

Особенности изменения иммунологических и биохимических показателей организма крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом

А.Н. Гольцев¹, Ю.А. Козлова¹, Н.Н. Бабенко¹, С.Е. Овсянников¹, Ю.В. Никитченко²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Peculiarities of Change in Immunological and Biochemical Indices in Organism of Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis

GOLTSEV A.N.¹, KOZLOVA YU.A.¹, BABENKO N.N.¹, OVSYANNIKOV S.E.¹, NIKITCHENKO YU.V.²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Kharkov National University named by V.N. Karazin

Представлены результаты изучения показателей иммунного статуса и интенсивности метаболических процессов организма крыс на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) как аналога рассеянного склероза (РС) человека. Отмечено наличие корреляционных взаимосвязей между изученными показателями. Полученные данные могут быть использованы в клинической практике для оптимизации методов лечения РС.

Ключевые слова: экспериментальный аллергический энцефаломиелит, аутоиммунные заболевания, перекисное окисление липидов.

Представлено результати вивчення показників імунного статусу та інтенсивності метаболічних процесів організму щурів на моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) як аналога розсіяного склерозу (РС) людини. Відзначено наявність кореляційного взаємозв'язку між вивченими показниками. Отримані дані можуть бути використані у клінічній практиці з метою оптимізації методів лікування РС.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, аутоімунні захворювання, перекисне окислення ліпідів.

The investigation results of the intensity of metabolic processes and the indices of immune status in the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) of rats as the analogue of human multiple sclerosis (MS) are shown. The presence of correlations between studied indices is noted. The data obtained can be used in clinical practice for optimisation of the MS treatment method.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, autoimmune diseases, lipid peroxidation.

Клиническая практика показывает, что на протяжении последних лет наблюдается отчетливая тенденция к возрастанию числа патологий, имеющих аутоиммунный генез, в частности РС [2,5]. Для лечения подобного рода патологий высокоэффективных фармакологических препаратов не существует, что в значительной степени определяется недостаточностью сведений о механизмах их возникновения и развития на молекулярном и клеточном уровнях.

По современным представлениям определяющую роль в индукции и развитии РС и его экспериментальной модели ЭАЭ играет срыв иммунологической толерантности к собственным энцефалитогенным антигенам. При этом наблюдается повышенная активность Тх1 клеток, которые в условиях изменения цитокинового профиля иницируют экспансию клеточного иммунного ответа. При развитии РС, подобно любому хронически протекающему иммуновоспалительному процессу, наблюдается интенсификация

Clinical practice shows that recently there has been observed a distinct tendency to the growth of pathology numbers with an autoimmune genesis, in particular, MS [2,5]. There are no effective pharmacological preparations for such a kind of pathology treatment, which in a considerable extent is determined by the lack of information about their origin and development mechanisms at molecular and cellular levels.

According to contemporary views, the main role in MS induction and development and EAE as its experimental model is played by the failure of immunology tolerance to the own encephalitogenic antigens. At the same time there is observed an increased activity of Th1 cells, which under conditions of cytokine profile changes initiate the cellular immune response expansion. At MS development, as any state of chronically proceeding immune-inflammatory process, the intensity of free-radical lipid oxidation [13,15] reactions is observed. An increased level of active oxygen forms (AOF) synthesis induces the damage of proteins, lipids, nucleic acids that nowadays

Адрес для корреспонденции: Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720104, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Goltsev A.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720104, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

фикация реакций свободнорадикального окисления липидов [13,15]. Повышенный уровень синтеза активных форм кислорода (АФК) индуцирует повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот, что в настоящее время трактуется как так называемый “ порочный круг “ перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8]. Модификация белков под действием избытка АФК вызывает изменение их конформационной организации с экспансией скрытых антигенных эпитопов и приобретением ими новых иммуногенных свойств. Активирующийся в этих условиях антительный ответ и образующиеся иммунные комплексы стимулируют активность фагоцитов и продукцию АФК. Окисление липидов приводит к появлению хемоаттрактантов, усиливающих миграцию фагоцитов в очаг воспаления.

Много работ посвящено изучению степени изменения иммунного статуса при АИЗ, в частности РС [5, 19,22], и интенсивности свободнорадикальных процессов при данной патологии [1,3,13,15,24]. Однако в теоретическом и практическом аспектах представляют интерес взаимосвязь подобного рода изменений и ее степень. Актуальность изучения корреляции между вышеупомянутыми процессами определяется, во-первых, тем, что изменение состояния иммунного гомеостаза и интенсивность течения ПОЛ являются факторами, взаимоопределяющими друг друга, во-вторых – противоречивостью данных об особенностях течения свободнорадикальных реакций при АИЗ, что связано с использованием неидентичных способов расчета исследованных параметров (на 1 г ткани, мг белка, количество клеток и т.д.) [13,15]. Все это затрудняет анализ и сравнение полученных данных.

