

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Державна установа «Інститут неврології, психіатрії та наркології
Національної академії медичних наук України»
Національна академія медичних наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Утевська Світлана Володимирівна

УДК 616-092.9-001.8:591.1:616.832-004.12-056.7:616.45-001.1/3-055-053

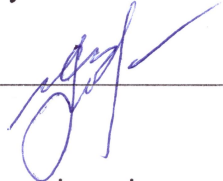
ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ СПАДКОВОЇ ОБТЯЖЕНОСТІ ТА ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ НА ФОРМУВАННЯ СХИЛЬНОСТІ ДО РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ У ЩУРІВ

Спеціальність 091 – «Біологія»
(Галузь знань 09 – Біологія)

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 С. В. Утевська

Наукові керівники: Любов Олексіївна Атраментова, доктор біологічних
наук, професор

Берченко Ольга Григорівна, доктор біологічних наук,
професор

*Ді присягнула дисертації
ідентичній за вмістом
Томасові спеціалізованої
ради ДФБ4.051.040
(Томасові О.Г.)*

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Утевська С. В. Вплив спадкової обтяженості та пренатального стресу на формування схильності до розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 – Біологія). – Державна установа «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України» Національної академії медичних наук України, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2021.

У дисертаційній роботі досліджено вплив спадкової обтяженості та пренатального стресу на формування схильності до розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) як тваринної моделі розсіяного склерозу (РС) у щурів залежно від статі та віку імунізації.

Аналіз наукових публікації виявив низку свідочств про епідеміологію та типи перебігу РС, фактори ризику розвитку РС, роль статевих і глюкокортикоїдних гормонів, а також анексину Ана1 у розвитку РС. Крім того, досліджено попередні дані про вплив перенесеного пренатального стресу на рецептивну чутливість до статевих і глюкокортикоїдних гормонів. Також проаналізовано літературу про можливість використання моделювання ЕАЕ у щурів для розуміння механізмів патогенезу РС, а також вікових і статевих особливостей перебігу цього захворювання.

Чутливість щурів до індукції ЕАЕ визначали за типом відповіді на введення енцефалітогенної суміші, до складу якої входили алогенний гомогенат спинного мозку і повний ад'ювант Фрейнда. Тварин за типом відповіді поділяли на «чутливих до індукції ЕАЕ» (мали ознаки захворювання за час спостереження) і «резистентних до індукції ЕАЕ» (не мали ознак захворювання за час спостереження). Дослідження проводили

шляхом імунізації на ЕАЕ. Пренатальний стрес моделювали дією хронічного неunikного стресу на матерів в останню третину вагітності. Імунізації піддавали тварин обох статей пубертатного віку (13 тижнів), молодого віку (18–21 тиждень) і зрілого віку (29–35 тижнів). Аналіз чутливості до індукції ЕАЕ і перебігу захворювання у щурів проводили за допомогою оцінки рівня захворюваності на ЕАЕ, рівня смертності, часових показників перебігу ЕАЕ та ступеня рухових порушень. У тварин обох статей зрілого віку, чий пренатальний розвиток проходив у різних умовах, за допомогою методу імуноферментного аналізу були досліджені зв'язок між рівнем статевих гормонів і захворюваністю та перебігом ЕАЕ, а також зміни рівня кортикостерону та його вторинного месенжера анексину-А1 (АнА1), що були викликані імунізацією.

Нами була розроблена модель для вивчення особливостей перебігу родинних форм РС залежно від умов пренатального розвитку. Моделювання складається з трьох етапів. На першому етапі проводиться індукція ЕАЕ у самок. До батьківської групи відбирають самок з різною чутливістю до індукції ЕАЕ. На другому етапі проводиться парування тварин з батьківської групи. За допомогою цитологічного дослідження вагінальних мазків визначають день запліднення. Моделювання дії фактору впливу проводять у самок у період вагітності та впродовж часу, що визначаються завданням дослідження. Новонароджених тварин утримують з матерями протягом 21 дня. На третьому етапі проводиться індукція ЕАЕ у всіх щурів з посліду матерів з визначеною чутливістю до імунізації, яка проводиться у віці, що визначається завданням дослідження.

