищення проникності клітинних мембран. У деяких нейроцитах відбулися тотальна гомогенізація тигроїдної субстанції та лізис ядер з руйнуванням оболонки при відсутності візуалізації ядерця (рис. 3). Деякі некробіотично змінені нейро-

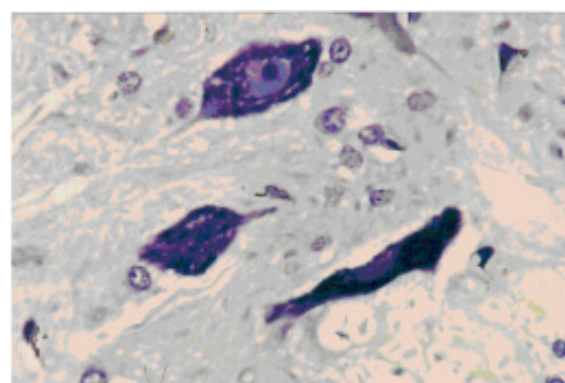


Рис. 3. Дистрофовані нейроцити у сірій речовині спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення тіоніном, $\times 800$

цити набули вигляду клітин-тіней. На всьому протязі зрізів спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованих одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, у цей строк спостерігалися також явища перичелюлярного й периваскулярного набряку.

На 60-ту добу дослідження в тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, у порівнянні з попереднім строком у білій речовині визначалося помітне збільшення пошкоджених демієлінованих аксонів з перетворенням їх у витончені гомогенізовані структури, оточені поширеними спустошеннями внаслідок деструкції мієлінових оболонок (рис. 4). У дистро-

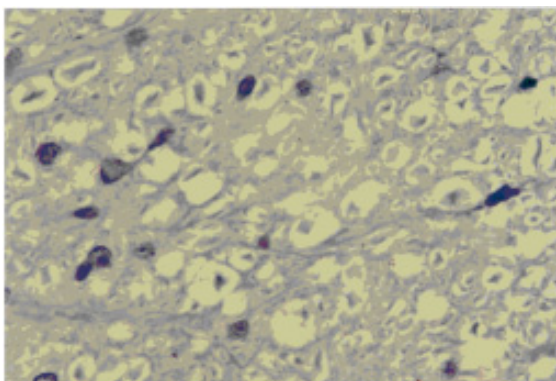


Рис. 4. Посилення ознак демієлінізації аксонів у білій речовині спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, 60-та доба. Забарвлення тіоніном, $\times 800$

фованих гліоцитах виявлені пікноморфні гіперхромні ядра. У сірій речовині спинного мозку в цей строк вміст патологічно змінених нейроцитів порівняно з попереднім строком становив у середньому (52,78 \pm 4,31)%, тобто помітно не змінився. Але у таких нейроцитах визначалося поглиблення некробіотичних ознак у вигляді ішемії, тигролізу, каріолізу з утворенням клітин-тіней (рис. 5). Судини капілярного типу зі стазом формених елементів оточені зонами периваскулярного набряку або невеликими вогнищевими крововиливами.

Отже, в динаміці спостереження на 60-ту добу в тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою ад'юванту Фрейнда, ступінь патологічних змін у білій і сірій речовині цих щурів помітно посилюється. Виявлені цитоструктурні зміни на 35-ту та 60-ту добу дослідження відображують суттєві порушення внутрішньоклітинних метаболічних процесів внаслідок розвитку демієлінізації нервових волокон і є причиною функціональних розладів діяльності ЦНС

піддослідних тварин зі зміною поведінкових реакцій.