Цель работы – определение некоторых показателей иммунного статуса организма, интенсивности ПОЛ и уровня антиоксидантной активности (АОА) на различных этапах развития ЭАЭ.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г. Все манипуляции с животными проводили согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985г.). ЭАЭ индуцировали введением в подушечки лап крыс гомогената аллогенной ткани спинного мозга, эмульгированной в полном адьюванте Фрейнда по методу [4]. Тяжесть клинических проявлений оценивали по следующей шкале: 0⁺ – отсутствие клинических проявлений; 1⁺ – сниженный тонус хвоста; 2⁺ – мышечная слабость или легкий паралич передних конечностей; 3⁺ – тяжелый паралич задних или всех четырех конечностей; 4⁺ –

is interpreted as so-called lipid peroxidation (LPO) “vicious circle” [8]. Protein modification under the AOF surplus influence causes a change in their conformational organisation with the expansion of latent antigen epitopes and their new immunogenic peculiarities gaining. Antibodies response, activated under these conditions and created immune complexes stimulate a phagocyte activity and their AOF production. Lipid oxidation brings to the appearing of chemoattractants, intensifying the phagocyte migration to the inflammation focus.

There are a lot of papers, devoted to the question of studying the degree of change in immune status at AID, in particular MS [5, 19, 22], and the intensity of free-radical processes at this pathology [1, 3, 13, 15, 24] as well. However, in theoretical and practical aspects both such a kind of changes interaction and its degree are of some interest. The actuality of correlation studying between mentioned above processes is determined, firstly, by the fact that change in the state of immune homeostasis and the intensity in the course of LPO are the factors, mutually determining each other, secondly: by data discrepancy about the course peculiarities of free-radical reactions at AID, this is connected with the usage of non-identical calculation ways of the investigated parameters (for 1 g of tissue, mg of protein, cell number, etc.) [13,15]. All this makes difficulties in the analysis and comparison of the data obtained.

The aim of the work is the estimation of some indices of organism immune status, LPO intensity and the antioxidant activity (AOA) level at different stages of EAE development.

Materials and methods

The experiments were performed in white mongrel male rats of 150-180 g. All manipulations with animals were performed according to International principles of the European convention on vertebrates' protection (Strasbourg, 1985). EAE was induced by introduction in rat's paws of the homogenate of spinal cord allogenic tissue, emulsified in a complete Freund's adjuvant according to the method [4]. The clinical manifestations severity was estimated on the following scale: 0⁺ – absence of clinical manifestations; 1⁺ – reduced tail tonus; 2⁺ – myasthenia or light paralysis of anterior extremities; 3⁺ – severe paralysis of posterior extremities and all 4 limbs; 4⁺ – premortal state; 5⁺ – death. The group of intact animals, to those physiological solution was introduced, served as the control. To the 7th, 14th, 21st day after the immunisation the animals were decapitated under a light ether anesthesia, and their blood was taken into a dry test-tube for serum receiving. The peritoneal cavity (PC) cells suspension was taken by washing out with the medium 199 with the calf fetal serum and sodium

предсмертное состояние; 5⁺ – смерть. Контролем служила группа интактных животных, которым вводили физиологический раствор. На 7-е, 14-е, 21-е сутки после иммунизации животных декапитировали под легким эфирным наркозом, кровь собирали в сухую пробирку для получения сыворотки. Суспензию клеток перитонеальной полости (ПП) вымывали средой 199 с добавлением телячьей плодовой сыворотки и цитрата натрия [6]. Содержание адгезивных клеток (АК) перитонеальной полости определяли инкубированием в пластиковых чашках при температуре 37°C в течение 1 часа с дальнейшим отделением неприкрепившихся клеток [6]. Для оценки фагоцитарной активности клетки ПП инкубировали с суточной убитой культурой *Staphylococcus aureus* (1 млрд на 1 мл) [6]. Процент фагоцитировавших клеток – фагоцитарный индекс (ФИ) и число захваченных одной клеткой микроорганизмов – фагоцитарное число (ФЧ) определяли при микроскопическом исследовании препаратов, окрашенных азур-II-эозином (по Романовскому-Гимза). Концентрацию и размер циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом преципитации с 3%-м и 4%-м растворами полиэтиленгликоля (ПЭГ) [9].

Уровень ПОЛ оценивали по содержанию гидроперекисей липидов (ГПЛ) в гомогенатах печени и головного мозга по методу [20], в сыворотке крови, как описано в [17]. Гомогенаты печени и головного мозга готовили на 100 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4); соотношение ткань : буфер (1:3). Спектр поглощения окрашенного продукта записывали на двухлучевом спектрофотометре Specord UV VIS с измерением разности экстинкции при 535 и 580 нм. Содержание ГПЛ выражали в эквивалентных количествах малонового диальдегида (МДА). Содержание белка в гомогенатах определяли методом Лоури в модификации Миллера [21], общую АОА сыворотки крови – по ее способности тормозить накопление ТБК-активных продуктов ПОЛ в суспензии желточных липопротеидов [7]. Данные статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение

Мониторинг состояния животных показал, что у крыс с 7-го дня после индукции заболевания наблюдалась потеря массы тела, а с 10-го - первые клинические признаки (степень тяжести 0⁺-1⁺). На 14-16-е сутки основная масса заболевших животных проявляла клиническую симптоматику в 1⁺-2⁺, на 21-е – 3⁺ балла по принятой шкале оценки. Смертельных исходов выявлено не было.