У роботі вперше було виявлено особливості вікової динаміки захворюваності на ЕАЕ у щурів з різними умовами пренатального розвитку. У тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов, рівень захворюваності залежав від віку імунізації. Щури пубертатного віку хворіли на ЕАЕ значуще менше, ніж тварини молодого і зрілого віку. У тварин, що

зазнали дії пренатального стресу, рівні захворюваності в разі індукції ЕАЕ в пубертатному, молодому і зрілому віці практично не відрізнялися.

Також вперше були виявлені особливості захворюваності і перебігу ЕАЕ для кожної окремої вікової групи тварин залежно від умов пренатального розвитку. У пубертатному віці кількість хворих серед пренатально стресованих тварин була дещо вищою, ніж серед тварин групи порівняння. У самців умови пренатального розвитку не мали суттєвого впливу на перебіг хвороби. У самок перенесений пренатальний стрес асоціювався з пролонгуванням часу від дня перших проявів захворювання до дня з максимальними показниками рухових порушень, що призводило до формування вищих показників рівня максимальних рухових порушень.

Було виявлено, що в разі індукції ЕАЕ у молодому віці перебіг хвороби у тварин різної статі залежав від комбінованого впливу умов пренатального розвитку і чутливості матерів до імунізації. Найменший ризик захворюваності та смертності серед молодих щурів визначався комбінованим впливом факторів «жіноча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес». Комбінована дія таких факторів, як «чоловіча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес» у хворих тварин була умовою легшого перебігу хвороби та виживання.

Було показано, що в разі індукції ЕАЕ у щурів зрілого віку найменший рівень захворюваності визначався комбінованою дією факторів: «чоловіча стать» – «пренатальний стрес» – «чутливість матерів до індукції ЕАЕ». Самки, що мали різні умови пренатального розвитку, хворіли на ЕАЕ рівною мірою, водночас спостерігалися певні відмінності щодо перебігу хвороби. Для самок з посліду резистентних матерів перенесений пренатальний стрес був умовою зниження показників тяжкості захворювання.

Упродовж дослідження з використанням методу імуноферментного аналізу (ІФА) був виявлений зв'язок між умовами пренатального розвитку, рівнем статевих гормонів з одного боку і захворюваністю та перебігом ЕАЕ у

тварин зрілого віку різної статі з іншого боку. Рівень естрадіолу у пренатально стресованих самців був значуще нижчим, ніж у тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов утримання. Серед пренатально стресованих тварин обох статей резистентність до індукції ЕАЕ корелювала із суттєво вищими показниками тестостерону. Також було виявлено, що динаміка кортикостерону та АНА1, яка була викликана індукцією ЕАЕ, залежала від комбінованого впливу статевої приналежності щурів, умов пренатального розвитку і чутливості тварин до імунізації. Комбінація таких факторів, як «перенесений пренатальний стрес» і «чутливість до імунізації на ЕАЕ» асоціювалася у самців зі зниженням рівнів кортикостерону та АНА1 після індукції ЕАЕ. У самок перенесений пренатальний стрес був фактором, що визначив зменшення рівня кортикостерону на 10-й день після імунізації, а розвиток хвороби асоціювався зі зниженням АНА1. У нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів спостерігалися статеві відмінності у динаміці рівня АНА1. У самців, що хворіли на ЕАЕ, зниження АНА1 відзначалося у тих тварин, що зазнали дії пренатального стресу. У самок перенесений пренатальний стрес призвів до нижчих показників АНА1 як у стані здоров'я, так і в період розвитку хвороби. Водночас незалежно від умов пренатального розвитку в самок відзначалося виражене зниження АНА1 на 10 день розвитку хвороби.

