

УДК 616.831 - 002: 615.246.9

ИММУНОСОРБЕНТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА У МОРСКИХ СВИНОК

Н. М. Гурина¹¹Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, КиевТ. М. Кучмеровская²²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: kuch@i.ua

Получено 22.05.2012

Современное устоявшееся представление о рассеянном склерозе как о демиелинизирующем заболевании аутоиммунной природы способствует развитию биотехнологических подходов по удалению из системного кровотока пациентов аутоантител, иммунных комплексов и специфических клонов CD4⁺ Т-лимфоцитов с целью лечения этого заболевания. Доклиническое изучение новых эфферентных средств проводят на лабораторных животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом.

Для лечения экспериментального аллергического энцефаломиелита у морских свинок мы использовали иммуносорбенты на основе окисленных углеродных гранулированных матриц КАУ и СКН с иммобилизованным основным протеином миелина — ОПМ. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит у животных вызывали однократным подкожным введением 100 мкг основного протеина миелина в полном адьюванте Фрейнда. Иммуносорбенты получали путем химической иммобилизации основного протеина миелина на предварительно окисленных азотной кислотой углеродных гранулированных матрицах КАУ и СКН в реакции ковалентного сочетания в присутствии водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Синтезированные иммуносорбенты обладали способностью сохранять до 84% и 90% поглотительной емкости относительно низко- и среднемолекулярных соединений эндогенного происхождения соответственно.

Развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита у морских свинок сопровождалось увеличением количества Т-лимфоцитов, нарастанием высокого уровня анти-ОПМ антител и увеличением активности кислой фосфатазы и трипсиноподобных протеиназ в сыворотке крови. Иммуносорбцию проводили при появлении у морских свинок характерных признаков экспериментального аллергического энцефаломиелита или в его латентном периоде. Синтезированные иммуносорбенты обладали терапевтической эффективностью как при их использовании в латентном периоде развития патологии, так и при наличии ее характерных признаков; они позволяли удалять из сыворотки крови морских свинок с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом до 37% анти-ОПМ антител и снижать активность кислой фосфатазы на 54%.

Ключевые слова: иммуносорбент, иммуносорбция, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, анти-ОПМ антитела.

Одна из наиболее актуальных проблем современной неврологии — поиск новых методов и средств лечения демиелинизирующих заболеваний ЦНС, среди которых самым распространенным является рассеянный склероз (РС). Несмотря на продолжительное и интенсивное изучение этиологии и патогенеза РС, факторы и механизмы, лежащие в их основе, во многом не ясны. Наиболее убедительна и признана аутоиммунная гипотеза патогенеза РС, согласно которой это медленно прогрессирующий аутоиммунный демиелинизирующий процесс, характеризующийся многоочаговой воспалительной деструкцией миелина в белом веществе головного и спинного мозга,

повреждением аксонов, потерей олигодендроцитов и значительными нарушениями в двигательной, чувствительной и психической сферах [1, 2], по сравнению с вирусной природой его возникновения [3]. Активность нейроаутоиммунного процесса, в котором участвуют стимулированные CD4⁺Т-лимфоциты и глиальные клетки, преимущественно астроциты, в значительной степени определяет интенсивность образования очагов воспаления и последующей демиелинизации в мозговой ткани [4–6]. Полагают, что важную роль в иммунопатогенезе процесса демиелинизации выполняют антителозависимые эффекторные реакции, поскольку в очагах активной

демиелинизации в мозге было выявлено накопление IgG и C9-компонента системы комплемента, которые являются маркерами конечной стадии лизиса [7]. Большинство исследователей считает главным фактором развития первичной демиелинизации образование аутоантител к ОПМ и гликопротеину олигодендроцитов [8, 9]. Выход в кровоток ОПМ и продуктов его деструкции происходит из-за нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера, являющегося характерным для развития РС. Сенсibilизация организма этими субстанциями приводит к формированию клонов аутореактивных CD4⁺T-лимфоцитов и специфических анти-ОПМ антител, уровень которых в сыворотке крови коррелирует с интенсивностью образования очагов воспаления в ткани мозга, выявляемых при магнитно-резонансном томографическом обследовании у больных РС на стадии обострения заболевания [8, 10]. Обнаружено, что анти-ОПМ антитела обладают протеолитической активностью относительно ОПМ и могут непосредственно участвовать в деструкции миелиновой оболочки, способствуя дальнейшей интенсификации аутоиммунного процесса [11]. Уровень анти-ОПМ антител считают не только маркером демиелинизации, но и основным прогностическим критерием активности этого процесса и вероятности заболевания РС у больных с клинически изолированным синдромом — первыми проявлениями демиелинизации, которые ранее диагностировали как рассеянный энцефаломиелит человека [9, 12]. Эти положения и определили направленность новых подходов в лечении РС. С одной стороны, это использование иммунопрепаратов, получаемых с помощью современных биотехнологий, которые предназначены для блокирования рецепторов на поверхности специфических клонов CD4⁺T-лимфоцитов, сенсibilизированных к ОПМ и гликопротеину олигодендроцитов [13–15]. С другой стороны, это применение эфферентных методов — плазмафереза, цитафереза, фотофереза, ликворофильтрации, иммуносорбции — с целью удаления из системного кровотока анти-ОПМ и других аутоантител, а также иммунных комплексов, С3-компонента системы комплемента и тех же специфических клонов CD4⁺T-лимфоцитов [16–20].