К 7-м суткам заболевания количество клеток ПП достоверно снижалось на 56% по сравнению с

citrate adding as well [6]. Peritoneal cavity adhesive cells (AC) content was determined by incubation in plastic dishes at 37°C during one hour with the further isolation of the non-adhered cells [6]. For phagocyte activity estimation, PC cells were incubated with 24hrs killed culture *Staphylococcus aureus* (1bil per 1 ml) [6]. The percentage of phagocytosed cells, the phagocyte index (PI), and the number of microorganisms, captured by one cell, the phagocyte number (PN), were determined by microscopic preparations investigation, stained by azur-II-eosin (by Romanovsky-Gimza). The concentration and the size of circulating immune complexes (CIC) in the blood serum were determined by precipitation method with 3% and 4% polyethylene glycol solution (PEG) [9].

LPO level was estimated according to the content of lipid hydroperoxides (LHP) in liver and brain homogenates according to the method [20], in the blood serum, as it was described in the work [17]. The liver and brain homogenates were prepared with 100 mM tris-HCL buffer (pH 7.4); the tissue/buffer ratio is 1/3. The spectrum of stained product absorption was recorded using the two-beam spectrophotometer (Specord UV VIS) with the extinction difference measuring at 535 and 580 nm. LHP content was marked in malone dialdehyde (MDA) equivalent amount. The protein content in homogenates was performed by Loury method in Miller's modification [21], and total blood serum AOA as to its capability to inhibit the accumulation of TBA-active LPO products in yolk lipoproteins suspension [7]. The obtained experimental data were statistically processed with Excel software.

Results and discussion

The monitoring of animal state showed that in rats starting from the 7th day after disease induction the loss of body mass was observed, and from the 10th day the first clinical signs (the severity degree was 0⁺-1⁺) were observed. To the 14th-16th day the majority of fallen ill animals showed the clinical symptoms in 1⁺-2⁺ points, to the 21st it was 3⁺ according to assumed measuring. There were no lethal outcomes.

To the 7th day of disease the number of PC cells statistically decreased by 56% compared with the control (Table 1). To the 14th and 21st day their number recovered to the intact organism level. These changes in index can characterise a generalised response in immune-competent cells to pathological process developing and can testify to both their cytolysis by the antigen introduced and to the release into blood channel for elimination of sharply increased content of finely-dispersed circulating immune complexes (FDCIC) as well. Moreover, there is not excluded the possibility of cell migration out of PC into the sites of direct interaction with specific structures in CNS on

контролем (табл.1). К 14-м и 21-м суткам их количество восстанавливалось до уровня интактного организма. Такие изменения показателя могут характеризовать генерализованный ответ иммунокомпетентных клеток на развивающийся патологический процесс и свидетельствовать как об их цитолизе на вводимый антиген, так и о выходе в кровяное русло для элиминации резко повышенного содержания мелкодисперсных циркулирующих иммунных комплексов (мЦИК). Кроме того, не исключена возможность миграции клеток из ПП в участки непосредственного взаимодействия со специфическими структурами в ЦНС на фоне нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в условиях развития ЭАЭ [23]. Время выраженного (и, возможно, одномоментного) “выброса” клеток из ПП примерно совпадает с периодом накопления пула антигенпрезентирующих, распознающих и эффекторных клеток при развитии иммунного ответа на антиген [22].

Увеличение содержания клеток в ПП к 14-м суткам заболевания может быть следствием как активации их пролиферации *in situ*, так и миграции молодых клеток МФС из костного мозга, которые еще не экспрессируют молекулы клеточной адгезии, что соответствует нашим данным о низком содержании АК ПП к этому времени (табл.1). К 21-м суткам развития ЭАЭ происходило увеличение числа АК ПП более чем в 5 раз по сравнению с 14-ми сутками, и в 1,3 раза превышало контрольный показатель. Известно, что адгезия, как способность клеток закрепляться на искусственных или биологических субстратах, является одним из важнейших свойств макрофагов [10]. Проявление этого свойства есть функция различного класса молекул адгезии [16], степень экспрессии которых на иммунокомпетентных клетках находится под контролем цитокинового профиля организма в целом и *in situ*, в частности [12]. Из этого следует, что отмеченное нами изменение адгезивного потенциала клеток ПП подтверждает факт изменения цитокинового фона при ЭАЭ. Следовательно, в процессе развития ЭАЭ

Таблица 1. Показатели состояния моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) и гуморального звена иммунитета в динамике развития ЭАЭ
Table 1. Monocyte and phagocyte system (MPS) state indices and humoral immunity link in the dynamics of EAE development

