

М. І. Лісяний, О. В. Маркова, Л. М. Бельська

Моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів і його корекція клітинами алогенного головного мозку

На моделі експериментального алергического енцефаломієліта (ЕАЕ) крыс изучали иммунокорректирующее действие клеток аллогенного головного мозга новорожденных животных. ЭАЭ индуцировали введением гомогената спинного мозга взрослых крыс в стимуляторе Фрейнда. Коррекцию осуществляли на 12, 14, 16-е сутки после индукции ЭАЭ внутрибрюшинным введением клеточных фракций мозга новорожденных крыс, обогащенных нейронами или глией. Положительный клинический эффект был получен при использовании нейронов (стабилизация энцефаломієліта и ускорение выздоровления). Коррекция глией сопровождалась утяжелением течения энцефаломієліта и удлинением периода его клинических проявлений. Полученные результаты свидетельствуют о наличии иммунорегуляторного и нейротрофического действия фракции нейронов головного мозга новорожденных животных. Механизм корректирующего эффекта требует дальнейших специальных исследований.

ВСТУП

Фетальні тканини людини і тварин мають особливі властивості, на основі яких нині створюються лікарські препарати нового класу [6]. В експериментальних і клінічних дослідженнях доведено ефективність ембріональної нервової тканини при лікуванні дитячого церебрального паралічу, черепно-мозкової травми, епілепсії та іншої патології нервової системи [11-13]. Значний інтерес викликає перспектива корекції тканинами плодів та ембріонів аутоімунних захворювань.

Раніше у тестах *in vitro* та *in vivo* нами описані “імуноподібні” властивості нейронів і гліальних клітин фетального мозку [5, 9, 10]. Поеднання імунної активності з іншими унікальними властивостями клітин фетального мозку може проявити виражений імунокоригуючий ефект при аутоімунних демієлінізуючих процесах, лікування яких зустрічає великі труднощі.

Метою нашого дослідження було вивчення впливу внутрішньоочеревинного введення гліальних і нейрональних клітинних фракцій головного мозку новонароджених тварин на тяжкість перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) у щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 72 безпородних білих щурах масою 200 г. ЕАЕ моделювали одноразовим введенням у подушечки лап гомогенату спинного мозку щурів (50 мг на 100 г маси) з доданням повного ад'юванту Фрейнда [3]. Тяжкість хвороби оцінювали за шкалою: відсутність клінічних проявів - 0+; знижений тонус хвоста - 1+; слабкість або легкий параліч задніх кінцівок - 2+; важкий параліч задніх або всіх чотирьох кінцівок - 3+; передсмертний стан - 4+; смерть - 5+ [4]. На 12, 14 і 16-ту добу після моделювання ЕАЕ щурам внутрішньоочеревинно вво-

дили суспензії клітин мозку новонароджених тварин, збагачені нейронами або глією (5 - 8 млн клітин мозку на 1 тварину) [14]. Тваринам контрольної групи вводили поживне середовище. За щурами спостерігали щодово протягом двох місяців.