Целью работы было получение иммуносорбентов на основе углеродных гранулированных матриц и использование их для лечения экспериментального аллергического энцефаломиелита у морских свинок.

Материалы и методы

Модель РС — экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) — воспроизводили у беспородных морских свинок обоего пола массой 300–400 г путем однократного подкожного введения в подушечки задних лапок энцефалитогенной смеси: 100 мкг ОПМ в 0,2 мл полного адъюванта Фрейнда [21].

Антиген — ОПМ — выделяли по методу Палладина и др. [22] из очищенной фракции общего миелина, который получали из белого вещества головного мозга быка методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Гомогенность протеина контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле. Неврологические симптомы, длительность и тяжесть патологического процесса у животных регистрировали и оценивали в баллах по шкале Sedgwick et al. [23].

Иммуносорбенты получали путем химической иммобилизации ОПМ на углеродных гранулированных матрицах КАУ и СКН в реакции ковалентного сочетания в присутствии водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид [24, 25]. Углеродные матрицы предварительно окисляли азотной кислотой для увеличения на их поверхности количества функциональных кислородсодержащих групп с подвижным протоном. Синтезированные иммуносорбенты отмывали от несвязавшегося антигена и продуктов реакции последовательно 0,05 моль/л фосфатным буфером (рН 7,2), используемым для растворения карбодимид, и 0,15 моль/л раствором NaCl, забуференным фосфатами до рН 7,2. Количество иммобилизованного ОПМ определяли по разнице содержания в растворах до и после реакции по методу Лоури [26]. В условиях наших экспериментов оно составляло порядка 1 мг на 1 г матрицы. Прочность фиксации антигена на матрицах оценивали в специально проведенной серии опытов по последовательной элюции предварительно дансильированного и затем иммобилизованного ОПМ растворами различной ионной силы (0,15 моль/л; 1 моль/л NaCl; 8 моль/л мочевины) с последующей детекцией на проточном флуориметре модели 420-AC (Millipore-Waters, США).

Иммуносорбцию у морских свинок проводили под общим наркозом, схема которого включала: премедикацию — 0,2 мл 0,5%-го раствора седуксена и 0,1 мл 0,1%-го раствора метацина на животное; наркоз — 1,0 мл на 1 кг массы тела 5%-го раствора кетамина.

Для местной анестезии использовали 0,25% -й раствор новокаина.

Система для иммуносорбции (рис. 1) состояла из перфузионной колонки (1), перистальтического насоса (2), силиконовых соединительных трубок (3), воздушной ловушки (4). Циркуляцию крови осуществляли со скоростью 1,8–2,0 мл/мин в течение 30–40 мин по артериовенозному контуру после катетеризации сонной артерии и яремной вены. В начале процедуры животным вводили гепарин в дозе 500 МЕ на 1 кг массы тела. Объем заполнения колонки иммуносорбентами составлял 7,0 см³. Перед использованием иммуносорбенты обрабатывали в течение 30 мин в режиме рециркуляции стерильным физиологическим раствором, содержащим 2000 МЕ гепарина. В контрольных группах иммуносорбцию проводили, используя окисленные карбонизаты матрицы КАУ и СКН с иммобилизованным ОПМ (КАУ_{ко}+ОПМ и СКН_{ко}+ОПМ).

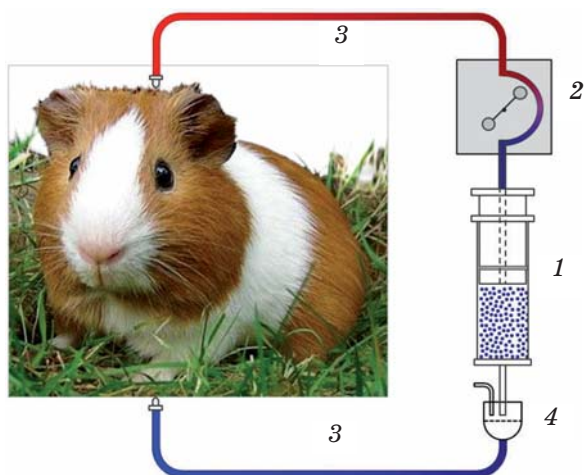


Рис. 1. Схематическое изображение системы для иммуносорбции

Лимфоциты из периферической крови морских свинок выделяли согласно методам [27, 28]. Содержание Е-РОК в крови определяли по Staderker et al. [29], а ЕАС-РОК — по Шварцману, Кашкину [30]. Для определения содержания анти-ОПМ антител в сыворотке крови морских свинок использовали метод Irie et al. [31] с некоторой модификацией, которая заключалась в замене вторичных антител и соответственно субстрата реакции, в частности козьих моноклональных антител к IgG (H+L) морской свинки, конъюгированных с пероксидазой, на указанные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой, и, соответственно, субстрата пероксида водорода с АВТS [2,2'-

азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоново-й кислотой)] на *n*-нитрофенилфосфат в диэтаноламиновом буфере. Активность кислот фосфатазы определяли согласно Fishman, Lerner [32], а сериновых протеиназ с трипсиноподобной активностью — по методу Веремеенко и др. [33].

