

УТЕВСЬКА С. В.

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
Україна, 61022, м. Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: svitlanautevska@gmail.com, (093) 557-57-04
ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України»,
Україна, 61068, м. Харків, вул. Академіка Павлова, 46, e-mail: nbi.inpn@ukr.net

ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ (ЕАЕ) У ПРЕНАТАЛЬНО-СТРЕСОВАНИХ САМЦІВ ЩУРІВ, НАЩАДКІВ МАТЕРІВ ІЗ РІЗНОЮ ЧУТЛИВІСТЮ ДО ЕАЕ

Мета. Дослідити вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ), а також рівень статевих гормонів у самців щурів 200-денного віку, нащадків матерів із різною чутливістю до ЕАЕ. **Методи.** Аналізували рівень захворюваності та показники складності перебігу ЕАЕ (тривалість латентного періоду, періоду від дня перших до дня максимальних проявів неврологічного дефіциту; показники рівня неврологічних порушень (за період прояву неврологічного дефіциту) та рівня максимальних проявів неврологічного дефіциту); ІФА визначення рівня статевих гормонів у самців з індукцією ЕАЕ. **Результати.** У самців дослідної групи рівень естрадіолу був значно нижчим, аніж у щурів групи контролю. Серед пренатально-стресованих тварин самці, чутливі до індукції ЕАЕ, мали нижчий рівень тестостерону, а нащадки чутливих матерів виявилися більш стійкими до індукції ЕАЕ, ніж нащадки резистентних матерів. **Висновки.** Зниження захворюваності без істотних змін у перебігу ЕАЕ залежало від поєднання таких факторів, як: чутливість матері до індукції ЕАЕ та перенесений пренатальний стрес.

Ключові слова: експериментальний аутоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ), пренатальний стрес, статеві гормони, чутливість до індукції ЕАЕ.

Розсіяний склероз (РС) – хронічне аутоімунне демієлінізуюче захворювання, що залежить від комбінованого впливу генетичної схильності, статі, віку та дії зовнішніх факторів. Усе більше даних свідчать про те, що епігенетичні модифікації генів вносять свій вклад до патогенезу РС. Дослідження дискордантних за РС монозиготних близнюків виявило відмінність щодо рівня метилювання ДНК [1, 2]. Показано, що метилювання призводить до зміни експресії

генів, що регулюють продукцію, диференціювання, функції та рухову активність Т-клітин, а також генів, що регулюють виживання нейронів та олігодендроцитів, та, як наслідок, впливає на патогенез РС [3].

Найбільша кількість уперше діагностованих випадків РС спостерігається у людей репродуктивного віку з піком захворюваності приблизно у 30 років [4]. Статеві гормони значною мірою впливають на ризик розвитку та перебіг як РС, так і тваринної моделі – ЕАЕ. У ході популяційних досліджень було встановлено, що співвідношення хворих на РС хлопчиків та дівчаток у віці до 6 років складає 1,0:0,8. Із віком співвідношення змінюється: серед хворих від 6 до 10 років хлопчиків та дівчаток воно складає 1,0:1,6; у підлітків до 18 років – 1,0:2,1; а у дорослих – 1:3 [5]. Однак чоловіча стать є предиктором більш складного перебігу РС, до того ж показники фізичного і когнітивного стану гірші в осіб із більш низьким рівнем тестостерону [6].

Фактори, що діють у період формування гіпоталамо-гіпофізарно-гонадальної (ГГГ) системи, можуть певною мірою модифікувати її активність. Так, високі концентрації глюкокортикоїдів, які спостерігаються у матерів під час дії тривалого неунікаючого стресу в останню третину вагітності, впливаючи на плід, викликають, зокрема, зміну активності ГГГ-осі у нащадків у період їх зрілості. У дорослих пренатально-стресованих самців поряд зі зниженням маси тестикул спостерігається підвищення базального рівня кортикостерону та зниження рівнів лютеїнізуючого гормону і тестостерону в плазмі крові [7].

Видається ймовірним те, що пренатальний стрес, який діє на плід в останню третину вагітності, змінюючи активність ГГГ-осі, виступає фактором впливу на захворюваність і перебіг РС.

© УТЕВСЬКА С. В.

Метою нашого дослідження є вивчення впливу хронічного пренатального стресу на базальний рівень статевих гормонів, чутливість щодо розвитку і перебігу ЕАЕ у самців зрілого віку, чий матері мали різну чутливість до індукції ЕАЕ.

