

МОДЕЛЮВАННЯ ТА ОЦІНКА ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Державний заклад «Дніпропетровська медична академія

Міністерства охорони здоров'я України»

(м. Дніпропетровськ)

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи кафедри фармакології та клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Системна фармакологія неопіоїдних анальгетиків та засобів медикаментозного захисту мозку в умовах експериментальних патологічних станів», № держ. реєстрації 0114U000935.

Вступ. Експериментальний алергічний енцефаломієліт відтворюваний шляхом внутрішньошкірного введення гомогената головного, спинного мозку і периферичних нервів зі стимулятором Фрейнда, відноситься до істинного аутоімунного захворювання нервової системи [1, 14]. Клінічна картина цих захворювань характеризується порушенням координації рухів, розладом функції тазових органів, розвитком парезів і паралічів задніх кінцівок, кахексією та ін. Природно, що експериментальний алергічний енцефаломієліт представляє лише відносну, наближену модель демієлінізуючих захворювань людини, так як між демієлінізуючими захворюваннями в клініці та експерименті є істотна відмінність в характері клінічного перебігу, а також і гістологічних ушкоджень мозкової тканини. Проте клінічні, біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни при експериментальному алергічному енцефаломієліті мають принципову схожість з аналогічними змінами при демієлінізуючих захворюваннях людини. Це дає підставу розглядати їх як достатньою мірою адекватну модель, що дозволяє досить значно розширити межі досліджень питань етіології, патогенезу, клініки, терапії та профілактики демієлінізуючих захворювань [2].

Крім цінності експериментального алергічного енцефаломієліту як моделі демієлінізуючих уражень нервової системи, дані захворювання широко вивчаються дослідниками для отримання інформації та розробки ряду теоретичних положень, що стосуються механізмів розвитку і біологічної ролі нейроалергічних реакцій уповільненого і негайного типів, пов'язаних з імунокомпетентними клітинами і гуморальними антитілами.

У зв'язку зі сказаним вище цілком зрозумілий той великий інтерес, який викликає експериментальний

алергічний енцефаломієліт у широкого кола алергологів, невропатологів, патофізіологів, біохіміків і морфологів. На моделі експериментального алергічного енцефаломієліту проводиться вивчення енцефалітогенної активності мозкової тканини і неврїтогенної активності периферичних нервів, біологічної ролі гуморальних антитіл і імунокомпетентних клітин, взаємини демієлінізації, порушень різних видів обміну речовин, ферментативної активності і т. п. [6, 9].

Введення однієї лише гетерологічної мозкової тканини викликає у тварин в ряді випадків розвиток неврологічних і морфологічних змін, характерних для демієлінізуючих захворювань нервової системи. Rivers, Schwentker (1935) вперше показали, що багаторазове (від 14 до 93) введення гетерологічної тканини мозку призводило до розвитку уражень центральної нервової системи у мавп [10, 12].

Тому, **метою** даної **роботи** було найбільш адекватне моделювання розсіяного склерозу у вигляді аутоімунного алергічного енцефаломієліту для експериментально-теоретичного обґрунтування раціонального і безпечного використання ненаркотичних анальгетиків в умовах експериментальних еквівалентів нейродегенеративних станів на фоні базової терапії розсіяного склерозу.

Експериментальні дослідження були проведені на білих нелінійних щурах. Комісією з біоетики Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» встановлено, що проведені наукові дослідження на експериментальних тваринах відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України №231 від 01.11.2005 року. Дослідження виконувались у відповідності до принципів Хельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000р.), Конвенції Ради Європи у правах людини та біомедицини (1997р.), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983р.), «Загальним етичним принципам експериментів над тваринами», що затверджені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.) згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин,

що використовуються в експериментах та інших навчальних цілях» (Страсбург, 18. 03. 1986р.).

Перед початком експерименту на щурах всі тварини були оглянуті, зважені, враховувався їхній вік, рухова активність та стан шкіри. Після зовнішнього огляду та вибраковки починали експеримент одночасно з контрольною групою. До та під час експерименту щури знаходились в віварії ДЗ «ДМА МОЗ України» при температурі 20-25°C, вологості не менш 50%, у провітрюваних приміщеннях та світловому режимі день/ніч в стандартних пластикових клітках не більш 5 осіб в кожній, на стандартному раціоні харчування. Всі тварини, що приймали участь в експерименті, мали здоровий вигляд і були активні [7, 8].