Неспецифическую поглотительную активность иммуносорбентов оценивали спектрофотометрическим методом по кинетике адсорбции из водных растворов маркерных соединений: креатинина (113 Да), витамина В₁₂ (1355 Да). Объем сорбционных пор сорбентов определяли эксикаторным методом по бензолу [34].

Статистический анализ полученных данных выполняли с использованием стандартного *t*-критерия Стьюдента для некоррелированных выборок.

Результаты и обсуждение

Введение морским свинкам по классической схеме энцефалитогенной смеси приводило к развитию характерных неврологических признаков ЭАЭ к 15–18-м сут после сенсibilизации. Выраженность этих признаков мы оценивали по пятибалльной шкале, которую составили для морских свинок на основании шкалы, предложенной Sedgwick [23] для мышей (табл. 1). Несмотря на то, что эксперименты выполняли на беспородных животных, воспроизводимость ЭАЭ достигала 95%. Нелеченные морские свинки погибали через 2–5 сут после появления первых признаков демиелинизирующей патологии.

Таблица 1. Показатели шкалы оценки неврологических признаков ЭАЭ у морских свинок

Клинические признаки	Баллы
Отсутствие признаков ЭАЭ	0
Начало потери массы тела (менее 10% от первоначальной)	1
Незначительная слабость конечностей, дальнейшая потеря массы тела (более 10% от первоначальной), затруднения при поворотах, тремор	2
Спастические парезы задних конечностей, нарушение функции тазовых органов	3
Паралич одной задней конечности, недержание	4
Паралич двух задних конечностей, общее истощение	5

Иммунологические показатели оценивали по относительному содержанию Т- и В-лимфоцитов в периферической крови животных, которое соответствовало количеству Е-РОК и ЕАС-РОК. Определение исследуемых показателей у морских свинок выявило снижение на 40,4% относительного содержания активных розеткообразующих клеток (Е_а-РОК) в позднем латентном периоде ЭАЭ (10-е сут после сенсibilизации антигеном) и повышение на 23,4% тотальных розеткообразующих клеток (Е-РОК) в период развития характерных признаков заболевания по сравнению с показателями интактных животных. Количество ЕАС-РОК достоверно не изменялось в динамике развития ЭАЭ у морских свинок (табл. 2). Следует отметить, что уже в латентном периоде развития заболевания в сыворотке крови животных был выявлен высокий уровень анти-ОПМ антител, поддерживаемый в циркулирующей крови на том же уровне и при развитии признаков экспериментальной демиелинизирующей патологии (табл. 2).

Было выявлено, что для развития ЭАЭ у морских свинок характерно увеличение активности гидролитических энзимов в сыворотке крови. Так, уже к 10-м сут после сенсibilизации наблюдалось увеличение на 48,7% активности кислой фосфатазы и на 33,6% – трипсиноподобных протеиназ по сравнению с соответствующими показателями интактных животных (табл. 2). В период развития у морских свинок характерных для ЭАЭ неврологических симптомов нами было обнаружено дальнейшее увеличение на 81,5 и 50,6% активности гидролаз по сравнению с нормой соответственно для кислой фосфатазы и трипсиноподобных протеиназ сыворотки крови.

С целью изучения эффективности использования иммуносорбции при ЭАЭ были синтезированы два иммуносорбента – КАУ₀+ОПМ и СКН₀+ОПМ, матрицами для которых служили гранулированные углеродные гемосорбенты КАУ (косточковый активированный уголь) и СКН (азотсодержащий активированный уголь) (рис. 2 а, б), предварительно окисленные азотной кислотой для увеличения количества функциональных кислородсодержащих групп на их поверхности. В качестве контроля специфичности связывания анти-ОПМ антител использовали окисленные карбонизаты адсорбентов КАУ и СКН с иммобилизованным ОПМ: КАУ_{ко}+ОПМ и СКН_{ко}+ОПМ. Карбонизаты не являются окончательным продуктом получения углеродных гемосорбентов. По своим физико-химическим характеристикам это малопористые сорбенты (табл. 3). После иммобилизации на поверхности карбонизатов биомолекул они преимущественно проявляют способность к специфической сорбции, тогда как неспецифическая сорбция растворимых метаболитов средней и высокой молекулярной массы на них практически отсутствует [35, 36].