Було досліджено специфічність дії пренатального стресу як фактору впливу на формування чутливості до імунізації у щурів. Порівнювалися рівень захворюваності і показники перебігу ЕАЕ у тварин молодого віку з посліду матерів, що піддавалися впливу хронічного неunikного стресу в останній триместр вагітності, та тварин з посліду матерів, що були імунізовані на ЕАЕ у період вагітності. Хвороба матері в період вагітності поєднувалася зі значно більшим рівнем захворюваності у нащадків, імунізованих у молодому віці, ніж дія неunikного стресу. Умови пренатального розвитку особливо вплинули на перебіг захворювання у нащадків чоловічої статі. Хвороба матері під час вагітності визначила ранній

початок і триваліший перебіг захворювання у нащадків-самців, ніж дія пренатального хронічного стресу. У самців, нащадків резистентних до розвитку ЕАЕ матерів, перенесений пренатальний стрес асоціювався з тяжчим перебігом захворювання у порівнянні із самцями, чиї матері були імунізовані в період вагітності та виявилися резистентними. Отже, пренатальний стрес є специфічним фактором, що впливає на рівень захворюваності та особливості перебігу ЕАЕ.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше на моделі РС – експериментальному аутоімунному енцефаломієліті – доведена залежність ризику розвитку ЕАЕ та тяжкості перебігу ЕАЕ від комбінованого впливу таких факторів як «пренатальний стрес», «стать», «вік імунізації тварин» та «чутливість матерів до імунізації». Було виявлено, що в разі індукції ЕАЕ у пубертатному віці умови пренатального розвитку не мали суттєвого впливу на перебіг хвороби у самців. Водночас у самок перенесений пренатальний стрес асоціювався з пролонгуванням часу від дня перших проявів захворювання до дня з максимальними показниками рухових порушень, що призводило до вищих показників рівня максимальних рухових порушень.

Було виявлено, що в разі індукції ЕАЕ у тварин молодого віку перебіг хвороби залежав від комбінованого впливу статі, умов пренатального розвитку і чутливості матерів до імунізації. Найменший ризик захворюваності та смертності серед молодих щурів визначався комбінованим впливом факторів: «жіноча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес». Комбінована дія факторів «чоловіча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес» у тварин, що хворіли, була умовою легшого перебігу ЕАЕ та виживання.

Було з'ясовано, що в разі індукції ЕАЕ в зрілому віці особливості перебігу хвороби у самок визначалися умовами пренатального розвитку. Такі показники тяжкості перебігу ЕАЕ, як $KI_{\text{макс}}$ (максимальний рівень рухових порушень) та $T_{KI \geq 2}$ (кількість днів хвороби, коли показники рухових

порушень дорівнюють або більше 2 балів KI) у пренатально стресованих самок були значуще нижчими, ніж у тварин, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов.

Уперше був виявлений вплив умов пренатального розвитку на вікову динаміку захворюваності на ЕАЕ у щурів. У тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов, значуще нижчий рівень захворюваності спостерігався у тварин пубертатного віку у порівнянні із щурами молодого і зрілого віку. У тварин, що зазнали дії пренатального стресу, рівні захворюваності в разі індукції ЕАЕ в пубертатному, молодому і зрілому віці практично не відрізнялися.

Уперше встановлено, що в зрілому віці чутливість до імунізації на ЕАЕ пренатально стресованих щурів обох статей пов'язана з низьким рівнем тестостерону в сироватці крові .

Уперше було виявлено, що динаміка кортикостерону та АnA1, що викликана індукцією ЕАЕ у тварин зрілого віку, залежала від комбінованого впливу статевої приналежності щурів, умов пренатального розвитку і чутливості тварин до імунізації. У самців, що зазнали дії пренатального стресу, одночасне зниження рівнів кортикостерону й АnA1 спостерігалось лише в чутливих до розвитку захворювання тварин. У самок перенесений пренатальний стрес виявився основним фактором, що призвів до зменшення рівня кортикостерону на 10-й день після імунізації. Зниження АnA1 спостерігалось лише у пренатально стресованих самок, що виявили чутливість до розвитку хвороби.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи важливі для глибшого розуміння етіології РС і визначення ролі пренатального стресу у формуванні вікових та статевих аспектів схильності до розвитку ЕАЕ залежно від типу чутливості матерів до індукції. Отримані дані дозволяють сформулювати новий напрямок досліджень, який концентрує увагу на факторах, що діють у пренатальний період розвитку і призводять до епігенетичних модифікацій геному, які, у свою чергу, визначають