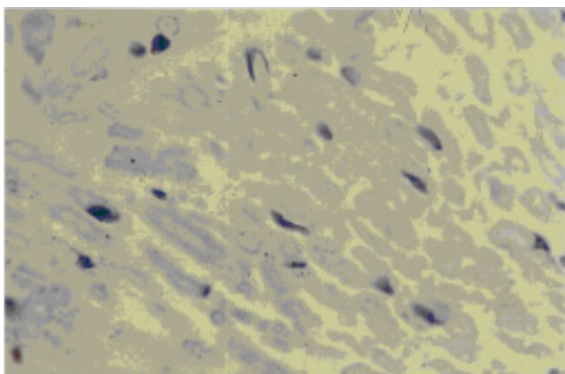


Рис. 5. Деструктивні зміни у білій речовині спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим подвійною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення тіоніном, $\times 800$

Патоморфологічний аналіз гістоструктури спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим подвійною дозою ад'юванту Фрейнда на 35-ту добу, у порівнянні з використанням одинарної дози ад'юванту Фрейнда, виявив більш поширений процес демієлінізації аксонів у білій речовині з утворенням периаksonальних спустошень майже на всьому просторі досліджених зрізів спинного мозку. Це супроводжувалося поглибленням ступеня пошкодження аксонів з трансформацією їх у некротизовані гомогенні структури у вигляді тіней (рис. 5). З боку гліального компонента спостерігалося зменшення вмісту клітин, які виявляли ознаки дистрофії – зморщення цитоплазматичних тіл, редукцію відростків, пікноз та гіперхроматоз ядер (рис. 6). У нейронах сірої речовини спинного мозку цих щурів виявлені дистрофічні та некробіотичні зміни зі збільшенням вмісту клітин-тіней $[(63,44 \pm 5,35)\%]$. Ней-

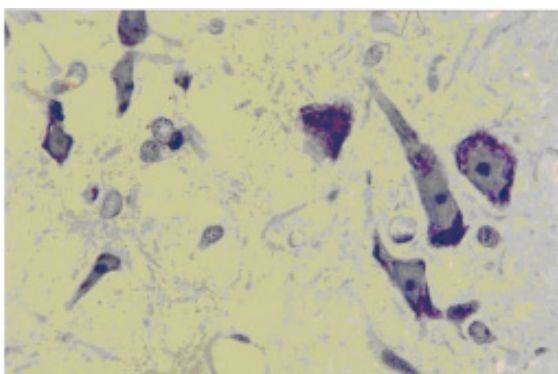


Рис. 6. Патологічно змінені нейрони у сірій речовині спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим подвійною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення тіоніном, $\times 800$

роцити із відносно збереженою структурою виявлялися поодинокі. Наявність дрібних крововиливів навколо судин капілярного типу засвідчує посилення судинної проникності.

Таким чином, за даними патоморфологічного дослідження поперекового відділу спинного мозку щурів з індукованим подвійною дозою ад'юванту Фрейнда ЕАЕ на 35-ту добу визначається значне поширення демієлінізуючого процесу та збільшення вмісту нейроклітин з дистрофічно-некробіотичними змінами.

При застосуванні потрійної дози ад'юванту Фрейнда для моделювання ЕАЕ у гістоструктурі спинного мозку тварин з ЕАЕ на 35-ту добу зареєстровано ще більше посилення деструктивних змін як у білій, так і у сірій речовині порівняно з застосуванням подвійної дози ад'юванту Фрейнда. У білій речовині спинного мозку спостерігалися ділянки майже тотальної деструкції як аксонів, так і їх оболонки (рис. 7). У сірій речовині це супро-

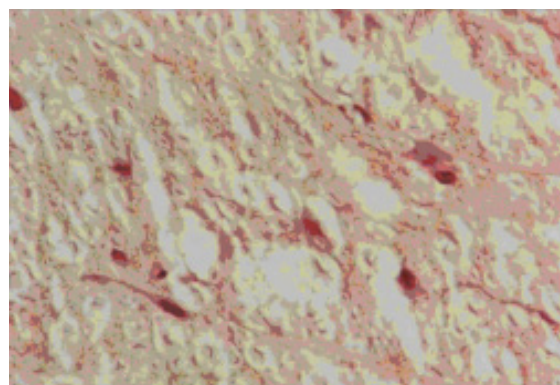


Рис. 7. Субтотальна демієлінізація білої речовини спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим потрійною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 800$

воджувалося помітним збільшенням вмісту нейронів з дистрофічними й некробіотичними змінами в середньому до $(72,52 \pm 2,46)\%$ з переважанням серед них клітин-тіней (рис. 8). Навколо дрібних судин капілярного типу спостерігалися множинні вогнищеві крововиливи.

