

УДК 616.832-004.2-056.7:612.612.001.6

В. В. Гейко

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛОВЫХ АСПЕКТОВ «СЕМЕЙНОГО» РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА И СТЕПЕНИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ОТЯГОЩЕННОСТИ

В. В. Гейко

Експериментальне дослідження статевих аспектів «сімейного» розсіяного склерозу в залежності від типу і ступеня спадкової обтяженості

V. V. Geyko

The experimental study of the gender aspects of multiple sclerosis "family forms" depending on the type and degree of hereditary oppression

С использованием 134 иммунизированных нелинейных белых крыс обоего пола проведены исследования половых особенностей предрасположенности к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) в качестве модели рассеянного склероза (РС) у потомства двух поколений, отягощенных болезнью производителей по материнской и отцовской линиям. Показано, что у потомков-самочек уровень заболеваемости и тяжесть клинического течения демиелинизирующих нарушений не зависят от пола и степени наследственной отягощенности производителей; у самцов же из потомства I и II генераций по отцовской линии отмечается максимальная (100 %-ная) восприимчивость к индукции ЭАЭ и достоверно повышенный уровень неврологического дефицита в сравнении с контролем. Анализ генетической дисперсии признаков чувствительности и устойчивости к индукции экспериментального РС, а также фенотипической гетерогенности его «семейных» форм свидетельствует о существенной роли самца-производителя в обеспечении предрасположенности к развитию демиелинизирующей патологии у потомства мужского пола, что указывает на перспективность исследований половых особенностей отягощенной наследственности с целью идентификации и раннего выявления факторов риска развития аутоиммунной демиелинизирующей патологии у членов семей пациентов с РС.

Ключевые слова: экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, половые особенности, уровень заболеваемости, предрасположенность к развитию рассеянного склероза, линия наследственной отягощенности, I и II поколения потомства

З використанням 134 імунізованих нелінійних білих щурів обох статей проведені дослідження статевих особливостей схильності щодо розвитку експериментального аутоімунного енцефаломиєліту (ЕАЕ) як моделі розсіяного склерозу (РС) у потомства двох поколінь, обтяжених хворобою плідників за материнською та батьківською лініями. Показано, що у нащадків-самочок рівень захворюваності та тяжкість клінічного перебігу демієлінізуючих порушень не залежать від статі та ступеня спадкової обтяженості плідників; у самців же з потомства I та II генерацій за батьківською лінією відзначається максимальна (100 %-на) сприйнятливості щодо індукції ЕАЕ та вірогідно підвищений рівень неврологічного дефіциту порівняно з контролем. Аналіз генетичної дисперсії ознак чутливості та стійкості до індукції експериментального РС, а також фенотипічної гетерогенності його «сімейних» форм свідчить про суттєву роль самця-плідника у забезпеченні схильності щодо розвитку демієлінізуючої патології у потомства чоловічої статі, що вказує на перспективність досліджень статевих особливостей обтяженої спадковості з метою ідентифікації та раннього виявлення чинників ризику розвитку аутоімунної демієлінізуючої патології у членів сімей пацієнтів з РС.

Ключові слова: експериментальний аутоімунний енцефаломиєліт, статеві особливості, рівень захворюваності, схильність щодо розвитку розсіяного склерозу, лінія спадкової обтяженості, I та II покоління потомства

With the use of immunized 134 un-bred white rats (both males and females) this investigation was conducted to reveal gender peculiarities of the predisposition to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model of multiple sclerosis (MS) in the offspring from the second generations burdened with the illness both in mother and father parent's line. It was shown that in the female offspring's the morbidity and the clinical disease severity course of demyelization disorders didn't dependent on the gender and the degree of parents hereditary; 100 % of male offspring from I and II generations in father line had susceptibility to EAE induction and it was statistically proved by the high level of neurological deficit. Analysis of the genetic variance signs of sensitivity and resistance to the induction of experimental MS together with phenotypic heterogeneity of its "family forms" had the evidence about the important role of the male partner in providing of the predisposition to the development of demyelization pathology in the male offspring's, which indicates on promising of the investigations devoted to the gender peculiarities of hereditary with the purpose of identification and early detection of risk factors of the development of auto-immune demyelization diseases in family members of patients with MS.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis, gender peculiarities, morbidity, the predisposition to the development of multiple sclerosis, hereditary oppression line, the I and II generation of offspring