Для відтворення експериментального алергічного енцефаломієліту найбільш поширений метод введення енцефалітогенної емульсії внутрішньошкірно в подушечки пальців [3], в ділянки грудини чи спинки тварин [4, 5], а також в основу хвоста щурів [13].

Для формування експериментального алергічного енцефаломієліту використовували гомогенати гомологічного головного мозку, які за енцефалітогенності займають перше місце серед інших препаратів (гомогенати гомологічного, гетерогенного головного і спинного мозку). У сполучну тканину основи хвоста тварини вводили енцефалітогенну суміш з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси тіла. Порівняння отриманих результатів проводили із групою інтактних тварин, якій вводили фізіологічний розчин в тому ж об'ємі. Також для формування патологічного стану енцефалітогенна суміш вводилася в подушечки лап експериментальних тварин (білі щури), але у порівнянні із введенням в основу хвоста цей метод введення не викликав достовірно значущих результатів.

Методика приготування повного ад'юванту Фрейда і гомогената головного (спинного) мозку щурів була наступна: одному щуру в основу хвоста вводили повний ад'ювант Фрейда (ПАФ)+гомогенат мозку в співвідношенні (об'єм / об'єм) 1: 1. Таким чином на 20 щурів вагою по 200 г нами було використано 2,0 мл ПАФ і 2. 0 мл гомогенату мозку щура. Але для отримання 4,0 мл готового розчину ми брали по 2. 5 мл, з розрахунку похибок при приготуванні і введенні (на ступці і залишки в шприці).

1. Приготування гомогената головного мозку щурів:

- 67 мг головного мозку на 1 щура (на 20 щурів – 1. 4 г);
- буфер для гомогенізації 2.0 мл (0,175 М KCl; 0,025 М трис-HCl; рН=7. 4).
- 1. 4 г головного мозку щура гомогенізують за допомогою гомогенізатора в 2.0 мл буферного розчину (з холодильника) при кімнатній температурі протягом 3 хвилин [11].

2. Приготування ПАФ:

- На 1 мл – 0. 85 мл вазелінового масла; 0.15 мл ланоліну б/в і БЦЖ;

- на 2.5 мл – 2. 1 мл вазелінового масла; 0.4 мл ланоліну б/в і 1 мг БЦЖ (БЦЖ з розрахунку 0,025 мг на 100 г / щури).

В нашому дослідженні ми нависку сухого порошку вбитих нагріванням *M. tuberculosis* або *M. butyricum* розтирали в порцеляновій ступці в невеликому обсязі вазелінового масла (1.0 мл), для отримання суспензії з кінцевою концентрацією 1 мг/мл. Потім до цієї суспензії додавали залишок 1,1 мл вазелінового масла і розтирали з 0.4 мл ланоліну б/в і водний розчин антигену (гомогенат); зазвичай співвідношення ад'ювант : антиген становить 1 : 1.

Відбирали суміш у шприці з перехідником і «переганяли» емульсію з одного шприца в інший доти, поки вона не «побіліє» і загусне. Якість антигенної емульсії контролювали за допомогою простого прийому (Jurd, 1987). Краплю емульсії наносили на поверхню «крижаної» дистильованої води. Крапля стабільної водно-масляної емульсії на короткий час занурювалась у воду, а потім плавала на поверхні, не розтікаючись, якщо ж крапля розпливалася по поверхні води, то слід продовжувати емульгування. Отримання стабільної антигенної емульсії необхідно для досягнення імуностимулюючого ефекту; нестабільна емульсія швидко диспергується в тканинах тварини. Значний надлишок детергентів в препараті антигену перешкоджає отриманню стабільної емульсії з ПАФ.

Результати моделювання експериментального розсіяного склерозу оцінювали за наступною шкалою: 0 – відсутність клінічних проявів, 1 – зниження тону хвоста, 2 – м'язова слабкість або легкий параліч передніх кінцівок, 3 – важкий параліч задніх або всіх кінцівок, 4 – передсмертний стан, 5 – смерть.

Аналіз отриманих результатів. Згідно отриманих результатів стан тварин показав, що у щурів експериментальної групи спостерігалася втрата маси тіла, патологічні неврологічні симптоми, які виявлялися в середньому з 10-12 діб. Наростання симптоматики тривало в середньому протягом 7 днів та брало стійкий характер. У щурів відзначалися парези, атактичні порушення, порушення ходьби і функцій тазових органів (нетримання сечі і калу), млявість, що відповідало 1-2 ступеням шкали оцінювання у 13 тварин. У 7 тварин були вираженими парези задніх кінцівок, втрата тону хвоста (3 ступінь оцінювання). Більшість щурів одужували спонтанно протягом 6-8 днів після початку клінічних проявів (на 18-20 день після імунізації). Відповідно до вимог експерименту під час паралітичної стадії у щурів був вільний доступ до їжі та води [13].