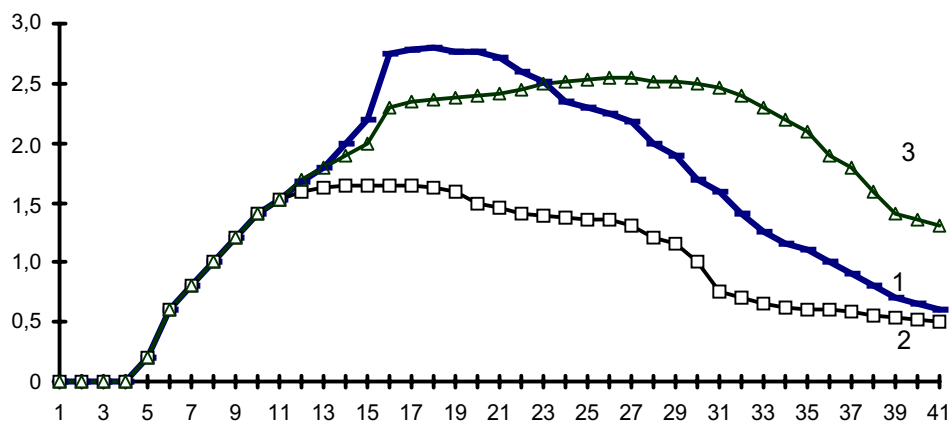
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У щурів контрольної групи перші неврологічні симптоми захворювання спостерігалися на 7-10-ту добу після індукції ЕАЕ. Пік клінічних проявів розвивався на 15-18-ту добу. До 30-ї доби тварини поступово видужували. Клінічна картина була різною: у 44% тварин - ступінь тяжкості 3+; у 28,5% - 1+ - 2+. Безсимптомний перебіг відмічено у 27,5% тварин. У місцях введення ад'юванту спостерігали явища запалення, що зберігалися більше ніж 3 тиж. Динаміка і тяжкість розвитку ЕАЕ (рисунок), відповідають раніше описаним проявам ЕАЕ у цих тварин [3, 8].

При введенні клітин алогенного головного мозку в черевну порожнину тваринам з ЕАЕ (з метою імунокорекції) було отримано коригуючий ефект у разі використання популяції нейронів. Ефект полягав у полегшенні тяжкості перебігу ЕАЕ, тобто, після застосування нейронів ми уже не спостерігали випадків погіршення стану щурів, в той час як у контрольній групі за цей час продовжувала зростати тяжкість хвороби (див. рисунок). До 15-18-ї доби питома маса тварин з тяжкістю хвороби 0+ - 2+ (безсимптомний перебіг і слабкі клінічні прояви) серед щурів, яким вводили нейрональні клітини,

становила 84% випадків, а у контрольній групі - 63%. Перші ознаки поступового одужання тварин при застосуванні нейрональних клітин ми спостерігали на 23-тю добу з моменту індукції, а у контрольній групі лише на 26-27-му добу. Лікувальний ефект від введення нейрональних клітин супроводжувався стиханням явищ місцевих реакцій запалення в місцях введення енцефалітогенної суміші.

У разі використання гліальних клітин алогенного мозку ми не виявили коригуючого енцефаломієліт ефекту. На 15-18-ту добу тяжкість захворювання у цій групі продовжувала, як і у контрольній групі, зростати, запалення в місцях імунізації посилювалося після початку введення гліальних клітин. Корекція гліальними клітинами суттєво вплинула на динаміку перебігу ЕАЕ, уповільнивши одужання тварин. Так, на 26-28-му добу в контрольній групі ми спостерігали вже випадки спонтанного одужання (відновлення рухливості, нормалізацію тону хвоста, зникнення паралічів), на 35-ту добу питома маса тварин з легким (0+ - 1+) ступенем тяжкості ЕАЕ була у цій групі 85%. Серед пролікованих гліальною фракцією клітин головного мозку лише 68% тварин мали аналогічний ступінь тяжкості у цей період, а кількість



Динаміка експериментального алергічного енцефаломієліту та тяжкість його перебігу у щурів після корекції клітинами алогенного головного мозку: 1- контроль; 2 - корекція нейронами; 3 - корекція гліальними клітинами. За віссю абсцис: доба після індукції енцефаломієліту; за віссю ординат: тяжкість хвороби в балах.