Ретроспективный анализ клинико-эпидемиологических показателей рассеянного склероза (РС) за период с 1999 по 2008 г. и по настоящее время [1] свидетельствует о патоморфозе заболевания, характеризующемся более злокачественным течением по сравнению с 1970—1980 гг. в виде увеличения скорости прогрессирования демиелинизирующей патологии, увеличения числа больных с первично-прогрессирующим типом течения, случаев дебюта в детском возрасте; сокращением времени достижения умеренной и тяжелой инвалидизации, развитием вторично-прогредиентных форм. Тем более, рост числа больных с РС, наблюдающийся во всем мире, а также увеличение представленности дебюта заболевания в педиатрическом

и ювенильном возрасте, дают основание предполагать существование связи между появлением и широким применением препаратов иммуномодулирующей терапии РС с 90-х годов прошлого столетия, способствующих существенному улучшению качества жизни пациентов и расширению возможностей реализации репродуктивных функций. В соответствии с этим, в настоящее время потомство больных с РС, достигая половой зрелости, может вносить свой вклад в обеспечение роста заболеваемости и представлять интерес для изучения иммунологических и биохимических особенностей предпатологических состояний в качестве факторов риска развития РС на его доклинической стадии.

Очевидно, их семейный скрининг позволит ставить диагноз родственникам разной степени родства на самой

ранней стадии заболевания [2—6]. С учетом этого, не теряют актуальности фундаментальные исследования мультифакториальных механизмов предрасположенности к развитию РС, а также генетически детерминированного индивидуального ответа на применение различных фармпрепаратов [7]. Тем более, что успех в лечении РС в настоящее время определяется максимально ранним началом патогенетической терапии с использованием современных препаратов, изменяющих его течение.

С целью выяснения вклада наследственного компонента в обеспечение предрасположенности к развитию экспериментального рассеянного склероза основной задачей исследования являлось микропопуляционное изучение уровня заболеваемости и характера его клинического течения у самок и самцов из потомства чувствительных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) животных. В соответствии с этим, в работе осуществлялось последовательное накопление наследственной отягощенности РС по отцовской и материнской линиям. Исследование проводилось перманентно, на протяжении не менее 18 месяцев, в три этапа: на первом — ЭАЭ индуцировали у самок в состоянии беременности, а также у самцов для определения чувствительности и устойчивости к формированию РС у животных — пробандов изучаемого потомства с учетом материнской и отцовской линий; на втором — у этого потомства, являвшегося I поколением болевших матерей либо отцов (дети, F1), по завершении пубертатного возраста (4 месяца) моделировали РС. После иммунизации и окончания периода манифестации неврологических нарушений (от 1,5 до 2 месяцев) в состоянии ремиссии самки и самцы I поколения болевших производителей спаривались с устойчивыми или болевшими животными для выделения линии отягощенности, и уже у их потомства (II поколение — внуки, F2) по достижении половой зрелости на третьем этапе изучали особенности предрасположенности к развитию экспериментальной аутоиммунной демиелинизирующей патологии у животных разного пола.

Целью работы являлось изучение половых особенностей, уровня заболеваемости и тяжести клинического течения демиелинизирующих нарушений у отягощенного экспериментальным РС потомства двух поколений по материнской и отцовской линиям.

В качестве модели РС индуцировали ЭАЭ путем активной иммунизации животных энцефалитогенной смесью, приготовленной *extemporae* из гомогената аллогенного спинного мозга в дозе 55—60 мг на 100 г массы тела животного с 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда ("Difco Laboratories", USA) общим объемом 0,35—0,40 мл.

В дальнейшем проводили еженедельное взвешивание животных, оценку их неврологического статуса с регистрацией времени (суток) появления первых признаков заболевания, его длительности с учетом сохранности и редукции неврологической симптоматики, а также тяжести течения демиелинизирующей патологии по 6-балльной шкале с определением индивидуальных клинических индексов, определяемых на основании выраженности и распространенности неврологических нарушений в виде спастичности, мышечной слабости, изменений тонуса хвоста, парезов и параличей конечностей, развития атаксии, тремора, дисфункции тазовых органов и дыхательной мускулатуры, тонических и клонических судорог, бокового положения и др.