Матеріали і методи

Дослідження проведене у хронічному експерименті на 34 щурах-самцях із популяції тварин, що містяться у віварії ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України». Батьківську групу склали раніше імунізовані самки, у яких не відзначалося клінічних проявів ЕАЕ (резистентні до його індукції), та щури, у яких спостерігався легкий (клінічний індекс – 2 бали) перебіг ЕАЕ (чутливі до його індукції). Групу батьків спарювали двічі. Настання вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у вагінальних мазках [8]. Перше спарювання проводилося за 60 днів після імунізації тварин. Перебіг вагітності проходив за нормальних умов. Щури першого посліду склали групу контролю (І група – 13 самців). За 30–40 днів після закінчення періоду молочного вигодовування щурів батьківської групи спарювали другий раз. Від 15 дня вагітності і до самих пологів самок утримували за умов цілодобової освітленості та піддавали дії неунікаючого іммобілізаційного стресу: тричі на день їх поміщали в бокси (довжиною 15 см, висотою 7 см) на 45 хв (9^{00} , 12^{00} і 17^{00}) [9]. Щури другого посліду склали дослідну групу (ІІ група – 21 самець). В обох випадках період молочного вигодовування тривав 21 день, надалі дитинчат відсаджували від матерів. Доступ до їжі та води не обмежувався.

Індукція ЕАЕ у тварин 200-денного віку проводилася шляхом одноразової імунізації енцефалітогенною сумішшю алогенного гомогенату спинного мозку (ГСМ) з повним ад'ювантом Фрейнда (АФ) («Sigma-Aldrich», США) у підошовні поверхні задніх кінцівок у дозі 60 мг ГСМ з 0,1 мл АФ на 100 г маси тіла щура. День інокуляції антигена вважався нульовим днем експерименту; наступна доба визначалася як перший день після імунізації. Оцінка розвитку ЕАЕ здійснювалася протягом 20 днів.

Щодня проводилося тестування рівня неврологічних порушень у тварин із використанням шкали неврологічних порушень. Оцінка проводилася в балах клінічного індексу: від 0 – відсутність неврологічних порушень до 6 балів – тварина виявлялася мертвою або їй проводи-

лася евтаназія (у випадку, якщо у щура спостерігався парапараліч і стан не покращувався протягом доби), з кроком оцінки 0,25 бала [10].

Аналіз важкості перебігу ЕАЕ проводився з урахуванням таких показників: тривалість періоду від дня імунізації до дня перших проявів рухових порушень – латентний період (виражений у днях); тривалість періоду від дня перших проявів до дня максимальних рухових порушень (у днях); тривалість періоду від дня імунізації до дня прояву максимальних рухових порушень (у днях); щоденний середній рівень рухових порушень за період їх проявів (у балах); значення рівня максимальних рухових порушень (у балах). Під час аналізу перебігу ЕАЕ показник клінічного індексу, що дорівнював 6 балам, враховувався лише в день загибелі щура (надалі ця тварина виключалася з аналізу).

Після закінчення періоду спостережень проводився забір біологічного матеріалу (крові) для проведення імунологічних досліджень, що здійснювався шляхом декапітації тварин натщесерце (з 10 до 12 години). Біологічний матеріал витримували за кімнатної температури протягом години, потім центрифугували 15 хв (за 3000 обертів/хв). Сироватку крові відбирали в епандорфи і заморожували за температури 65°C .

Із застосуванням наборів реагентів для імуноферментного аналізу, згідно з інструкціями «Тестостерон» Lot 902; «Естрадіол» Lot 897; «Прогестерон» Lot 893 (НВФ «Гранум», Україна), визначали рівень гормонів. Результати імуноферментних досліджень реєстрували на мікропланшетному аналізаторі GBG Stat FAX 2100 (США).

Отримані дані аналізувалися методом Манна-Уїтні, порівняння доль проводили за допомогою критерію χ^2 . Перевірку статистичних гіпотез здійснювали на рівні значущості 0,05. За порівняння більше двох груп вводили поправку Бонфероні.

Результати та обговорення

Аналіз рівня захворюваності серед самців дослідної та контрольної груп показав, що, хоч доля захворілих серед пренатально-стресованих тварин (71,4 %) була нижчою від групи контролю (92,3 %), проте відмінності у захворюваності не досягали прийнятого рівня значущості. У той час, як рівень захворюваності серед щурів контрольної групи (нащадків матерів із різною чутливістю до індукції ЕАЕ) практично не відрізнявся, серед пренатально-стресованих тварин

рівень захворюваності у самців, нащадків чутливих самок-матерів (25 %), був значно нижчим від рівня захворюваності щурів від стійких до індукції ЕАЕ самок (80 %) ($p < 0,05$) (табл. 1).

Виявлено, що у групі пренатально-стресованих самців рівень естрадіолу був значно нижчим, ніж у тварин групи контролю ($p < 0,05$), хоча рівень тестостерону виявився також дещо нижчим від групи контролю, водночас відмінності не досягали прийнятого рівня значущості (табл. 2).