Полученные нами *in vitro* данные по кинетике адсорбции метаболитов низкой и средней молекулярной массы иммуносорбентами КАУ₀+ОПМ и СКН₀+ОПМ свидетельствуют о том, что синтезированные сорбенты сохраняют в значительной степени неспецифическую сорбционную активность по отношению к соединениям молекулярного ряда, к которому относятся в основном продукты эндогенной интоксикации, при их сравнении с показателями для матриц — гемосорбентов КАУ₀ и СКН₀ (табл. 3). Иммобилизованный лиганд снижал эти

Таблица 2. Иммунологические и биохимические показатели крови в динамике развития ЭАЭ у морских свинок ($M \pm m$; $n = 10$)

Показатель крови	Физиологическое состояние животных		
	Интактные животные (контроль)	Латентный период ЭАЭ (10-е сутки)	Наличие признаков ЭАЭ
Е _а -РОК (%)	48,3±4,4	28,8±3,5*	40,7±3,2
Е-РОК (%)	33,4±2,2	30,2±3,2	41,2±1,9*
ЕАС-РОК (%)	12,0±1,1	10,2±0,8	10,2±1,3
Анти-ОПМ антитела (един. опт. плотности, $\lambda = 405$ нм)	0,077±0,012	0,359±0,011*	0,370±0,032*
Активность кислой фосфатазы (мкмоль/мин/л сыворотки)	30,76 ± 1,42	45,74 ± 1,85*	55,83 ± 5,95*
Активность трипсиноподобных протеиназ (мкмоль/мин/л сыворотки)	59,94 ± 1,85	80,07 ± 6,92*	90,26 ± 5,87*

Примечание: * — достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп ($P < 0,05$).

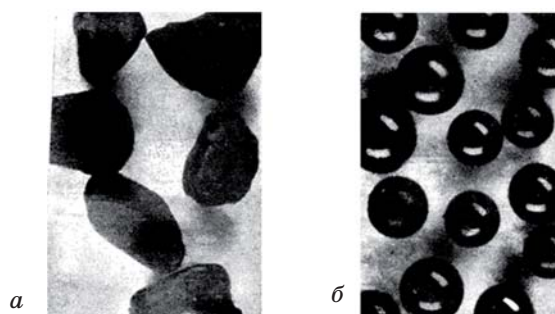


Рис. 2. Углеродные гранулированные матрицы, использованные для синтеза иммуносорбентов (×20):

- а — косточковый активированный уголь КАУ (размер гранул 0,5–1,8 мм);
- б — азотсодержащий активированный уголь СКН (размер гранул 0,5–1,0 мм)

показатели в среднем на 10–16%. Таким образом, оказалось, что полученные иммуносорбенты можно отнести к средствам с бивалентным эфферентным воздействием, обладающими как специфической, так и неспецифической сорбционной активностью. Как следует из данных табл. 3, контрольные иммуносорбенты на основе матриц-карбонизатов $КАУ_{ко}+ОПМ$ и $СКН_{ко}+ОПМ$ имели значительно меньшие показатели сорбции указанных метаболитов. Поэтому их потенциал связывания анти-ОПМ антител с иммобилизованным лигандом с наибольшим приближением может служить контролем специфичности связывания для иммуносорбентов $КАУ_о+ОПМ$ и $СКН_о+ОПМ$.

В табл. 4 представлен общий дизайн экспериментов по иммуносорбции.

Эту процедуру у морских свинок проводили либо при появлении первых характерных признаков демиелинизирующего процесса (группы 2–5), либо в позднем латентном периоде ЭАЭ — 11-е сут после сенсibilизации (группы 6–9). Было показано, что иммуносорбция у животных с признаками патологии через сутки после процедуры приводила к кратковременному восстановлению двигательной активности. Однако через 5–11 сут у подопытных животных развивались парезы и параличи и они погибали. Таким же был результат сорбции и на контрольных иммуносорбентах, с той лишь разницей, что гибель морских свинок наступала несколько раньше — через 2–7 сут.

Иные результаты были получены в группах животных, которых подвергали иммуносорбции в позднем латентном периоде ЭАЭ. У всех морских свинок была достигнута продолжительная устойчивая ремиссия — наблюдение за животными продолжительностью до 10 мес не выявило появления у них характерных признаков ЭАЭ. У морских свинок 6–9 групп после проведения иммуносорбции наблюдали лишь незначительное снижение массы тела к 17–18-м сут после сенсibilизации, т. е. через неделю после эфферентной процедуры, без проявления каких-либо других признаков патологического процесса. К 20–21-м сут масса тела животных восстанавливалась.