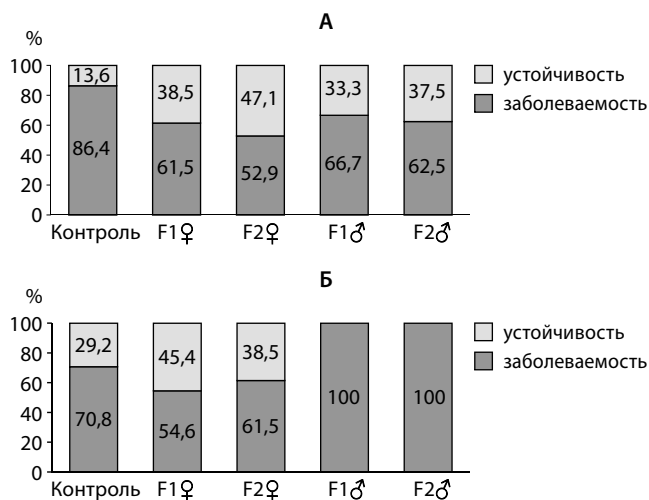
Для интегративной оценки выраженности неврологического дефицита у каждого животного за весь период

наблюдений рассчитывали кумулятивный индекс болезни в виде суммы индивидуальных клинических индексов [8] и обобщенный клинический индекс, представляющий собой усредненную сумму среднего клинического индекса и среднего клинического индекса на пике болезненных проявлений. С использованием авторской классификации [8] в некоторой нашей модификации на основе средних значений индивидуальных показателей обобщенного клинического индекса заболеваний животные распределялись в подгруппы в соответствии с тяжестью клинической картины: легкое течение — от 0,5 до 1,5 балла; течение средней тяжести — от 1,6 до 2,5 балла; тяжелое течение — от 2,6 до 4,0 баллов; очень тяжелое течение — от 4,1 до 5,5 балла; летальный исход — 6 баллов.

Статистический анализ результатов исследования для определения достоверности отличий между группами сравнения осуществляли с помощью программы Excel с применением непараметрического *t*-критерия Стьюдента.

Исследования проведены в соответствии с «Общезначимыми принципами экспериментов на животных» (Украина, 2001), которые согласуются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) с использованием 134 иммунизированных крыс: I группа (контроль) — случайная популяция (22 самки, 24 самца); II-я — потомство болевшей самки и устойчивого самца (F1 — I поколение, дети: 13 самок, 11 самцов; F2 — II поколение, внуки: 17 самок, 13 самцов); III-я — потомство болевшего самца и устойчивой самки (F1 — 9 самок, 9 самцов; F2 — 8 самок, 8 самцов).

Показано, что как в I-м, так и во II-м поколениях самочки характеризовались пониженным уровнем заболеваемости (в среднем на 29,5 %) независимо от линии отягощенности. Вместе с этим, заболеваемость самцов в группах «детей» по материнской линии относительно контроля также была сниженной (на 22,9 и 13,1 % соответственно I и II поколениям), в то время как животные III группы, отягощенные болезнью самца-производителя, отличались 100 % заболеваемостью, независимо от степени отягощенности, что на 41,2 % превышало контрольный показатель в случайной популяции (рис. 1).



А — самки, Б — самцы; F1 — I поколение (дети), F2 — II поколение (внуки); ♀ — материнская линия, ♂ — отцовская линия

Рис. 1. Уровень заболеваемости потомства с учетом половой принадлежности производителей и степени отягощенности

В структурі клінічного течення експериментального РС у потомства, незалежно від пола, преобладала представленість тяжелих форм (вище 2,5 балла). При цьому клінічний індекс манифестації неврологічних порушень мав найвище значення у самців II покоління (від болевшого батька), що на 15,6 % перевищало контрольний рівень ($p < 0,05$) (рис. 2).