щурів зі ступенем тяжкості 3+ була вдвоє більшою порівняно з контрольною групою. Тварини цієї дослідної групи починали одужувати лише після 40 діб. Отже, тривалість клінічних проявів ЕАЕ у щурів після корекції нейтральними клітинами була $20,4 \text{ діб} \pm 1,3 \text{ діб}$, а при корекції гліальними клітинами – $29,2 \text{ діб} \pm 2,5 \text{ діб}$ ($P < 0,05$). У контрольній групі цей показник становив $24,7 \text{ діб} \pm 2,1 \text{ діб}$.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що корекція клітинами алогенного головного мозку аутоімунного демієлінізуючого процесу може бути досягнута у разі використання нейронів. Клінічний ефект виявляється у стабілізації неврологічного стану і прискоренні одужування тварин. Відомо, що при ЕАЕ периваскулярна та паренхімна інфільтрації ЦНС антигенспецифічними CD4-T-лімфоцитами і макрофагами [16, 18, 21], продукція інфільтруючими лейкоцитами і активованою мікроглією фактора некрозу пухлини і токсичних молекул, що руйнують мієлін [1, 7, 8, 15, 17, 19, 20], набряк речовини мозку мають патогенетичне значення [2]. Можна припустити, що реакція організму у відповідь на введення нейронів, пов'язана якоюсь мірою з цими патогенетичними ланками і призводить до корекції ЕАЕ. Не з'ясовано, чому коригуючий ефект не властивий гліальним клітинам. Ми пропонуємо два можливих пояснення. Так, гліальні клітини, маючи антигенпрезентуючі властивості, своєрідний спектр цитокінів і монокінів або перешкоджають природному позбавленню тканини ЦНС інфільтруючих лейкоцитів, або викликають нову хвилю антигенспецифічної реакції на мієлін. У результаті, ми спостерігаємо посилення тяжкості та подовження періоду клінічних проявів ЕАЕ. На користь цього свідчить посилення запальних проявів у місцях введення енцефалітогенної суміші у відповідь на корекцію гліальними клітинами. Не виключено, що особливості ефекту введення гліальних клітин зумовлені властивостями глії, які не притаманні нейронам [5].

Отримані результати важливі для розкриття механізмів лікувальних ефектів фе-

тальних тканин людини і тварин і можуть бути використані для подальшої розробки способів клітинної та тканинної терапії аутоімунних захворювань ЦНС.

ВИСНОВКИ

1. Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) у щурів, індукований введенням мозкового антигену в стимуляторі Фрейнда, має різну ступінь тяжкості з максимумом клінічних проявів на 18-20-ту добу. У більш віддалений період на 25-30-ту добу після індукції ЕАЕ відбувається спонтанна регресія захворювання і клінічне одужання тварин.

2. Клітини головного мозку новонароджених щурів при введенні їх тваринам з ЕАЕ здатні диференційовано впливати на інтенсивність та тривалість перебігу захворювання.

3. Введення фракції алогенного мозку, збагаченої глією, тваринам з індукованим ЕАЕ супроводжувалося збільшенням кількості тварин з вираженою симптоматикою енцефаломієліту і подовженням періоду його клінічних проявів.

4. Введення щурам з ЕАЕ фракції алогенного мозку, збагаченої нейронами, супроводжувалося клінічною стабілізацією енцефаломієліту і прискоренням одужання тварин, що свідчить про імуномодулюючу дію цієї популяції клітин.

M.I.Lysiany, O.V.Markova, L.M.Belska

MODELLING OF RATS EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS AND ITS CORRECTION WITH ALLOGENIC BRAIN CELLS

We studied the immunocorrective effect of the allogenic new-born brain cells on the model of rats experimental allergic encephalomyelitis (EAE). EAE was induced by the immunization of old rats spinal cord homogenate in Freund's adjuvant. Correction was carried on the 12-th, 14-th, 16-th day after the induction of the EAE by the intraperitoneum injection of rat's new-born brain fractions enriched with neurons and glial cells.

A positive clinical effect was achieved by the employment of neurons (the stabilization of encephalomyelitis and the acceleration of the recovery). The glia correction was accompanied by the aggravation in the course of encephalomyelitis and by extension of its clinical manifestation period. The obtained results testify to the existence of both an immunoregulative and a neurotrophic influence of the neuron fraction of the new-born brain cells. The mechanism of a corrective effect needs further special investigation.