Иммунологические показатели Immunological indices	Контроль Control	Сутки Day		
		7-е 7th	14-е 14th	21-е 21st
Количество клеток ПП, 10 ⁶ клеток/мл Number of PC cells, 10 ⁶ cells/ml	14,95±1,07	6,5±0,42 ¹	13,86±0,86 ²	16,89±0,56 ²
Относительное количество АК ПП,% PC AC relative number,%	56,9±0,69	23,09±1,97 ¹	15,26±0,27 ^{1, 2}	79,14±2,17 ^{1, 2}
Абсолютное содержание АК ПП, 10 ⁶ клеток/мл Absolute content of PC AC, 10 ⁶ cells/ml	8,5±0,02	1,68±0,01 ¹	1,05±0,007 ^{1, 2}	13,36±0,03 ^{1, 2}
ФИ клеток ПП,% PI of PC cells,%	36,83±0,83	11,0±0,51 ¹	9,00±0,51 ^{1, 2}	25,12±1,12 ²
ФЧ клеток ПП, абс. ед. PN of PC cells, abs. units	5,25±0,27	7,88±0,64 ¹	6,95±0,21 ¹	5,67±0,45
Общее количество ЦИК, усл. ед./мл раствора The total CIC quantity, rel. units/ml of solution	29,6±1,76	276,66±5,05 ¹	97,0±4,6 ^{1, 2}	131,67±8,65 ^{1, 2}
Количество мЦИК, усл. ед./мл раствора The FDCIC quantity, rel. units/ml of solution	13,23±0,5	128,33±6,03 ¹	62,95±0,40 ^{1, 2}	86,76±6,43 ^{1, 2}

Примечание: ¹ – достоверно по отношению к контролю (P≤0,05); ² – достоверно по отношению к 7-м суткам (P≤0,05).

Notes: ¹ – statistically significant comparing to the control (P≤0.05) ² – statistically significant comparing to the indices on 7th day (P≤0.05).

the background of blood brain barrier (BBB) permeability impairment under conditions of EAE development [23]. Time of a manifested (and may be simultaneous) cell sharp release out of PC approximately coincides with the accumulation period of antigenpresenting, effector and identifying pool cells at immune response to antigen development [22].

To the 14th day of the disease the increase of cell content in PC can be both the cause of their proliferation activation *in situ* and the MPS young cell migration out of bone marrow, which has not expressed the cell adhesion molecules yet, that corresponds to our data about the low content of PC adhesive cells to that time (Table 1). To the 21th day of EAE development the increase of PC AC number was observed more than in 5 times in comparison with the 14th day, which is higher in 1.3 times in comparison with the control number. Adhesion is to be known the capability of cells to adhere on artificial or biological substrates, which is one of the main properties of macrophage [10]. This property manifestation is the function of various classes of adhesion molecules [16], which expression degree on immune-competent cells is under control of the organism cytokine profile in a

в ПП происходит изменение не только количественного содержания, но и качественных характеристик макрофагальных элементов в виде перераспределения их субпопуляционного состава. Подобная закономерность выявлена при исследовании уровня экспрессии молекул клеточной адгезии на мононуклеарах периферической крови у больных РС на субклинической стадии заболевания [18].

Функциональный потенциал фагоцитирующих клеток зависит от ряда параметров, включая наличие молекул адгезии на их мембране [12]. Поэтому закономерно, что при определении фагоцитарной способности перитонеальных макрофагов существенно изменялись ФИ и ФЧ. Так, ФИ к 7-м и 14-м суткам снижался в 3 раза, а к 21-м – в 1,5 раза по сравнению с контролем. В то же время поглощающая активность каждой клетки к 7-м суткам возрастала в 1,5 раза, а к 14-м - в 1,3 раза, что может отражать компенсаторную реакцию клеток на изменение их количества.

Одним из характерных признаков развития хронического иммуновоспалительного процесса, включая и АИЗ, является чрезмерное накопление в организме ЦИК [14]. Эти субстраты ИС в физиологических условиях играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза [12]. По мере увеличения их количества они начинают приобретать патогенетическую значимость. Процесс чрезмерного накопления иммунных комплексов является одной из причин развития повреждения тканей при РС [14]. В общем спектре ЦИК наиболее патогенными являются мелкодисперсные структуры. Так, установлено достоверное увеличение к 7-м суткам как количества мЦИК в 10 раз, так и суммарного количества ЦИК в 9,3 раза по сравнению с контролем. К 14-м и 21-м суткам количество мЦИК продолжало оставаться выше уровня контроля, но существенно снижалось по сравнению с 7-ми сутками. Снижение содержания ЦИК к этим суткам может объясняться оседанием их на эндотелии сосудов “шоковых органов”, что приводит к уменьшению количества и с одновременной реализацией их патогенного действия [12].

Представляло интерес изучить, каким же образом в условиях описанного выше нарушения иммунного гомеостаза организма животных с ЭАЭ изменяется содержание ГПЛ и АОА .

При определении интенсивности ПОЛ было отмечено, что, несмотря на однонаправленность развития данного процесса в гомогенатах разных органов, наблюдались и тканеспецифические особенности. Так, в печени содержание ГПЛ с динамикой изменения, обратной нарастанию неврологических проявлений болезни, было выше контрольных значений в 4,3 раза на 7-е сутки. К

whole and in situ, in particular [12]. As it proceeds, the mentioned by us change in adhesive potential of PC cells confirms the change in cytokine background at EAE. Thus, in the process of EAE development in PC not only the change in quantitative content, but that in qualitative characteristics of macrophage elements in the form of their subpopulation content redistribution take place. Such regularity is revealed when investigating the cellular adhesion molecules expression level on the periphery blood mononuclear in patients with MS on disease subclinical stage [18].

Phagocyte cells functional potential depends upon several parameters, including the presence of adhesion molecules on their membrane [12]. Therefore, when determining the phagocyte ability of peritoneal macrophages both the PI and PN considerably changed, that is the regularity. Thus, PI by the 7th and the 14th day decreased in 3 times, and by 21st day did in 1.5 time, in comparison with the control. At the same time the absorbing activity of each cell increased by the 7th day in 1.5 time and by the 14th day in 1.3 times, which may reflect the compensatory cells reaction on the change in their number.