Висновки. Таким чином, використання зазначеної методики дозволило отримати модельований патологічний стан розсіяного склерозу у вигляді експериментального алергічного енцефаломієліту і може використовуватися у подальших дослідженнях для виявлення відповідних закономірностей, ступеню та характеру змін у імунній та нервовій системах організму при відтворенні експериментального патологічного стану. Отримані дані можуть слугувати

основою для подальших досліджень лікарських засобів та їх комбінацій з метою удосконалення та раціоналізації фармакотерапії розсіяного склерозу.

Перспективи подальших досліджень. Моделювання експериментального аутоімунного енцефаломієліту є важливим аспектом для дослідження

розсіяного склерозу на тваринах. Нагальним є питання пошуку нових фармакологічних препаратів та комбінацій класичних лікарських засобів на експериментальній моделі для подальшого впровадження у клінічні дослідження та лікарську практику фармакотерапії розсіяного склерозу.

Література

1. Гольцев А. Н. Особенности изменения иммунологических и биохимических показателей организма крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А. Н. Гольцев, Ю. А. Козлова, Н. Н. Бабенко // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 1. – С. 41-49.
2. Гусев Е. И. Рассеянный склероз / Е. И. Гусев, Т. Л. Демина, А. Н. Бойко. – М. : 1997. – 378 с.
3. Давыдова Г. С. Вопросы направленного моделирования аллергического энцефаломиелита / Г. С. Давыдова, Д. А. Марков // Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. – Минск : Наука и техника, 1975. – С. 24-33.
4. Давыдова Г. С. Применение аюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Г. С. Давыдова // Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике. – Минск : Наука и техника, 1969. – С. 58-63.
5. Давыдова Г. С. Хронический экспериментальный аллергический энцефаломиелит морских свинок / Г. С. Давыдова, Д. С. Марков // Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. – Минск : Наука и техника, 1970. – С. 193-206.
6. Донченко Г. В. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит: некоторые показатели энергетического, белкового и липидного обмена / Г. В. Донченко, А. П. Клименко, Т. М. Кучмеровская // Нейрохимия, 2007. – № 3. – С. 232-238.
7. Западнюк И. П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария [и др.]. – К. : Вища шк.; 1983. – 383 с.
8. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та робот і з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – Київ, 2002. – 155 с.
9. Козлова О. В. Анализ фосфолипидов в спинном мозге кроликов при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите / О. В. Козлова, В. В. Ревин, М. Н. Федин // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 7 – С. 46-47.
10. Маркова О. В. Иммунологические механизмы супрессии экспериментального аллергического энцефаломиелита клетками аллогенного развивающегося головного мозга // Биомедицинский журнал. – 2001. – Т. 2. – С. 223-297.
11. Методы иммунохимического анализа в биологии развития (практическое руководство) / А. Т. Михайлов, В. Н. Симирицкий, М. : Наука. 1991. – 288 с.
12. Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики / Под ред. И. А. Завалишина, В. И. Головкина. – М. : 2000. – 640 с.
13. Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease // Current Protocols in Immunology. – 1996. – 230 p.
14. Holmes Margaret C. The inheritance of autoimmune disease in mice: a study of hybrids of the strains NZB and C3H / Margaret C. Holmes, F. M. Burnet // Heredity. – 1964. – Vol. 19. – P. 419-434.

УДК 616. 832-004-036. 001. 57-092. 9

МОДЕЛЮВАННЯ ТА ОЦІНКА ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Нефьодов О. О., Мамчур В. Й., Харченко Ю. В.

Резюме. Експериментальний алергічний енцефаломієліт відтворюваний шляхом внутрішньошкірного введення гомогената головного, спинного мозку і периферичних нервів зі стимулятором Фрейнда, відносіться до істинного аутоімунного захворювання нервової системи. Експериментальні дослідження були проведені на білих нелінійних щурах. Для формування експериментального алергічного енцефаломієліту використовували гомогенати гомологічного головного мозку, які за енцефалітогенності займають перше місце серед інших препаратів (гомогенати гомологічного, гетерогенного головного і спинного мозку). У сполучну тканину основи хвоста тварини вводили енцефалітогенну суміш з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси тіла. Згідно отриманих результатів стан тварин показав, що у щурів спостерігалася втрата маси тіла, патологічні неврологічні симптоми, які виявлялися в середньому з 10-12 днів. Таким чином, використання зазначеної методики дозволило отримати модельований патологічний стан розсіяного склерозу у вигляді експериментального алергічного енцефаломієліту і може використовуватися у подальших дослідженнях для виявлення відповідних закономірностей, ступеню та характеру змін у імунній та нервовій системах організму при відтворенні експериментального патологічного стану.