*Institute of Neurosurgery Lab. of
Neuroimmunology Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н., Пинегин Б.В. Роль монокинов в патогенезе рассеянного склероза // Иммунология. - 1995.- № 4. - С.58-63.
2. Гусев Е. И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. Рассеянный склероз - М., 1997. - 463 с.
3. Давыдова Г.С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс. - В кн.: Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике.- Минск. Наука и техника, 1969. - С.32-37.
4. Заргарова Т.А., Фаворова О.О. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит - модель рассеянного склероза // Иммунология. - 1999. - № 2. С.5- 8.
5. Иммунная система головного мозга / Под ред. Н.И. Лисяного. - К.- 1999.- 216с.
6. Клименко М.О., Субота Н.П., Питько В.А., Тартарко С.В. Вплив кріоекстракту хоріона на клітинні реакції вогнища запалення // Фізіол. журн. - 1999. -45, № 6. - С.75-80.
7. Лисяний Н.И., Маркова О.В., Бельская Л.Н., Горобец О.Б. Исследование продукции фактора некроза опухоли-альфа различными клетками головного мозга крыс после индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита. - В кн.: Мат. 9-й конференции "Нейроиммунология" и науч.- практ. конференции неврологов (24-27 апр. 2000 г., Санкт- Петербург) СПб. - С.72-73.
8. Лисяний Н.И., Маркова О.В., Горобец О.Б., Бельская Л.Н. Функциональное состояние иммунокомпетентных клеток в селезенке и в головном мозге крыс после индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита // Иммунология та алергологія. - 1998. - № 1. - С.98-103.
9. Лисяний Н.И., Маркова О.В., Олейник Г.М. и др. Изучение противоопухолевой активности клеток развивающегося мозга мышей линии СВА при совместной трансплантации с клетками карциномы легкого Льюис под капсулу почки мыши // Эксперим. онкология. - 1993. - № 6. - С.47-51.
10. Лисяний М.І., Маркова О.В., Семенова В.М., Олейник Г.М. Вивчення in vitro та in vivo протипухлинної дії клітин головного мозку тварин різного віку // Журн. АМН України. - 1999. - 5, № 2. - С.328-337.
11. Павленко В.В., Кутько И.И., Воробьева Т.М. и др. Применение подкожных имплантаций специфической межвидовой эмбриональной нервной ткани у больных с резистентными формами шизофрении // Укр. вестн. психоневрологии. - 1995.- 5. - Вип.2(6). - С.249-252.
12. Савельев С.В., Лебедев В.В., Войтына С.В. и др. Трансплантация дистальной и ксеногенной нервной ткани при болезни Паркинсона // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1994. - № 4. - С.369-371.
13. Цимбалюк В.І., Цімейко О.А., Носов А.Т., Бондар Л.В. Лікувально- відновний вплив експериментальної нейротрансплантації на структуру тканини ішемізованого мозку // Бюл. АНУ. - 1998. - № 7. - С.50-53.
14. Frischbach G..D. Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures // Develop. Biol. - 1972. - 28. - P.407-429.
15. Griot C., Vandeveldel M., Richard A. et al. Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by oxygen radical species // Free Rad. Res. Commun. - 1990. - № 11. - P.181-193.
16. Korner H., Goodsall A.L., Lemckert F.A. et al. Unimpaired autoreactive T-cell traffic within the central nervous system during tumor necrosis factor receptor-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1995.- 92. - P.11066-11070.
17. Merrill J.E., Iggarro L., Sherman M.P. et al. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide // J. Immunology. - 1993. - 151, №.4. - P.2132-2141.
18. Renno T., Zeine R., Girard J.M. et al. Selective enrichment of Th1 CD45RB CD4+ T cells in autoimmune infiltrates in experimental allergic encephalomyelitis // Int. Immunol. - 1994. - 6, № 3. - P.347-354.
19. Renno T., Krakowski M., Piccirillo N. et al. TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis // J. Immunology. - 1995. - 154. - P.944-953.
20. Ruuls S.R., Bauer T., Sontrop K. et al. Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats // J. Neuroimmunol. - 1995. - 56. - P.207-217.
21. Sedgwick J., Schwender S., Imrich H. et al. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1991. - 88. - P.7438-7442

*Ін-т нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова
АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 15.03.2001*