Отже, застосування подвійної та потрійної доз ад'юванту Фрейнда для індукції ЕАЕ у щурів обумовлює поступове поширення і збільшення процесу демієлінізації аксонів у білій речовині та вмісту пошкоджених нейронів у сірій речовині спинного мозку, що засвідчує дозозалежність ефекту. Результати морфометричної оцінки вмісту патологічно змінених нейронів у сірій речовині спинно-

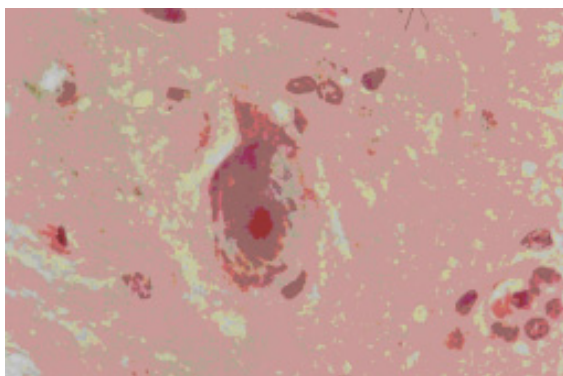


Рис. 8. Тканина спинного мозку щура з ЕАЕ, індукованим потрійною дозою ад'юванту Фрейнда, 35-та доба. Забарвлення гематоксилін-еозин, $\times 800$

го мозку щурів з ЕАЕ, індукованим різними дозами ад'юванту Фрейнда, наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Кількість патологічно змінених нейронів у сірій речовині поперекового відділу спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим різними дозами ад'юванту Фрейнда (АФ), (35-та доба)

Група щурів, доза АФ	Кількість патологічно змінених нейронів спинного мозку, %; М (25%; 75%)
1-ша, 1 доза	52,27 (45,0;63,64)
2-га, 2 дози	54,45 (50,00;78,95)
3-тя, 3 дози	74,17 (65,52;78,38)* p=0,037

Примітка. * Статистично значуще між групами I ЕАЕ та III ЕАЕ.

Морфометричний аналіз патологічних змін у спинному мозку щурів з ЕАЕ, індукованим зростаючими дозами ад'юванту Фрейнда, на 35-ту добу показав статистично значуще поступове збільшення вмісту пошкоджених нейронів у групах тварин, яким індукували ЕАЕ подвійною та потрійною дозами ад'юванту Фрейнда (табл. 2). Це супроводжувалося поступовим поширенням ступеня демієлізуючого процесу аксонів у білій речовині спинного мозку та його корінцях у відповідних дослідних групах. При застосуванні потрійної дози ад'юванту Фрейнда кількість патологічно змінених нейронів статистично значуще підвищилася в 1,4 раза у порівнянні з 1-ю групою щурів. Різниця в цих показниках між 1-ю та 2-ю групою тварин, яким індукували ЕАЕ подвійною дозою ад'юванту Фрейнда, складала 1,04 рази і була статистично незначущою. Крім того, статистично значущої різниці між 2-ю та 3-ю групами відмічено не було, незважаючи на те, що показник між ними збільшувався в 1,36 рази. Цей аналіз показує більшу інформативність урахування якісних цитологічних ознак пошкодження нейроклітин.

Узагальнюючи отримані нами результати, слід відмітити, що на нашому матеріалі у тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ не зареєстровані прояви запальної реакції незалежно від тестованої дози ад'юванту Фрейнда. В той же час, за даними роботи [3], вважається, що введена мозкова речовина викликає в організмі утворення аутоантитіл, які проникають у мозок і руйнують мієлін. У відповідь на пошкодження мієліну може розвинути запальна реакція. Існує також припущення, що процес запалення при ЕАЕ не може бути винятково вторинним явищем, оскільки запальна реакція первинно може ініціювати процес демієлізації нервових волокон, але повної топографічної відповідності між поширеністю демієлізації нервової тканини та запальною інфільтрацією не існує. Запальна інфільтрація

при ЕАЕ в основному обмежується м'якими мозковими оболонками, а ознаки демієлізації аксонів розвиваються у білій речовині спинного та головного мозку. Навіть при значній внутрішньоадвентиціальній запальній інфільтрації окремих судин мозку процес демієлізації в цих ділянках часто не виявляється.