Ключові слова: розсіяний склероз, експериментальний алергічний енцефаломієліту, модель.

УДК 616. 832-004-036. 001. 57-092. 9

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОЦЕНКА ТЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Нефедов А. А., Мамчур В. И., Харченко Ю. В.

Резюме. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит воспроизводимый путем внутрикожного введения гомогената головного, спинного мозга и периферических нервов со стимулятором Фрейнда, относится к истинному аутоиммунному заболеванию нервной системы. Экспериментальные исследования

были проведены на белых нелинейных крысах. Для формирования экспериментального аллергического энцефаломиелита использовали гомогенаты гомологического головного мозга, по энцефалитогенности занимают первое место среди других препаратов (гомогенаты гомологичного, гетерогенного головного и спинного мозга). В соединительную ткань основания хвоста животного вводили энцефалитогенную смесь из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела. Согласно полученным результатам состояние животных показало, что у крыс наблюдалась потеря массы тела, патологические неврологические симптомы, которые проявлялись в среднем с 10-12 суток. Таким образом, использование указанной методики позволило получить моделируемое патологическое состояние рассеянного склероза в виде экспериментального аллергического энцефаломиелита и может использоваться в дальнейших исследованиях для выявления соответствующих закономерностей, степени и характера изменений в иммунной и нервной системах организма при воспроизведении экспериментального патологического состояния.

Ключевые слова: рассеянный склероз, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, модель.

UDC 616. 832-004-036. 001. 57-092. 9

Modelling and Evaluation of Experimental Allergic Encephalomyelitis

Nefedov A. A., Mamchur V. I., Kharchenko Y. V.

Abstract. Experimental allergic encephalomyelitis recreated by intradermal injection of homogenate of the brain, spinal cord and peripheral nerve with stimulator of Freund, refers to a true autoimmune disease of the nervous system. The clinical picture of these diseases characterized by impaired motor coordination, disorders of functions of pelvic organs, development of paresis and paralysis of hind limbs, cachexia, etc. Naturally, that experimental allergic encephalomyelitis represents only relative, approximate model of demyelinating diseases of human. Entering of a single heterologous brain tissue causes in the animals some cases the development of neurological and morphological changes characteristic of demyelinating diseases of the nervous system. Rivers, Schwentker (1935) were who first showed that the multiple (14 to 93) injection of heterologous brain tissue led to the development of central nervous system destruction in monkeys. Experimental studies have been conducted on white nonlinear rats. For the formation of experimental allergic encephalomyelitis were using homologous brain homogenates, which by encephalitogenicity leads among other drugs (homogeneous homogenates, heterogeneous brain and spinal cord). The connective tissue of the animal's tail base was injected with a mixture of encephalitogenic suspension of 0.1 ml per 100 g of the body weight. The control group was a group of intact animals, which were administered saline. According to the results, animal showed that in rats there was weight loss, abnormal neurological symptoms were found in an average of 10-12 days. The increase in symptoms lasted for a median of 7 days and were sustained. The rats were observed paresis, ataxic violation, breach walk and disfunction of the pelvic organs (urinary and fecal), lethargy, corresponding to 1-2 grading scale degrees in 13 animals. In 7 animals were pronounced paresis of hind limbs, loss of tail tone (3 level evaluation). Most rats recovered spontaneously within 6-8 days after the onset of clinical manifestations (18-20 days after immunization). Thus, the use of this technique allowed us to obtain a simulated pathologic condition of multiple sclerosis in the form of experimental allergic encephalomyelitis and can be used in future studies to identify appropriate laws, the extent and nature of changes in the immune and nervous systems of the body when playing experimental pathological condition. These data can serve as a basis for further studies of drugs and their combinations in order to improve and rationalize drug therapy for multiple sclerosis. Simulation experimental autoimmune encephalomyelitis is an important aspect for the study of multiple sclerosis in animals. Urgent issue is the search for new pharmacological agents and combinations of classical drugs in an experimental model for further implementation in clinical research and medical practice pharmacotherapy for multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis model.

Рецензент – проф. Шаторна В. Ф.

Стаття надійшла 21. 08. 2014 р.