Among the characteristic symptoms of chronic immune-inflammatory process development, including AID is excessive CIC accumulation in organism [14]. These IS substrates in physiological conditions play a very important role in immune homeostasis keeping [12]. With the increase of their number they begin to gain pathogenetic significance. Immune complexes excessive accumulation process is one of the tissue damage causes at MS [14]. In total CIC spectrum the finely-dispersed structures are the most pathogenic. Thus, statistically true increase of both FDCIC number in 10 times and also the summarised CIC number in 9.3 times is found to the 7th day in comparison with the control. To the 14th and the 21st day FDCIC number continued to be higher than the control level, but as much lower in comparison with the 7th day. The decrease of CIC content to these days can be explained by their settling on the vessels endothelium of “shock organs” which results in the decrease in the number with simultaneous realisation of their pathogenic action [12].

It was interesting to study the way of LHP and AOA content change under conditions of mentioned above immune homeostasis disorder in EAE animal organisms.

When estimating LPO intensity it was noted that, in spite of the one-way LPO process development in organs' homogenates, tissue-specific peculiarities were observed as well. Thus, in liver the LHP content, having the dynamics of changes, which is inverse to an increase in the neurological disease manifestation, was higher than the control values in 4.3 times to the 7th day. To the 14th and 21st day the decrease of LHP level was observed which, however, was higher than

14-м и 21-м суткам снижался уровень ГПЛ, который, однако, оставался выше контрольных значений. В мозгу уровень ГПЛ после значительного повышения на 7-е сутки на пике клинической манифестации патологии был достоверно ниже контроля (рис.1).

Таким образом, оценка интенсивности свободнорадикальных реакций в гомогенатах печени и мозга показала, что у животных с ЭАЭ активация процессов ПОЛ происходит уже на стадии доклинических проявлений заболевания (7-е сутки) с достоверным снижением содержания ГПЛ к 14-м и 21-м суткам (фаза клинических проявлений). Вместе с тем общая АОА сыворотки крови и содержание в ней ГПЛ достоверно повышались на 14-е сутки развития заболевания по сравнению с контрольными значениями (табл.2). К 21-м суткам развития ЭАЭ отмечена активация процессов ПОЛ с увеличением количества ГПЛ в сыворотке крови на 13%, в гомогенатах мозга на 11% по сравнению с 14-ми сутками патологии. При этом количество ГПЛ в гомогенатах печени снижалось на 23%, АОА сыворотки оставалась на уровне 14-х суток ЭАЭ.

Приведенные результаты согласуются с современными концепциями о физиологической роли ПОЛ. Так, авторы работы [8] считают, что повышение содержания гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот мембран под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения приводит к праймингу иммунокомпетентных клеток, повышению проницаемости их мембран для ионов кальция, включению гена, ответственного за наработку в клетках индуцибельной NO-синтазы, продукты деятельности которой улучшают микроциркуляцию крови. Можно предположить, что подобные изменения происходят и на начальных этапах развития АИЗ. Поэтому повышение ГПЛ в фазе доклинического развития заболевания может манифести-

Таблица 2. Динамика изменений содержания ГПЛ и АОА сыворотки крови крыс с ЭАЭ

Table 2. The dynamics of change in LHP content and AOA in blood serum of rats with EAE

Показатель Index	Контроль Control	Сутки Day		
		7-е 7th	14-е 14th	21-е 21st
Содержание ГПЛ, нмоль МДА/мл LPO content, nmol of MDA per ml	2,46±0,11	2,67±0,19	3,05±0,21*	3,44±0,17*
АОА, %	50,3±3,38	54,45±1,25	58,8±2,0*	57,9±1,13

Примечание: * – достоверно по отношению к контролю (p≤0,05).

Note: * – statistically significant comparing to the control (p≤0.05).

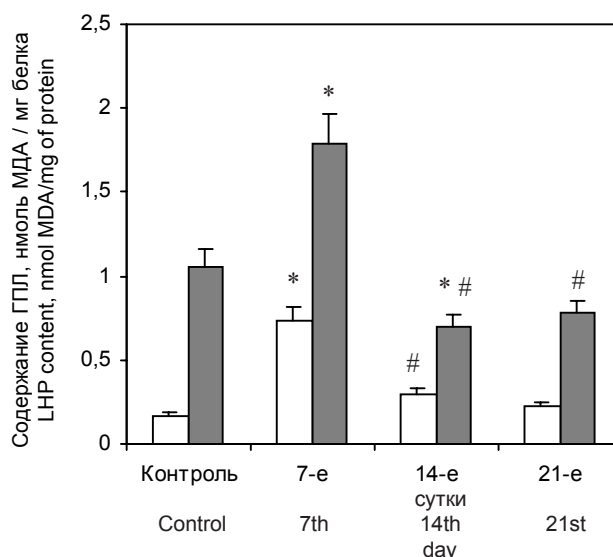


Рис.1. Динамика изменения содержания ГПЛ в гомогенатах тканей крыс с ЭАЭ. □ – печень; ■ – мозг; * – достоверно по отношению к контролю (P≤0,05); # – достоверно по отношению к 7-м суткам (P≤0,05).