Таким чином, проведені дослідження, спрямовані на пошук оптимальної дози ад'юванту Фрейнда для індукції ЕАЕ у щурів, показали, що найбільш поширений процес демієлізації в тканині спинного мозку цих піддослідних тварин відтворюється при використанні потрійної дози ад'юванту Фрейнда. Цей процес супроводжується появою дистрофічно-деструктивних змін у більшості нейронів сірої речовини спинного мозку. Але рівень захворюваності у таких тварин настільки важкий, що унеможливує спостереження за ними в тесті «відкрите поле». Отже, по результатах проведених досліджень можна зробити висновок про достатність використання однієї дози ад'юванту Фрейнда для отримання ефективною моделі експериментального алергічного енцефаломієліту з хронічним рецидивуючим перебігом у щурів протягом 35 діб.

Висновки

1. При індукції щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом одинарною дозою ад'юванту Фрейнда у тесті «відкрите поле» зареєстровані зміни поведінкових реакцій у вигляді пригнічення орієнтовно-дослідницької та активації емоційної активності.

2. Порівняльний патоморфологічний аналіз особливостей гістоструктури спинного мозку щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом показав, що застосування як подвійної, так і потрійної дози ад'юванту Фрейнда з метою індукції забезпечує розви-

ток більш поширеного демієлінізуючого процесу в порівнянні з одинарною дозою ад'юванту Фрейнда. Це супроводжується появою дистрофічно-некробіотичних змін цитоструктури нейронів спинного мозку щурів дозозалежного характеру. Найбільш виражені морфологічні зміни, які в основному мають незворотний характер, спостерігаються при застосуванні потрійної дози ад'юванту Фрейнда.

3. Використання одинарної дози ад'юванту Фрейнда є оптимальним для отримання ефективної моделі експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів з хронічним рецидивуючим перебігом.

Список літератури

1. Пирадов М.И. Аутоиммунные заболевания нервной системы: состояние проблемы и перспективы / М.И. Пирадов, Н.А. Супонева // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70, № 2. – С. 183–187.
2. Заргарова Т.А. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит – модель рассеянного склероза / Т.А. Заргарова, О.О. Фаворова // Иммунология. – 1999. – № 2. – С. 5–8.
3. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS) / C.S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien, B. Gran // Br. J. Pharmacol. – 2011. – V. 164, № 4. – P. 1079–1106.
4. Lipton M.M. Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants / M.M. Lipton, J. Freund // J. Immunol. – 1953. – V. 71, № 2. – P. 98–109.
5. Марков Д.А. Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике / Д.А. Марков. – Минск: Наука и техника, 1973. – 389 с.
6. Житнухин Ю.Л. Иммуноморфологические особенности экспериментального аллергического энцефаломиелита, индуцированного энцефалитогенным полипептидом / Ю.Л. Житнухин, М.Г. Хижняк // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1987. – № 3. – С. 343–346.
7. Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis / H. Link, Y.M. Huang, M. Thomas, B.G. Xiao // J. Neuroimmunol. – 2001. – V. 114. – P. 1–7.
8. Raine C.S. Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis / C.S. Raine // Lab Invest. – 1984. – V. 50, № 6. – P. 608–635.
9. Braitch M. The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS) / M. Braitch, C.S. Constantinescu // Inflamm. Allergy Drug Targets. – 2010. – V. 9. – P. 249–256.
10. Heat shock protein 27 upregulation and phosphorylation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis / H. Kim, C. Moon, M. Ahn et al. // Brain Res. – 2009. – V. 1304. – P. 155–163.
11. Raine C.S. Experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic neuritis / C.S. Raine // Handbook of clinical neurology / J.C. Koetsier; ed. New York: Elsevier. – 1986. – V. 47. – P. 429–466.
12. Нефьодов О.О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип.4, Т. 2 (114). – С. 205–208.
13. Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та IL-10 на показники клітинного імунітету у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / В.А. Руденко, І.О. Гнедкова, Л.Д. Пічкур та ін. // Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупіка. – К., 2014. – Вип. 23, кн. 2. – С. 434–441.
14. Therapeutic Administration of Mesenchymal Stem Cells Abrogates the Relapse Phase in Chronic Relapsing-Remitting EAE / A. Scuteri, E. Donzelli, R. Rigolio et al. // J. Stem Cell Res. Ther. – 2015. – V. 5, № 262. – Available: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.1000262>