Таблица 3. Физико-химические характеристики экспериментальных адсорбентов

Адсорбент	Структурно-сорбционные параметры		Показатели сорбции маркерных соединений	
	Удельная площадь поверхности, $S_{уд.}$ (м ² /г)	Объем сорбционных пор, V_s по бензолу (см ³ /г)	Креатинин (мкмоль/г; $C_{исх} = 1,33$ ммоль/л)	Витамин В ₁₂ (мкмоль/г; $C_{исх} = 24,6$ мкмоль/л)
Иммуносорбенты				
$КАУ_о+ОПМ$	150	0,40	92,7	1,85
$КАУ_{ко}+ОПМ$	10	0,07	21,7	0,52
$СКН_о+ОПМ$	250	0,45	61,0	1,33
$СКН_{ко}+ОПМ$	45	0,10	10,1	0,12
Матрицы				
$КАУ_о$	300	0,60	110,8	2,04
$КАУ_{ко}$	10	0,17	42,2	0,65
$СКН_о$	1250	0,70	70,0	1,47
$СКН_{ко}$	70	0,15	35,3	0,25

Примечание: индекс «о» означает «окисленный», индекс «ко» — «карбонизат окисленный».

Таблица 4. Общий план экспериментов по иммуносорбции у морских свинок с ЭАЭ

Группа животных	Количество животных	Время проведения иммуносорбции	Вид иммуносорбента	Продолжительность жизни животных
1	5	Не проводилась (контроль)	–	17–23 сут после сенсibilизации
2	3	При наличии характерных признаков ЭАЭ (контроль)	СКН _{ко} +ОБМ	2–7 сут после иммуносорбции
3	4	При наличии характерных признаков ЭАЭ	СКН _о +ОБМ	5–10 сут после иммуносорбции
4	3	При наличии характерных признаков ЭАЭ (контроль)	КАУ _{ко} +ОБМ	3–6 сут после иммуносорбции
5	4	При наличии характерных признаков ЭАЭ	КАУ _о +ОБМ	6–11 сут после иммуносорбции
6	3	Латентный период ЭАЭ (контроль)	СКН _{ко} +ОБМ	Продолжительная ремиссия
7	4	Латентный период ЭАЭ	СКН _о +ОБМ	Продолжительная ремиссия
8	3	Латентный период ЭАЭ (контроль)	КАУ _{ко} +ОБМ	Продолжительная ремиссия
9	4	Латентный период ЭАЭ	КАУ _о +ОБМ	Продолжительная ремиссия

Нами было установлено, что иммуносорбция снижала уровень анти-ОПМ антител в сыворотке крови морских свинок с характерными признаками ЭАЭ на 30,4 и 33,2%, а в латентном периоде — на 37 и 30,7% при использовании соответственно иммуносорбентов КАУ_о+ОПМ и СКН_о+ОПМ (рис. 3, А, Б).

О специфическом характере сорбции антител свидетельствует тот факт, что в группах животных, которым сорбцию проводили через контрольные иммуносорбенты на основе матриц-карбонизатов КАУ_{ко}+ОПМ и СКН_{ко}+ОПМ снижение уровня анти-ОПМ антител составило соответственно 30 и 32,8% для групп с характерными признаками ЭАЭ, 30,2 и 32,3% — для групп латентного периода. Поскольку величины снижения уровней анти-ОПМ антител в опытных и контрольных группах

были близки, мы полагаем, что адсорбция антител на иммуносорбентах КАУ_о+ОПМ и СКН_о+ОПМ была обусловлена специфическим взаимодействием антител с иммобилизованным антигеном.

Было показано, что перфузия сывороток крови интактных животных, а также животных с характерными признаками ЭАЭ через полученные иммуносорбенты приводила к снижению на 54% активности кислой фосфатазы в сыворотке крови больных морских свинок при использовании иммуносорбента на основе как матрицы КАУ, так и матрицы СКН (рис. 4, А, Б).

Наряду с этим показатели активности сериновых протеиназ с трипсиноподобной активностью имели лишь тенденцию к снижению и оставались по-прежнему на высоком уровне. При этом данные по перфузии сывороток интактных животных указывают на

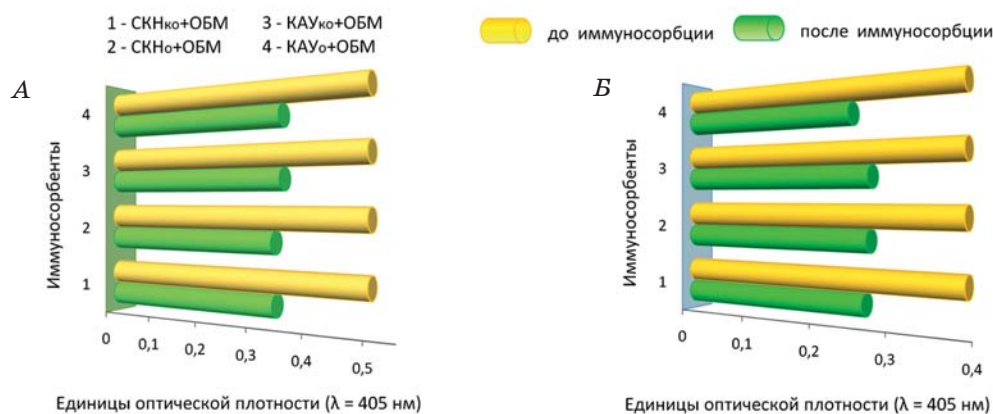


Рис. 3. Уровень анти-ОПМ антител в сыворотке крови морских свинок с характерными признаками ЭАЭ (А) и в латентном периоде (Б)