Fig 1. The dynamics of changes in LHP content in tissue homogenates of rats with EAE. □ – liver; ■ – brain; * – statistically significant comparing to the control (P≤0.05); # – statistically significant comparing to the indices on 7th day (P≤0.05).

the control values. The LHP level in brain after considerable increase to the 7th day at the peak of pathology clinical manifestation was significantly lower than the control (Fig.1).

Thus, free radical reactions intensity assessment in liver and brain homogenates showed that in animals with EAE the LPO process activation took place at the stage of pre-clinical disease manifestation (7th day) with statistically significant decrease of LHP content to the 14th and 21st day (the phase of clinical manifestations). At the same time the total AOA of blood serum and the LHP content in it significantly increased to the 14th day of the disease development, comparing with the control values (Table 2). To the 21st day of EAE development, the LPO process activation with the increase of LHP content in blood serum by 13 %, for brain homogenates by 11%, compared with the 14th day of the pathology, is noted. Under these conditions the LHP number in liver homogenates decreased by 23%, AOA of serum remained at the EAE 14th day level.

The given results are coordinated with the current conceptions about LPO physiological role. Thus, the authors of the paper [8] consider that the increase in the content of membrane non-saturated fatty acids hydroperoxides under the influence of low intensive laser irradiation brings to the priming in immune-competent cells, the increase in their membrane permeability for calcium ions, to gene including, which is responsible for the accumulation of inducible

ровать активацию ИС организма, необходимую для инициации иммуновоспалительной реакции [8]. Снижение содержания ГПЛ к 14-м и 21-м суткам происходит либо в результате их утилизации при синтезе простагландинов [11], либо из-за выхода их в кровяное русло, что подтверждается достоверным повышением содержания ГПЛ в сыворотке крови на тот же период развития патологии. Увеличение АОА является ответной реакцией на данные изменения (табл.2).

Итак, проведенные исследования показывают наличие выраженных изменений уровня биохимических процессов (ГПЛ, АОА) и показателей, характеризующих состояние иммунокомпетентной сферы (ФИ, ФЧ, процент АК клеток ПП, уровень ЦИК), в условиях развития ЭАЭ как на стадии доклинической картины заболевания, так и на стадии острой фазы. Наивысшие показатели содержания ГПЛ в гомогенатах печени и мозга отмечены в период доклинической фазы развития заболевания, что может свидетельствовать об определенном вкладе ПОЛ в развитие АИЗ, в частности ЭАЭ. Можно предположить, что снижение содержания ГПЛ в мозгу в период острой фазы связано, по-видимому, с истощением субстратов ПОЛ головного мозга вследствие слишком быстрой деструкции миелина и выхода свободных жирных кислот в ликвор и через ГЭБ в кровяное русло. Одновременное повышение содержания ГПЛ в сыворотке крови частично подтверждает данное предположение. Подобная направленность процессов отмечена у больных РС на стадии острой фазы [13].

Математическая обработка результатов (проведенный корреляционный анализ) подтверждает следующую взаимосвязь. Значения коэффициентов корреляции при оценке взаимосвязи между содержанием ГПЛ и количеством мЦИК при патологии составляли 0,55-0,82 ($p \leq 0,05$). В то же время у контрольных животных коэффициент корреляции был значительно ниже и не являлся достоверным (от 0,11 до 0,45). Положительная корреляция между мЦИК и изменением АОА отмечена на 7-е сутки патологии, а к 14-м суткам взаимосвязь стала обратной (рис. 2).

Выводы

Таким образом, выбранная экспериментальная модель может быть использована для выявления определенных закономерностей, степени и характера изменений состояния иммунокомпетентной сферы и активности метаболических процессов в организме при развитии АИЗ в виде ЭАЭ. Полученные в работе данные могут служить предпосылкой оптимизации методов лечения РС в клинической практике, в частности продуктами эмбриофетоплацентарного комплекса.

NO-synthetase in cells, which activity products improve the blood microcirculation. It is possible to suppose that such changes take place at the initial stages of AID development as well. Thus, the increase of LHP content in the pre-clinical disease development phase can manifest the organism immune system (IS) activation, which is necessary for immune-inflammatory reaction initiation [8]. The decrease of LHP content to the 14th and the 21st day takes place either as the result of their utilization during synthesis of prostaglandins [11], or as a case of their entrance in blood channel that is confirmed by the statistically significant LHP increase in blood serum for the same period of pathology development. AOA increase is the response to the given changes (Table 2).

Thus, performed investigations show the existence of the expressed changes in the level of biochemical processes (LHP, OAO) and the indices which characterize the state of immune-competent sphere (PI, PN, the percent of PC ACs, CIC level), in conditions of EAE development both at pre-clinical disease picture stage and at an acute phase one as well. The highest indices of LHP content in liver and brain homogenates are noted in the period of disease development pre-clinical phase that can testify the certain LPO contribution into the AID development, EAE, in particular. It is possible to suppose that the decrease of LHP content in brain in an acute phase period is probably connected with exhaustion of LPO brain substrates in the case of too fast myelin destruction and the free fatty acids entrance into liquor and through BBB into blood channel. Simultaneous increase of LHP content in blood serum partially confirms this supposition. Such direction of the process is observed in the patients with MS at an acute phase stage [13].