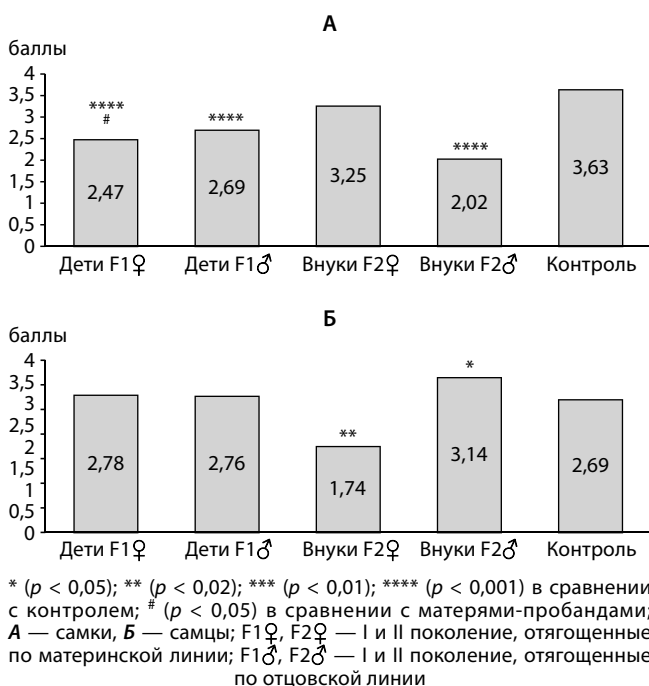


Рис. 2. Середній клінічний індекс тяжести течення експериментальної демієлінізуючої патології в умовах моделювання «семейного» РС у потомства різного пола в залежності від ступеня отягощеності

Такі показники органічно поєдналися з характером манифестації демієлінізуючої патології у хворих самців, відмінною в групі «внуки» по батьківській лінії збільшенням швидкості наростання неврологічного дефіциту; разом з тим, що для I покоління («дети») ці показники характеризувалися тенденцією до усугублення тяжкості хвороби на піку з достовірним ($p < 0,001$) пролонгуванням неврологічного симптоматики більше 45 днів. Течення експериментального РС у «внуки» обоєго полу по материнській лінії не мило достовірних відмінностей від такового у пробандів і від контрольного рівня в цілому.

Наряду з цим, достовірно ($p < 0,001$) більш важке, але не перевищує контрольний рівень, розвиток демієлінізуючої патології у самок з потомства I і II поколінь в порівнянні з пробандом по материнській лінії, очевидно, свідчить про більш виражену схильність до індукції експериментального РС, детермінованою полом, що збігається з даними літератури про підвищену захворюваність жінок [9, 10] і власними дослідженнями про переважання середовища, що підвищує ризик розвитку аутоімунної демієлінізуючої патології у самок і генетичного компонента у самців, успадковано-отягощених РС по материнській лінії [11].

Для уточнення батьківського внеску в забезпечення чутливості до розвитку ЕАЕ з використанням

100 тварин II покоління болевших самок проведено дослідження рівня захворюваності потомства, народженого в стані ремісії, т. є. в умовах виключення впливу середовищного фактора (материнського геномного імпринтинга, епігенетичної спадковості) [12—15].

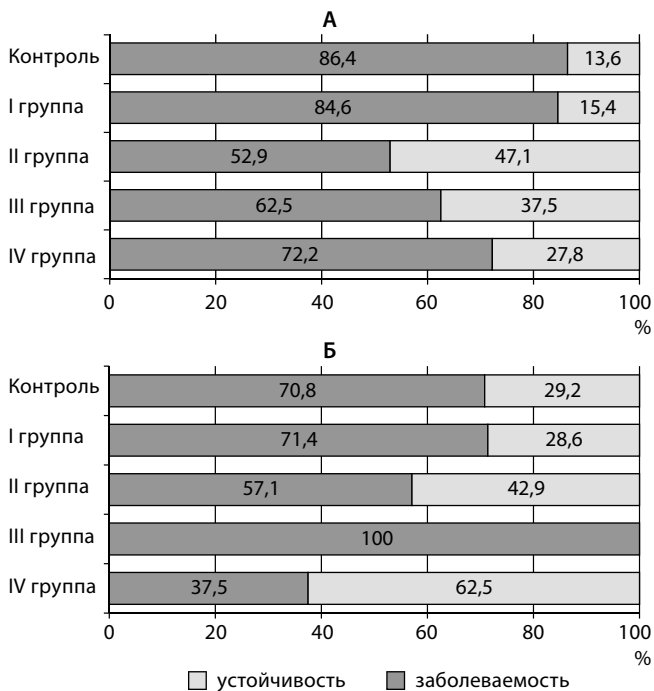
Дослідження проводили в чотирьох групах тварин, сформованих залежно від комбінацій спарювання його виробителів з урахуванням чутливості і стійкості до індукції ЕАЕ в стандартних умовах імунізації: I група (13♀, 14♂) — потомство болевших самок і самця (тотальна сімейна отягощеність); II-я (17♀, 14♂) — отягощеність по материнській лінії (болевша самка і стійкий самець); III-я (8♀, 8♂) — отягощеність по батьківській лінії (стійка самка і болевший самець); IV-я (18♀, 8♂) — потомство стійких тварин; V-я (22♀, 24♂) — тварини випадкової популяції (контроль).