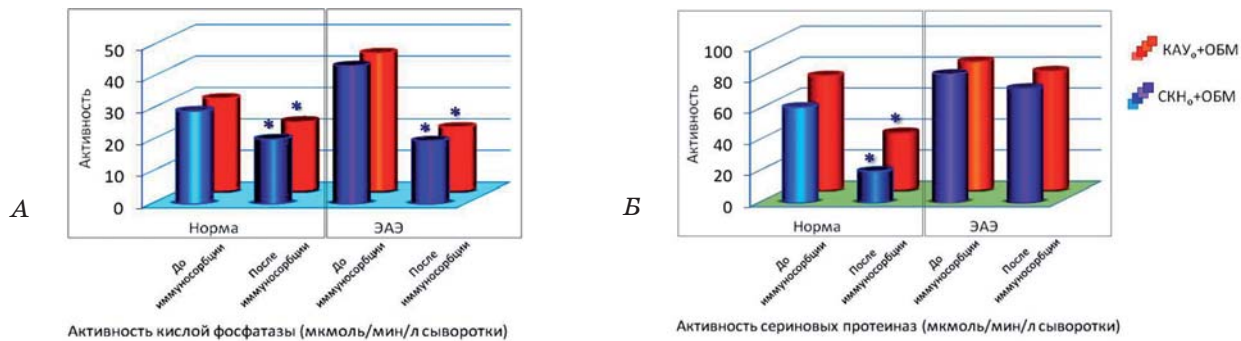


Рис. 4. Влияние перфузии через иммуносорбенты на активность гидролитических энзимов сыворотки крови морских свинок с ЭАЭ ($M \pm m$, $n = 5$):
* — достоверность различий между показателями «До иммуносорбции» и «После иммуносорбции» ($P < 0,05$).

наличие у исследованных иммуносорбентов потенциала к снижению этого показателя.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали терапевтическую эффективность применения иммуносорбентов на основе углеродных матриц при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите у морских свинок как в латентном периоде развития патологии, так и при наличии характерных ее признаков. Однако при использовании иммуносорбентов в позднем периоде ЭАЭ положительный эффект был менее выражен и носил транзиторный характер, в то время как применение их в латентном периоде позволяло предотвратить развитие заболевания у животных. Вероятно, этому способствовало удаление с помощью иммуносорбции анти-ОПМ антител из системного кровотока морских сви-

нок, сенсibilизированных к ОПМ, а также снижение активности гидролитических энзимов. Нельзя исключить, что терапевтический эффект иммуносорбции также мог быть обусловлен частичной элиминацией из кровотока специфических клонов аутореактивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к ОПМ, за счет их взаимодействия с лигандом, иммобилизованным на углеродных матрицах. Кроме того, поскольку синтезированные иммуносорбенты в значительной степени сохраняют способность к сорбции низкомолекулярных соединений, терапевтический эффект от их применения частично может быть также связан и с элиминацией пептидов ОПМ, которые могут быть прямо или опосредованно вовлечены в патогенез демиелинизирующего процесса, прежде всего в реакции сенсibilизации Т-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Huang D., Rae-Grant A. Advances in the immune pathogenesis and treatment of multiple sclerosis // *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* — 2009. — V. 9, N 1. — P. 20–31.
2. Bosnjak-Pasic M., Vidrih B., Miskov S., Demarin V. Treatment of multiple sclerosis // *Acta Clin. Croat.* — 2009. — V. 48, N 3. — P. 349–353.
3. Sundqvist E. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA // *Genes Immun.* — 2012. — V. 42. — P. 14–20.
4. El-Behi M., Rostami A., Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental allergic encephalomyelitis // *J. Neuroimmune Pharmacol.* — 2010. — V. 5, N 2. — P. 189–197.
5. Murphy A. C., Lalor S. J., Lynch M. A., Mills K. H. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis // *Brain Behav. Immun.* — 2010. — V. 24, N 4. — P. 641–651.
6. O'Connor R. A., Taams L. S., Anderton S. V. Translational mini-review series on Th17 cells: CD4 T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory T cell-mediated regulation // *Clin. Exp. Immun.* — 2010. — V. 159, N 2. — P. 137–147.
7. Storch M. K., Piddlesden S., Haltia M. et al. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination // *Ann. Neurol.* — 1998. — V. 43. — P. 465–471.
8. Kuhle J., Lindberg R. L., Regeniter A. et al. Antimyelin antibodies in clinically isolated syndromes correlate with inflammation in MRI and CSF // *J. Neurol.* — 2007. — V. 254, N 2. — P. 160–168.
9. Tomassini V., De Giglio L., Reindl M. et al. Antimyelin antibodies predict the clinical outcome after a first episode suggestive of MS // *Mult. Scler.* — 2007. — V. 13, N 9. — P. 1086–1094.
10. Egg R., Reindl M., Deisenhammer F. et al. Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis // *Mult. Scler.* — 2001. — V. 7, N 5. — P. 285–289.
11. Belogurov A. A. Jr., Kurkova I. N., Friboulet A. et al. Recognition and degradation of myelin

- basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis // *J. Immunol.* — 2008. — V. 180, N 2. — P. 1258–1267.
12. *Berger T., Rubner P., Schautzer F. et al.* Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — V. 349, N 2. — P. 139–145.
 13. *Di Pauli F., Berger T., Reindl M.* Monoclonal antibodies in the treatment of multiple sclerosis // *Curr. Med. Chem.* — 2009. — V. 16, N 36. — P. 4858–4868.
 14. *Loma I., Heyman R.* Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment // *Curr. Neuropharmacol.* — 2011. — V. 53. — P. 409–416.
 15. *Gonsette R. E.* Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? // *Mult Scler.* — 2008. — V. 44. — P. 22–34.
 16. *De Andres C., Anaya F., Gimenez-Roldan S.* Plasma immunoadsorption treatment of malignant multiple sclerosis with severe and prolonged relapses // *Rev. Neurol.* — 2000. — V. 30, N 7. — P. 601–605.
 17. *Moldenhauer A., Haas J., Wascher C. et al.* Immunoadsorption patients with multiple sclerosis: an open-label pilot study // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2005. — V. 35, N 8. — P. 523–530.
 18. *Nakane S., Matsuo H., Goto H. et al.* Cytapheresis with a filter for selective removal of CD4+ T cells in experimental allergic encephalomyelitis // *Mult. Scler.* — 2003. — V. 9, N 6. — P. 579–584.
 19. *Klingel R., Heibges A., Fassbender C.* Plasma exchange and immunoadsorption for autoimmune neurologic diseases — current guidelines and future perspectives // *Atheroscler. Suppl.* — 2009. — V. 10, N 5. — P. 129–132.
 20. *Бардахивская К. И., Гурина Н. М., Кучмеровская Т. М., Николаев В. Г.* Иммуносорбция в лечении аутоиммунных заболеваний (обзор) // *Биотехнология.* — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 9–22.
 21. *Житнухин Ю. Л., Литвиненко И. В., Огурцов Р. П.* Влияние никотинамида на развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.* — 1998. — Т. 125, № 2. — С. 180–182.
 22. *Палладин А. В., Терлецкая Я. Т., Козулина Е. П.* Белки структурных образований ткани головного мозга // *Укр. биохим. журн.* — 1970. — Т. 42, № 2. — С. 144–154.
 23. *Sedgwick J., Brostoff S., Mason D.* Experimental allergic encephalomyelitis in the absence of a classical delayed-type hypersensitivity reaction. Severe paralytic disease correlates with the presence of interleukin 2 receptor-positive cells infiltrating the central nervous system // *J. Exp. Med.* — 1987. — V. 165, N 4. — P. 1058–1075.
 24. *Cho Y. K., Baily J. E.* Immobilization of enzymes on activated carbon: Selection and preparation of the carbon support // *Biotechnol. Bioeng.* — 1979. — V. 21, N 3. — P. 461–476.
 25. *Kumar A. G., Swarnalatha S., Kamatch P. et al.* Immobilization of proteolytic enzyme on highly porous activated carbon derived from rice bran // *J. Porous Materials.* — 2009. — V. 16, N 4. — P. 439–445.
 26. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193, N 35. — P. 265–275.
 27. *Boyum A.* Separation of leukocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1968. — V. 21, N 97. — P. 77–89.
 28. *Toth T. E., Smith B., Pyle H. et al.* Simultaneous separation and purification of mononuclear and polymorphonuclear cells from the peripheral blood of cats // *J. Virol. Meth.* — 1992. — V. 36. — P. 185–195.
 29. *Stadecker M. J., Bishop G., Wortis M. M.* Rosette formation by guinea pig thymocytes and thymus derived lymphocytes with rabbit red blood cells // *J. Immunol.* — 1973. — V. 111, N 6. — P. 1834–1838.
 30. *Шварцман М. Я., Кашкин А. П.* Определение Т- и В-лимфоцитов у морских свинок // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 1982. — № 9. — С. 85–87.
 31. *Irie H., Sanai J., Nagai Y.* Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for anti-myelin basic protein antibody and its application to studies of experimental allergic encephalomyelitis // *Jap. J. Exp. Med.* — 1981. — V. 51, N 4. — P. 201–208.
 32. *Fishman W. H., Lerner F. A.* A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin // *J. Biol. Chem.* — 1953. — V. 200, N 1. — P. 89–97.
 33. *Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И. и др.* Методы определения прекалликреин-калликреиновой системы в крови человека: Метод. рекомендации. — К., 1978. — 14 с.
 34. *Николаев В. Г., Картель Н. Т., Посохова Е. А. и др.* Доклиническое изучение энтеросорбентов: Метод. рекомендации. — К., 2010. — 55 с.
 35. *Бакалинская О. Н., Сухаренко Н. В., Стрелко В. В. и др.* Сорбционные свойства углеродных гемосорбентов с иммобилизованными белками // *Укр. хим. журн.* — 1989. — Т. 55, № 12. — С. 1273–1276.
 36. *Бакалинская О. Н., Коваль Н. М., Картель Н. Т.* Получение углеродных гемосорбентов с биоспецифической активностью // *Эффер. терапия.* — 2003. — № 2. — С. 16–22.

ІМУНОСОРБЕНТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ У МОРСЬКИХ СВИНОК

Н. М. Гуріна¹, Т. М. Кучмеровська²

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: kuch@i.ua

Сучасне усталене уявлення про розсіяний склероз як демієлінізувальне захворювання аутоімунного походження сприяє розробленню біотехнологічних підходів до вилучення із системного кровотоку пацієнтів аутоантитіл, імунних комплексів та специфічних клонів CD4⁺T-лімфоцитів з метою лікування цього захворювання. Доклінічне вивчення нових еферентних засобів проводять на лабораторних тваринах з експериментальним алергічним енцефаломієлітом.

Для лікування експериментального алергічного енцефаломієліту у морських свинок ми застосовували імуносорбенти на основі окиснених вуглецевих гранульованих матриць КАУ та СКН з іммобілізованим основним протеїном мієліну — ОПМ. Експериментальний алергічний енцефаломієліт у тварин викликали одноразовим підшкірним введенням 100 мкг ОПМ у повному ад'юванті Фрейнда. Імуносорбенти отримували шляхом хімічної іммобілізації ОПМ на попередньо окиснених азотною кислотою вуглецевих гранульованих матрицях КАУ та СКН в реакції ковалентного сполучення у присутності водорозчинного 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїміду. Синтезовані імуносорбенти мали здатність зберігати до 84% та 90% поглинальної ємності стосовно низько- і середньомолекулярних сполук ендogenous походження, відповідно.

Розвиток експериментального алергічного енцефаломієліту у морських свинок супроводжувався збільшенням кількості T-лімфоцитів, появою високого рівня анти-ОПМ антитіл та підвищенням активності кислоти фосфатази і трипсиноподібних протеїназ у сироватці крові. Імуносорбцію проводили за наявності у морських свинок характерних ознак експериментального алергічного енцефаломієліту або в його латентному періоді. Синтезовані імуносорбенти мали терапевтичну ефективність як у разі їх використання в латентному періоді розвитку патології, так і за наявності її характерних ознак; вони давали змогу видаляти із сироватки крові морських свинок з експериментальним алергічним енцефаломієлітом до 37% анти-ОПМ антитіл і зменшувати активність кислоти фосфатази на 54%.

Ключові слова: імуносорбент, імуносорбція, експериментальний алергічний енцефаломієліт, анти-ОПМ антитіла.

IMMUNOADSORBENTS FOR THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS IN GUINEA PIGS

N. M. Gurina¹, T. M. Kuchmerovska²

¹Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: kuch@i.ua

The modern presumption of multiple sclerosis as a demyelinating disease of autoimmune nature contributes to the development of biotechnological approaches for removal of autoantibodies, immune complexes and specific clones of CD4⁺T-lymphocytes from the patients systemic circulation for this disease treatment. Preclinical study of new efferent means conducted on laboratory animals with experimental allergic encephalomyelitis.

For the treatment of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs, we used immunosorbents based on oxidized carbon granular matrix KAU and SCN with immobilized myelin basic protein MBP. Experimental allergic encephalomyelitis was induced by single subcutaneous injection of 100 µg of MBP in complete Freund's adjuvant. Immunosorbents were prepared by chemical immobilization of MBP on KAU and SCN carbon granular matrices pre-oxidized with nitric acid in the reaction of covalent linking in the presence of water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. Synthesized immunosorbents were able to save up to 84% and 90% of the absorptive capacity for relatively small and medium molecular compounds of endogenous origin, respectively.

The development of experimental allergic encephalomyelitis of guinea pigs was accompanied by increasing in number of T-lymphocytes, high-level augmentation of anti-MBP antibodies and increased activity of acid phosphatase and trypsin-like proteases in blood serum. Immunosorption was carried out on the stage of experimental allergic encephalomyelitis manifestation or in latent period. It was found that synthesized immunosorbents were in therapeutic efficacy both being used in the latent period of disease and in the presence of its characteristic signs; they enabled to remove up to 37% anti-MBP antibodies from blood serum of guinea pigs with experimental allergic encephalomyelitis and to reduce activity of serum acid phosphatase by 54%.

Key words: immunosorbent, immunosorption, experimental allergic encephalomyelitis, anti-MBP-antibodies.