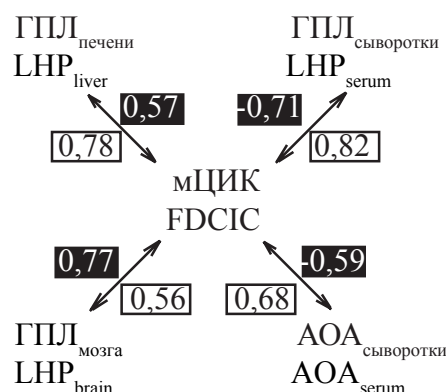


Рис. 2. Значения коэффициентов корреляции между количеством мЦИК и уровнем свободнорадикальных процессов. □ – 7-е сутки; ■ – 14-е сутки.

Fig. 2. Correlation coefficients values between MFCIC number and free radical processes level. □ – 7th day; ■ – 14th day.

Литература

1. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед. науки та освіти.– 2000.– №1.– С. 22-37.
2. Гольцев А.Н., Грищенко В.И., Бабенко Н.Н. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как возможная модель изучения механизма действия продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса при лечении аутоиммунных заболеваний // Пробл. криобиологии.– 2002.– №2.– С. 34-43.
3. Гольцев А.Н., Овсянников С.Е., Козлова Ю.А. и др. Изучение характера взаимодействия между степенью развития аутоиммунных заболеваний и интенсивностью перекисного окисления липидов // Укр. біохім. журн.– 2002.– Т.74, №4а (додаток 1).– С. 123.
4. Давыдова Г.С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс // Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике.– Минск: Наука и техника, 1969.– С. 32-37.
5. Завалишин И.А., Жученко Т.Д., Переседова А.В. Патогенез и лечение рассеянного склероза (состояние проблемы на 2000 год) // Вестник Рос. Акад. мед. наук.– 2001.– № 7.– С. 18-22.
6. Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть.– Киев: Выща школа, 1989.– 304 с.
7. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселнин Ю.О. и др. Оценка антиоксидантной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лаб. дело.– 1988, №5.– С. 59-62.
8. Клебанов Г.И., Чичук Т.В., Владимиров Ю.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на пероксидацию мембранных липидов и концентрацию ионов кальция в цитозоле фагоцитов // Биол. мембраны.– 2001.– Т.18, №1.– С. 42-51.
9. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 365 с.
10. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.– Новосибирск: "Наука", 1989.– 344 с.
11. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Под ред. Ю.А. Зозули. – Киев: Наук.думка, 1997.– 420 с.
12. Ройт А. Основы иммунологии / Под ред. Р.Г. Василова, А.Ф. Киркина.– М.: Мир, 1991.– 327 с.
13. Соколова Л.И., Юрженко Н.М., Брюзеіна Т.С. Липопероксидація у хворих на розсіяний склероз // Фізіол. журн.– 1997.– Т. 43, №3-4.– С. 86-92.
14. Хондкарион О.А., Завалишин И.А., Невская О.М. Рассеянный склероз.– М., 1987.– 256 с.
15. Штибель В.Г., Терлецька О.І., Серветник М.І. Экспериментальный алергічний енцефаломієліт: патоморфологія, патогенез, клініка // Буковинський мед. вісник.– 2000.– Т.4, №3.– С. 223-228.
16. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. // FASEB J.– 1994.– Vol.8, N8.– P. 504-512.
17. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of tiobarbituric acid test for deleting lipid hydroperoxides // Lipids.– 1980.– Vol.15, N3.– P.137-140.
18. Kraus J., Engelhardt B., Chatzimanolis N., et al. Cell surface bound and soluble adhesion molecules in CSF and blood in multiple sclerosis: correlation with MRI-measures of subclinical disease severity and activity // J. Neuroimmunol.– 2002.– Vol.122, N1-2.– P.175-185.
19. Martino G., Hartung H.P. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T-cells // Curr. Opin. Neurol.– 1999.– Vol.12.– P. 309-321.
20. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid

Mathematical processing of results (carried-out correlation analysis) confirms the following relationship. The values of coefficients of correlation when estimating the interaction between LHP content and the number of FDCIC at the pathology were from 0.55 to 0.82 ($p \leq 0.05$). At the same time in control animals the correlation coefficient was considerably lower and not statistically significant (from 0.11 to 0.45). The positive correlation between MFCIC and AOA change is found only to the 7th day of the pathology, to the 14th day the interaction became reverse (Fig. 2).

Conclusions

Thus, the chosen experimental model can be used to reveal the specific regularities, the degree and the character of the change in the immune-competent sphere state and the metabolic processes activity in the organism at AID development in the form of EAE. Obtained data can serve as premise for the optimisation of the MS treatment methods in the clinical practice, in particular, by the embryofetoplacental complex products [2].