15. Цимбалюк В.І. Особливості моделювання та перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / В.І. Цимбалюк, Ю.А. Касяненко // Український нейрохірургічний журнал. – 2005. – № 1. – С. 45–51. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Unkhj_2005_1_10.
16. Animal models of multiple sclerosis: potentials and limitations / E. Mix, H. Meyer-Rienecker, H.P. Hartung, U.K. Zettl // Prog. Neurobiol. – 2010. – V. 92. – P. 386–404.
17. Вплив мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонового студня пуповини людини та інтерлейкіну-10 на поведінкові реакції щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / В.І. Цимбалюк, О.М. Величко, О.Л. Пічкур та ін. // Клітинна та органна трансплантологія. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 40–45.
18. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of European. – Strasbourg, 1986. – № 123. – 51 p.
19. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.06 №3447-IV // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 990.
20. Пат. 105155 Україна, МПК А61В5/00, G09В23/28. Пристрій «відкрите поле» для дослідження поведінкових реакцій щурів / О.М. Величко, О.І. Білоус, А.М. Морозов та ін.; заявник і патентовласник ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України». № 201507771; заявл. 04.08.15; опубл. 10.03.16. Бюл. № 5.
21. Пат. 104642 Україна, МПК G09В23/28, А61В5/00. Спосіб дослідження поведінкових реакцій щурів в установці «відкрите поле» / О.М. Величко, О.І. Білоус, А.М. Морозов та ін.; заявник і патентовласник ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України». № 201507768; заявл. 04.08.15; опубл. 10.02.16. Бюл. № 3.
22. Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нервной клетки, нервного волокна и окончаний / Ю.М. Жаботинский // Руководство по патологической анатомии, под ред. Б.С. Хоминского. – М.: Медгиз, 1962. – С. 15–53.
23. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, Н.Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 с.

References

1. Piradov M.A., Suponeva N.A. (2015). Autoimmunnyye zabolevaniya nervnoy sistemy: sostoyaniye problemy i perspektivy. Annals of the Russian academy of medical sciences. 70 (2): 183–187. doi: 10.15690/vramn.v70i2.1311[in Russian].
2. Zargarova T.A., Favorova O.O. (1999). Eksperimental'nyy autoimmunnyy entsefalomyelit – model' rasseyannogo skleroza. Immunology. 2: 5–8. Retrieved from: <http://www.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=29994> [in Russian].
3. Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Oct; 164 (4), 1079–1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x. Review. PubMed PMID: 21371012. PMCID: PMC3229753.
4. Lipton M.M., Freund J. (1953). Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants. J Immunol. Aug; 71 (2): 98–109. PubMed PMID: 13084920.
5. Markov D.A. (1973). Demiyeliniziruyushchiye zabolevaniya nervnoy sistemy v eksperimente i klinike. Minsk: Nauka i tekhnika [in Russian].
6. Zhitnukhin Y.L., Khizhnyak M.G. (1987). Immunomorfologicheskiye osobennosti eksperimental'nogo allergicheskogo entsefalomyelita, indutsirovannogo entsefalitogennym polipeptidom. Bul. experim. biology and medicine. 3: 343–346 [in Russian].
7. Link H., Huang Y.M., Thomas M., Xiao B.G. (2001). Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 114: 1–7. PubMed PMID: 11240009.
8. Raine C.S. (1984). Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. Lab Invest. Jun; 50 (6): 608–635. PubMed PMID: 6202955.
9. Braitch M., Constantinescu C.S. (2010). The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS). Inflamm Allergy Drug Targets. Sept.; 9 (4): 249–256. PubMed PMID: 20887272