В результаті аналізу захворюваності як у самок, так і у самців в групах з тотальною (по матері і батьку) сімейною отягощеністю в порівнянні з випадковою популяцією не виявлено достовірних відмінностей, які, по-видимому, нівелювалися внаслідок різного внеску матері і батька в передрахованість до розвитку демієлінізуючих порушень в залежності від статевих ознак досліджуваних тварин. На користь цього свідчать отримані нами дані про менш виражене вплив самок-матері на схильність до індукції ЕАЕ (52,9 % у самок і 57,1 % у самців) в порівнянні з потомством болевших самців-виробителів, яке характеризується більш високою захворюваністю (на 18 % у самок), і, зростаючи на 75 %, досягало 100 % підвладності експериментальному РС у самців (рис. 3). Разом з цим, потомство стійких виробителів, помірно відмінюючи підвищенням в 3,2 рази в порівнянні з випадковою популяцією число стійких самок, характеризувалося вираженим зниженням захворюваності до 37,5 % і зростанням (в 2,4 рази) числа стійких самців в порівнянні з таким в випадкової популяції.

Таким чином, у самок підвищена чутливість до індукції аутоімунної демієлінізуючої патології, по-видимому, обумовлена особливостями жіночого організму, в стандартних умовах імунізації і при виключенні внутрішнього впливу не має жорсткої генетичної зв'язки з захворюваністю виробителів, причому тотальна отягощеність по лінії обох виробителів не впливає на рівень захворюваності, а отягощеність, диференційована по матері і батьку, характеризується навіть її зниженими показателями (на 37,5 і 26,1 % відповідно).

В порівнянні з цим, висока захворюваність (до 100 %) потомків-самців, отягощених по батьківській лінії, поряд з її зниженими значеннями (на 57,1 %) в групі від болевших матерей, вказує на значущу роль спадкової отягощеності в забезпеченні ризику розвитку експериментального РС у потомства чоловічого полу. А той факт, що тільки 37,5 % самців з потомства стійких до індукції ЕАЕ тварин характеризуються схильністю до його розвитку, підтверджує дані про генетичний ризик по батьківській лінії, т. є. реалізація передрахованості до РС у самців в стандартних умовах моделювання ЕАЕ в меншій мірі, ніж у самок, залежить від додаткових факторів ризику, визначається

преобладанием собственно наследственного компонента в обеспечении восприимчивости к индукции аутоиммунной демиелинизирующей патологии. В пользу этого свидетельствуют и полученные ранее данные о половых особенностях средовой и наследственной составляющих риска экспериментального РС, отражающие важное значение эпигенетического влияния болевой матери на склонность к формированию демиелинизирующей патологии у ее потомства женского рода в отличие от самцов [16].



А — самки, Б — самцы; I группа — потомство болевших самки и самца; II группа — болевшая самка и устойчивый самец; III группа — устойчивая самка и болевший самец; IV группа — потомство устойчивых животных

Рис. 3. Половые особенности заболеваемости потомства, отягощенного РС по материнской и отцовской линиям (в %)

Тяжесть течения аутоиммунной демиелинизирующей патологии по представленности тяжелых и очень тяжелых форм в зависимости от половой принадлежности и болезни производителей у самок не имела существенных отличий от случайной популяции, характеризуясь наименее выраженными проявлениями демиелинизирующих нарушений в группе потомства от болевшего отца (рис. 4). С учетом отсутствия единого мнения относительно фенотипической экспрессии «семейных» и спорадических случаев РС [17, 18], такие результаты не противоречат данным о более мягком, доброкачественном течении семейных форм заболевания [5].

При этом заслуживают внимания данные о достоверно пониженной тяжести течения экспериментального РС у самцов, не отягощенных по отцовской линии, вместе с тем, что склонность к болезни у матери не коррелирует с достоверными отличиями в развитии аутоиммунной демиелинизирующей патологии, а ее повышенная представленность в I и III группах, очевидно, обусловлена болезнью самца-производителя (рис. 5).