References

1. Goltsev A.N. Possible causes of the development of autoimmune pathology and the search for its treatment ways // Probl. Med. Nauki ta Osvity.– 2000.– N1.– P.22-37.
2. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Babenko N.N. Experimental allergic encephalomyelitis as a probable model for studying the effect mechanism of the products of embryofetoplacental complex when treating autoimmune diseases // Problems of Cryobiology.– 2002.– N2.– P. 34-43.
3. Goltsev A.N., Ovsyannikov S.E., Kozlova Yu.A., et al. Study of the relationship character between the extent of the development of autoimmune diseases and the intensity of lipid peroxidation // Ukr. Biochim. Zhurn.– 2002.– Vol.74, №4a (ann. 1).– P. 123.
4. Davydova G.S. Application of adjuvant with various amount of BCG for EAE reproduction in rats // Acute encephalomyelitis in the experiment and clinic.– Минск: Nauka i tekhnika, 1969.– P. 32-37.
5. Zavalishin I.A., Zhuchenko T.D., Peresedova A.V. Pathogenesis and treatment of multiple sclerosis (state of the problem to 2000 year) // Vestnik RAMN.– 2001, N7.– P.18-22.
6. Immunology: Practicum / Paster E.U., Ovod V.V., Pozur V.K., Vykhota N.E.– Kiev: Vyscha shkola, 1989.– 304 p.
7. Klebanov G.I., Babenkova I.V., Tesel'nik Y.O. et al. The estimation of antioxidant activity of blood plasma with application of yolk lipoproteids // Lab. Delo.– 1988.– N5.– P.59-62.
8. Klebanov G.I., Chichuk T.V., Vladimirov Y.A. The influence of low-intensive laser radiation on membrane lipids peroxidation and calcium ion concentration in cytosol of phagocytes // Biol. membrany.– 2001.– Vol.18, N1.– P. 42-51.
9. Laboratory methods of investigations in clinic. Reference book / Ed. by Menshikov V.V.– Moscow: Meditsina, 1987.– 365 p.
10. Mayanskiy A.N., Mayanskiy D.N. Essays about neutrophil and macrophage. Novosibirsk: Nauka, 1989.– 344 p.
11. Oxidation and antioxidation homeostasis in norm and pathology / Ed. by Zozulya Yu.A.– Kiev: Nauk. Dumka, 1997.– 420 p.

- peroxidation on aging, CCL₄ intoxication and vitamin E efficiency // *Biochem. Med.*– 1980.– Vol.23, N3.– P. 302-311.
21. *Miller B.L.* Protein determination for large numbers of samples // *Anal. hem.*–1959.– V.31, N5.– P. 964-966.
 22. *Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H.* Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases // *Trends Neurosci.*– 2002– Vol.25, N6.– P. 313-319.
 23. *Sharief M.K., Noori M.A., Ciardi M., et al.* Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage // *J. Neuroimmunol.*– 1993.– Vol.43, N1-2.– P. 15-21.
 24. *Syburra C., Bassi S.* Oxidative stress in patients with multiple sclerosis // *Укр. біохім.журнал.*– 1999.– T.71, N3.– C. 112-115.

Поступила 02.12.2003

12. *Reut A.* Grounds of immunology / Ed. by Vasilov R.G., Kirkin A.F.– Moscow: Mir, 1991.– 327 p.
13. *Sokolova L.I., Yurzhenko N.M., Bryuzgina T.S.* Lipid peroxidation in patients with multiple sclerosis // *Fiziol. zhurn.*– 1997.– Vol.43, N3-4.– P. 86-92.
14. *Hondkarion O.A., Zavalishin I.A., Nevskaya O.M.* Multiple sclerosis.– Moscow, 1987.– 256 p.
15. *Shtibel V.G., Terletska O.I., Servetnik M.I.* Experimental allergic encephalomyelitis: pathomorphology, pathogenesis, clinics // *Bukovin. med. visnyk.*– 2000.– Vol.4, N3.– P. 223-228.
16. *Albelda SM, Smith CW, Ward PA.* Adhesion molecules and inflammatory injury // *FASEB J.*– 1994.– Vol.8, N8.– P. 504-512.
17. *Asakawa T., Matsushita S.* Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // *Lipids.*– 1980.– Vol.15, N3.– P.137-140.
18. *Kraus J., Engelhardt B., Chatzimanolis N., et al.* Cell surface bound and soluble adhesion molecules in CSF and blood in multiple sclerosis: correlation with MRI-measures of subclinical disease severity and activity // *J. Neuroimmunol.*– 2002.– Vol.122, N1-2.– P.175-185.
19. *Martino G., Hartung H.P.* Immunopathogenesis of multiple sclerosis: the role of T-cells // *Curr. Opin. Neurol.*– 1999.– Vol.12.– P. 309-321.
20. *Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K.* Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation on aging, CCL₄ intoxication and vitamin E efficiency // *Biochem. Med.*– 1980.– Vol.23, N3.– P. 302-311.
21. *Miller B.L.* Protein determination for large numbers of samples // *Anal. hem.*–1959.– V.31, N5.– P. 964-966.
22. *Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H.* Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases // *Trends Neurosci.*– 2002– Vol.25, N6.– P. 313-319.
23. *Sharief M.K., Noori M.A., Ciardi M., et al.* Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage // *J. Neuroimmunol.*– 1993.– Vol.43, N1-2.– P. 15-21.
24. *Syburra C., Bassi S.* Oxidative stress in patients with multiple sclerosis // *Ukr. biokhim.zhurn.*– 1999.– Vol.71, N3.– P. 112-115.

Accepted in 02.12.2003