10. Kim H., Moon C., Ahn M. et al. (2009). Heat shock protein 27 upregulation and phosphorylation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* Dec. 22; 1304: 155–163. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.060. Epub 2009 Sep 23. PubMed PMID: 19781527.
11. Raine C.S. (1986). Experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic neuritis. In: Koetsier J.C. (ed.) *Handbook of clinical neurology*, v. 47. Elsevier, New York: 429–466.
12. Nefyodov O.O., Mamchur V.Y., Kharchenko Y.V. (2014). Modelyuvannya ta otsinka perebihu eksperymentalnoho alerhichnoho entsefalomiyelitu. *Bul. of Biology and Medicine.* 4 (2): 205–208. Retrieved from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2014_4%282%29_46 [in Ukrainian].
13. Rudenko V.A., Hnyedkova I.O., Pichkur L.D. et al. (2014). Vplyv ksenohennoyi transplantatsiyi mezenkhimalnykh stovburovykh klityn ta il-10 na pokaznyky klitynnoho imunitetu u shchuriv z eksperymentalnym alerhichnym entsefalomiyelitom. *Collection of scientific works of staff members.* K., 23 (2): 434–441. Retrieved from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Znpsnmapo_2014_23%282%29_59 [in Ukrainian].
14. Scuteri A., Donzelli E., Rigolio R. et al. (2015). Therapeutic Administration of Mesenchymal Stem Cells Abrogates the Relapse Phase in Chronic Relapsing-Remitting EAE. *J. Stem Cell Res Ther* 2015; 5: 262. Retrieved from: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.1000262>
15. Tsymbalyuk V.I., Kasyanenko Y.A. (2015). Osoblyvosti modelyuvannya ta perebihu eksperymentalnoho alerhichnoho entsefalomiyelitu. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 1: 45–51. Retrieved from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Unkhj_2005_1_10 [in Ukrainian].
16. Mix E., Meyer-Rienecker H., Hartung H.P., Zettl U.K. (2010). Animal models of multiple sclerosis: potentials and limitations. *Prog Neurobiol.* Nov; 92 (3): 386–404. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.06.005. Epub 2010 Jun 15. PubMed PMID: 2055823.
17. Tsymbaliuk V.I., Velychko O.M., Pichkur O.L., Verbovska S.A. (2015). Vplyv mezenkhimalnykh stovburovykh klityn z Vartonovoho studnya pupovyny lyudyny ta interleykinu-10 na povedinkovi reaktsiyi shchuriv z eksperymentalnym alerhichnym entsefalomiyelitom. *Cell and Organ Transplantology.* 3 (1): 46–51. DOI: 10.22494/COT.V3I1.19 [in Ukrainian].
18. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes [Internet]. Council of Europe. 2017 [cited 24 May 2017]. Retrived from: <https://rm.coe.int/168007a67b>.
19. Zakon Ukrainy «Pro zahyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennja» vid 21.02.2006 №3447-IV. *Vidomosti Verhovnoi' Rady Ukrai'ny*, 2006; 27: 990 [in Ukrainian].
20. Velichko O.M., Bilous O.I., Morozov A.M. et al. (2016). inventors; Akad. A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Kiev, Ukraine, assignee. Prystriy «vidkryte pole» dlya doslidzhennya povedinkovykh reaktsiy shchuriv». *Ukraine Patent* 105155. March 10 [in Ukrainian].
21. Velichko O.M., Bilous O.I., Morozov A.M. et al (2016), inventors; Akad. A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Kiev, Ukraine, assignee. Sposib doslidzhennya povedinkovykh reaktsiy shchuriv v ustanovtsi «vidkryte pole». *Ukraine Patent* 104642. February 10 [in Ukrainian].
22. Jabotinsky Y.M. (1962). Normalnaya i patologicheskaya morfologiya nervnoy kletki, nervnogo volokna i okonchaniy. In: Khominsky B.S., ed. *Guide for pathological anatomy.* M.: Medgiz: 15–53 [in Russian].
23. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babych N.N. (2001). Statystycheskye metody v medyko-byolohycheskykh yssledovanyakh s yspolzovaniyem Excel. K.: MORION. Retrieved from: <http://www.twirpx.com/file/223261> [in Russian].