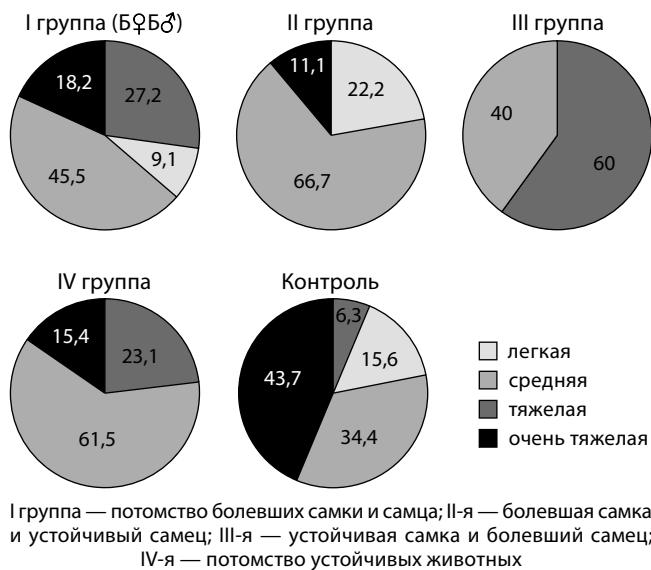


Рис. 4. Тяжесть течения демиелинизирующей патологии в условиях моделирования «семейных» форм РС у потомков-самок с учетом родительского вклада и степени наследственной отягощенности

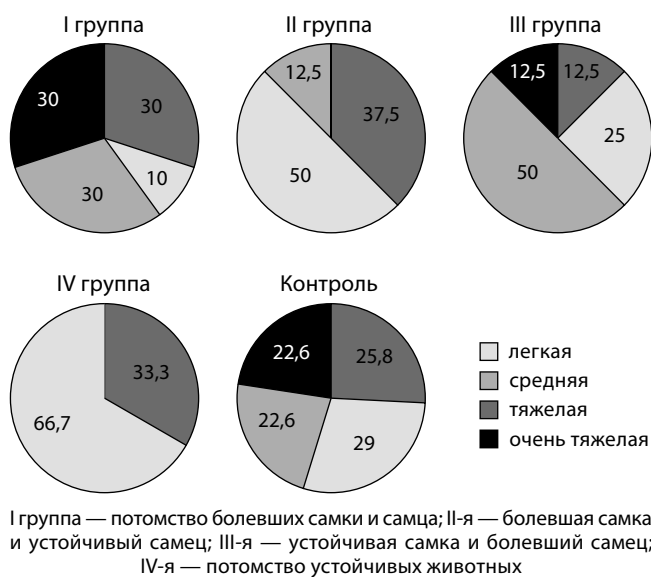


Рис. 5. Тяжесть течения демиелинизирующей патологии в условиях моделирования «семейных» форм РС у потомков-самцов с учетом родительского вклада и степени наследственной отягощенности

Таким образом, моделирование «семейных» форм экспериментального РС в двух поколениях потомства имеет половые особенности: у **самок** — уровень заболеваемости и тяжесть течения не зависят от пола и степени наследственной отягощенности производителей, не превышая контрольного уровня в случайной популяции; у **самцов** из потомства I и II поколений по отцовской линии — характеризуется максимальной (100 %-ной) заболеваемостью и достоверно повышенной выраженностью клинических проявлений неврологического дефицита в сравнении с контролем, что подчеркивает роль отца в обеспечении риска развития РС.

Кроме того, анализ генетической дисперсии признаков восприимчивости и устойчивости к индукции экспериментального РС, а также фенотипической гетерогенности его «семейных» форм у животных разного пола подтверждает существенную роль самца-производителя в обеспечении предрасположенности к развитию аутоиммунной демиелинизирующей патологии у потомства мужского рода, что свидетельствует о перспективности фундаментальных исследований половых особенностей отягощенной наследственности с целью персонифицированной идентификации и раннего выявления факторов риска развития аутоиммунной демиелинизирующей патологии у членов семей больных с РС.