Аналіз перебігу ЕАЕ чутливих до індукції тварин показав, що основні показники важкості перебігу пренатально-стресованих і контрольних щурів не відрізнялися. Спостерігалось лише незначне подовження латентного періоду у тварин дослідної групи порівняно з тваринами, чий ембріональний розвиток відбувався за нормальних умов, проте ця різниця не досягала прийнятого рівня значущості (табл. 3).

Рівні тестостерону та естрадіолу чутливих до індукції ЕАЕ тварин, які перенесли прената-

льний стрес, були дещо нижчими, ніж у тварин групи контролю, але прийнятого рівня значущості ця різниця не досягала (табл. 4). Серед пренатально-стресованих щурів резистентність до індукції поєднувалася з вірогідно більш високим рівнем тестостерону, ніж чутливість до неї ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таким чином, самці, які перенесли пренатальний стрес, мають більш низькі показники рівня естрадіолу порівняно з групою контролю, а пренатально-стресовані тварини, які виявилися чутливими до індукції ЕАЕ, характеризувалися низькими показниками рівня тестостерону (на відміну від стійких тварин). Водночас у групі пренатально-стресованих самців зниження рівня захворюваності серед нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів, порівняно із щурами від резистентних матерів, можливо, свідчить про те, що зниження активності ГГГ-осі за впливу пренатального стресу не є фактором ризику розвитку захворювання у статевозрілих самців з обтяженою спадковістю.

Таблиця 1. Рівень сприйнятливості щодо індукції ЕАЕ у самців залежно від умов пренатального розвитку і чутливості матерів до його індукції

Група	Сприйнятливість матерів щодо індукції ЕАЕ	Число спостережень	З них	
			чутливі, n (%)	резистентні, n (%)
I група (контроль), $n=13$	чутливі	2	2 (100,0)	—
	резистентні	11	10 (90,9)	1 (9,1)
	Σ	13	12 (92,3)	1 (7,7)
II група (пренатальний стрес), $n=21$	чутливі	4	1 (25,0)*	3 (75,0)
	резистентні	15	12 (80,0)	3 (20,0)
	не визначена	2	2 (100,0)	—
	Σ	21	15 (71,4)	6 (28,6)

Примітки: n – кількість тварин; Σ – самці сумарно; * – відмінності вірогідні, порівняно з рівнем захворюваності серед самців II групи нащадків, резистентних до індукції ЕАЕ матерів ($p < 0,05$).

Таблиця 2. Вміст статевих гормонів (нмоль/л) у самців залежно від умов пренатального розвитку

Показник	I група (контроль)	II група (пренатально-стресовані)
Тестостерон	4,94 (1,70; 19,53)	3,00 (0,40; 14,31)
Естрадіол	0,84 (0,24; 1,74)	0,58* (0,17; 1,45)
Прогестерон	63,74 (29,96; 96,11)	71,60 (30,84; 103,63)

Примітки: дані, представлені як медіана (мінімум, максимум); * – відмінності, вірогідні порівняно з рівнем естрадіолу у самців контрольної групи ($p < 0,05$).

Таблиця 3. Показники перебігу ЕАЕ чутливих самців залежно від умов пренатального розвитку

Показник	Група чутливих до ЕАЕ щурів	
	I група (контроль)	II група (пренатально-стресовані)
Латентний період (дні)	9,50 (7,00; 12,00)	11,00 (8,00; 18,00)
Період від дня імунізації до дня прояву максимальних рухових порушень (дні)	13,00 (9,00; 16,00)	13,00 (10,00; 20,00)
Період від дня перших до дня прояву максимальних рухових порушень (дні)	3,50 (1,00; 6,00)	3,00 (1,00; 7,00)
Щоденний середній рівень рухових порушень за період їх проявів (бали)	2,42 (0,71; 4,84)	2,33 (0,50; 4,13)
Максимальні рухові порушення (бали)	3,88 (1,50; 6,00)	4,25 (0,50; 6,00)

Примітка. Дані, представлені як медіана (мінімум, максимум).

Таблиця 4. Показники рівня статевих гормонів (нмоль/л) у самців залежно від їхньої чутливості до індукції ЕАЕ

Показник	I група (контроль)		II група (пренатально-стресовані)	
	чутливі	резистентні	чутливі	резистентні
Тестостерон	2,38 (1,70; 17,73)	19,53	1,66 (0,40; 29,91)	4,42* (3,74; 14,31)
Естрадіол	0,82 (0,24; 1,74)	0,90	0,56 (0,17; 1,45)	0,66 (0,24; 0,89)
Прогестерон	63,78 (51,45; 96,11)	29,96	76,78 (33,86; 103,63)	75,09 (30,84; 90,21)

Примітки: дані представлені як медіана (мінімум; максимум); * – відмінності вірогідні, порівняно з рівнем тестостерону у самців II групи, чутливих до індукції ЕАЕ ($p < 0,05$).