Л.Д. Пичкур, В.М. Семёнова, О.Н. Величко, С.А. Вербовская, Д.М. Егорова, С.Т. Акинола, В.В. Васлович

ОПТИМИЗАЦИЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА С ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ТЕЧЕНИЕМ

С целью стандартизации модели экспериментального аллергического энцефаломиелиита (ЭАЭ) с развитием хронического ремиттирующего течения провели исследования влияния разных доз полного адьюванта Фрейнда (АФ) и энцефалитогенной смеси на степень выраженности поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» и процесса демиелинизации спинного мозга. При тестировании в «открытом поле» крыс с индуцированным ЭАЭ одинарной дозой АФ на 12-е сутки наблюдали угнетение ориентировочно-исследовательской и активацию эмоциональной

активності. Сравнительный патоморфологический анализ особенностей гистоструктуры спинного мозга крыс с ЭАЭ на 35-е сутки показал, что применение как двойной, так и тройной дозы АФ с целью индукции обеспечивает развитие более распространенного демиелинизирующего процесса в сравнении с одинарной дозой АФ. Использование одинарной дозы АФ является оптимальным для получения эффективной модели экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс с хроническим рецидивирующим течением.

Ключевые слова: экспериментальный аллергический энцефаломиелит, поведенческие реакции, демиелинизация.

L.D. Pichkur, V.M. Semenova, O.M. Velichko, S.A. Verbovska, D.M. Yegorova, S.T. Akinola, V.V. Vaslovich

OPTIMIZATION OF MODELING OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS WITH CHRONIC RECURRENT COURSE

In order to standardize the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) with development of chronic remitting course of disease a study of the different doses Freund's Complete adjuvant (AF) effects and encephalolitic mixture on the degree of severity of behavioral reactions in the test «open field» of rats and the process of spinal cord demyelination was conducted. When testing rats in the «open field» with inducted EAE by Freund's adjuvant single dose, on the 12th day, the inhibition of tentative-research and activation of emotional activity were revealed. Comparative pathomorphological analysis of the spinal cord of rats histostucture features with EAE on 35th day showed that the use of both double and triple doses of Freund's adjuvant for induction provides the development of a more widespread demyelinating process in comparison with the single dose of Freund's adjuvant. The use of a single dose of Freund's adjuvant is optimal for obtaining an effective model of experimental allergic encephalomyelitis in rats with chronic recurrence.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, behavioral reactions, demyelination.

Надійшла 09.11.17

Контактна інформація

Пічкур Леонід Дмитрович – доктор медичних наук, нач. науково-організаційного відділу, провідний науковий співробітник відділу відновлювальної та функціональної нейрохірургії, ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Семенова Вера Михайлівна – доктор медичних наук, професор, зав. лабораторії культивування тканин ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Величко Ольга Миколаївна – науковий співробітник лабораторії експериментальної нейрохірургії відділу експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Вербовська Світлана Анатоліївна – науковий співробітник відділу відновлювальної та функціональної нейрохірургії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Адреса: Україна, 04050, м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32.

Тел.: +380444831253; +380676059863.

E-mail: verbovska-svetlana@ukr.net.

Єгорова Діана Михайлівна – молодший науковий співробітник лабораторії культивування тканин ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Акінола Самуель Толувані – аспірант ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».

Васлович Вікторія Вікторівна – науковий співробітник лабораторії електронної мікроскопії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України».