Список литературы

1. Стан здоров'я та неврологічної допомоги населенню України (1999—2008) / П. В. Волошин, Т. С. Міщенко, Н. П. Волошина [та ін.]. Харків : Плеяда, 2009. 214 с.
2. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis / L. Barcellos S. Sawcer, P. P. Ramsay [et al.] // Hum Mol Genet. 2006. Vol. 15. Issue 18. P. 2813—2824.
3. Gourraud, P. When is the absence of evidence, evidence of absence. Use of equivalence-based analyses in genetic epidemiology and a conclusion for the KIF1B rs 10492972*С allelic association in MS // Genet Epidemiology. 2011. 35. P. 568—571.
4. TNF gene polymorphisms: association with MS susceptibility and severity / E. Gusev, M. Sudomoina, A. Boyko [et al.]. In: Frontiers in Multiple Sclerosis: Clinical research and therapy. Chapter 5 / Eds: O. Abramsky and J. Ovadia. London : Martin Dunitz Publishers, 1997. P. 35—41.
5. Влияние генетических факторов на фенотипическую экспрессию рассеянного склероза / Д. С. Коробко, Н. А. Малкова, Е. В. Булатова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2013. № 2. С. 10—16.
6. Ramagopalan, S., Sadovnick A. Genetics & epidemiology of multiple sclerosis. In: Primer on multiple sclerosis. N. Y., 2011. P. 15—29.
7. Freedman, M. S. Assessing treatment response for the purposes of optimizing management of relapsing multiple sclerosis. Оценка ответа на терапию в целях оптимизации помощи при ремиттирующем РС // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2015. № 8. С. 97.
8. Абдурасулова, И. Н., Сердюк С. Е., Гмиро В. Е. Комбинированная блокада NMDA и GLUR1 AMPA рецепторов уменьшает тяжесть неврологических нарушений и длительность течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс // Нейроиммунология. 2007. Т. V, № 1. С. 4—11.

9. Бойко, А. Н., Гусев Е. И. Достижения в изучении проблем рассеянного склероза (обзор) // Доктор.Ру. Неврология, психиатрия. 2012. № 5 (73). С. 9—15.

10. Whitacre, C. Sex differences in autoimmune disease // Nat. Immunology. 2001. 2. P. 777—780.

11. Гейко, В. В. Сопоставительный анализ модификационной (обусловленной внутриутробным влиянием) и генетической составляющих предрасположенности к развитию аутоиммунной демиелинизирующей патологии у крыс разного пола, наследственно отягощенных рассеянным склерозом по материнской линии // Український вісник психоневрології. 2015. Т. 23, вип. 1 (82). С. 29—31.

12. Полетаев, А. Б. Физиологическая иммунология (естественные антитела и проблемы наномедицины). Москва, 2010. 219 с.

13. Parent-of-origin effects in MS. Observations from avuncular pairs / Herrera B. M., Ramagopalan S. V., Lincoln M. R. [et al.] // Neurology. 2008. 2008 Sep 9; 71(11). P. 799—803.

14. Maternal transmission of multiple sclerosis in a Dutch population / I. Hoppenbrouwers, F. Liu, Y. Aulchenko [et al.] // Arch. Neurology. 2008. 65. P. 345—348.

15. Epigenetics in multiple sclerosis susceptibility: difference in transgenerational risk localizes to the major histocompatibility complex / M. Chao, S. Ramagopalan, B. Herrera [et al.] // Hum Mol Genet. 2009. 18. P. 261—266.

16. Гейко, В. В. Половые особенности средовой и наследственной составляющих риска развития экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в качестве модели рассеянного склероза у крыс // Нейроиммунология. 2015. Т. XII, № 1—2.

17. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза / А. Н. Бойко, О. О. Фаворова, О. Г. Кулакова, Е. И. Гусев // В кн. : Рассеянный склероз / под ред. Е. И. Гусева, И. А. Завалишина, А. Н. Бойко. Москва : Пеал Тайм, 2011. С. 7—43.

18. Clinical and radiological characteristics in familial MS / C. Oreja-Guevara, B. Manzano, N. Martin [et al.] // European J. Neurology. 2011. 18. P. 2500.

Надійшла до редакції 28.09.2016 р.

ГЕЙКО Валентина Василівна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії Державної установи «Інститут неврології, психіатрії та наркології Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна; e-mail: geiko@gmail.ru

GEYKO Valentyna, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Neurophysiology, Immunology and Biochemistry of the State Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine; e-mail: geiko@gmail.ru