Висновки

Зниження захворюваності без істотних змін у перебігу ЕАЕ залежало від поєднання таких факторів, як: чутливість матері до індукції ЕАЕ та перенесений пренатальний стрес.

Автор виражає глибоку вдячність проф. Л. А. Атраментовій за допомогу у підборі методів статистичного аналізу, проф. О. Г. Берченко – за цінні поради та обговорення результатів, а також лаборанту О. В. Кириченко –

за допомогу у догляді за тваринами. Робота була виконана в рамках теми, що фінансується НАМН України (№ держреєстрації 0115U001048), «Дослідити статеві особливості «сімейного» розсіяного склерозу та розробити підходи щодо визначення ризику розвитку демієлінуючої патології у спадкоємно-обтяженого розсіяним склерозом потомства (експериментальне дослідження)».

References

1. Baranzini S.E., Mudge J., van Velkinburgh J. C. et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature*. 2010. 464 (7293). P. 1351–1356. doi: 10.1038/nature08990.
2. Greer J.M., Mc Combe P.A. The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics: Targets and Therapy*. 2012. 6. P. 307–327. doi: 10.2147/BTT.S24067.
3. Li X., Xiao B., Chen X.S. DNA Methylation: a New Player in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2016. 6. doi: 10.1007/s12035-016-9966-3.
4. Salpietro V., Polizzi A., Recca G., Ruggieri M. The role of puberty and adolescence in the pathobiology of pediatric multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders*. 2018. 3, 2. doi: 10.1186/s40893-017-0032-4.
5. Pena J.A., Lotze T.E. Pediatric Multiple Sclerosis: Current Concepts and Consensus Definitions. *Autoimmune Diseases*. 2013. 12 p. doi:10.1155/2013/673947.
6. Golden L., Voskuhl R. The Importance of Studying Sex Differences in Disease: The Example of Multiple Sclerosis. *J. Neurosci Res*. 2017. 95 (1–2). P. 633–643. doi: 10.1002/jnr.23955.

7. Chen Cárdenas S.M., Mayer N., Romanini M.C. et al. Reproductive Response in Offspring Male Rats Exposed to Prenatal Stress and to Early Postnatal Stimulation. *Int. J. Morphology*. 2013. 31 (2). P. 754–764. dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200065.
8. Kabak Y.M. Workshop on endocrinology. Basic methods in experimental and endocrinological studies. M.: MSU Press, 1968. 276 p. [in Russian] / Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. Основные методы в экспериментально-эндокринологических исследованиях. М.: Изд-во МГУ, 1968. 276 с.
9. Barbazanges A., Piazza P.V., Le Moal M., Maccari S. Maternal Glucocorticoid Secretion Mediates Long-Term Effects of Prenatal Stress. *The Journal of Neuroscience*. 1996. 16 (12). P. 3943–3949.
10. Utevska S.V., Geyko V.V. Prenatal stress-induced sex differences in the incidence and course of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Factors in experimental evolution of organisms. Collection of academic papers*. 2018. Vol. 23. P. 238–243. [in Russian] / Утевская С.В., Гейко В.В. Половые особенности заболеваемости и течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс под влиянием пренатального стресса. *Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць*. 2018. Т. 23. С. 238–243.

UTEVSKA S. V.

V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 4, e-mail: svitlanautevska@gmail.com, (093) 557-57-04

Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine,

Ukraine, 61068, Kharkiv, Akademika Pavlova str., 46, e-mail: nbi.inpn@ukr.net

EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE) COURSE IN PRENATALLY STRESSED RAT MALES, THE OFFSPRING OF MOTHERS WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO EAE

Aim. The research is aimed at investigating the effect of prenatal stress on the incidence and course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as well as the level of sex hormones in 200-days-old male rats, offspring of females with different sensitivity to EAE induction. **Methods.** The incidence and severity of EAE including duration of latent period, duration of the period from the first to the maximum manifestation of motor disfunction, mean clinical scores, maximum level of motor disfunction (maximum clinical scores) were analyzed in rats with induced EAE. Serum testosterone, estradiol and progesterone levels were measured during Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Results.** The estradiol level of prenatally stressed males was significantly lower than in rats from the control group. Sensitive to EAE test male rats had lower testosterone levels than EAE resistant males, and the offspring of EAE sensitive mothers were more resistant to EAE induction than the offspring of EAE resistant mothers. **Conclusions.** Without significant changes in the course of EAE, the reduction in incidence depends on a combination of factors such as mother's sensitivity to EAE induction and prenatal stress.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), prenatal stress, sex hormones, sensitivity to EAE induction.