особливості перебігу як ЕАЕ, так і РС. Використана нами тваринна модель індукції експериментального аутоімунного енцефаломієліту для дослідження впливу умов пренатального онтогенезу на формування схильності до розвитку і на перебіг родинних форм розсіяного склерозу розширює експериментальні можливості вивчення комбінованого впливу факторів середовища та генетичного фону на етіологію та патогенез розсіяного склерозу.

Отримані результати будуть сприяти розробці нових методів профілактики захворюваності на РС, прогнозуванню ризику розвитку захворювання у нащадків хворих на РС матерів, прогнозуванню перебігу захворювання у пацієнтів з родинними формами РС та визначенню нових терапевтичних підходів до лікування РС.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 2 статті у наукових фахових виданнях України; 1 стаття у закордонному журналі, який індексується міжнародними наукометричними базами; 1 стаття у спеціалізованому науковому виданні України. Опубліковано 4 тези доповідей у матеріалах міжнародних та українських конгресів і конференцій.

Ключові слова: експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, пренатальний стрес, вік, стать, чутливість матерів до індукції ЕАЕ, вагітність, статеві гормони, кортикостерон, анексин-А1.

ABSTRACT

Utevska S. V. The influence of hereditary predisposition and prenatal stress exposure on formation of susceptibility to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. – Qualification scholarly paper: a manuscript.

Thesis submitted for obtaining the Doctor of Philosophy Degree in specialty 091 – Biology (09 – Biology). – State Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" National Academy of Medical Sciences of Ukraine; V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation investigates the influence of hereditary predisposition and prenatal stress on the formation of susceptibility to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as an animal model of multiple sclerosis (MS) in rats depending on sex and age of EAE-inducing immunization.

Analysis of the literature revealed a number of evidence of the epidemiology and types of MS, risk factors for MS, the role of sex and glucocorticoid hormones, as well as annexin AnA1 in the development of MS. In addition, previous data on the effect of prenatal stress on receptive sensitivity to sex and glucocorticoid hormones were studied. The literature on the possibility of using EAE modeling in rats to understand the mechanisms of pathogenesis of MS, as well as age and sex characteristics of the disease was also analyzed.

The sensitivity of rats to EAE-inducing immunization was determined by the type of response to the introduction of an encephalitogenic mixture, which included allogeneic spinal cord homogenate and complete Freund's adjuvant. Animals, by type of response, were divided into “sensitive to EAE-inducing immunization” (had signs of disease during observation) and “resistant to EAE-inducing immunization” (had no signs of disease during observation). The study

was performed by EAE-inducing immunization. Prenatal stress was modeled by the effect of chronic unavoidable stress on mothers in the last third of pregnancy. EAE-inducing immunization was performed on animals of both sexes at puberty (13 weeks of age), young age (18-21 weeks of age) and adulthood (29–35 weeks of age). Sensitivity analysis to EAE induction and disease course in rats was performed by assessing the incidence of EAE, mortality, time of EAE and the degree of movement disorders. In adult animals of both sexes, whose prenatal development took place in different conditions, the relationship between the level of sex hormones and the incidence and course of EAE, as well as changes in corticosterone and its secondary messenger annexin-A1 were investigated by means of EAE-inducing immunization using the method of enzyme-linked immunosorbent assay.

We have developed a model to study the peculiarities of the course of family forms of multiple sclerosis depending on the conditions of prenatal development. The simulation consists of three stages. At the first stage, EAE-inducing immunization is performed in females. Females with different sensitivity to EAE induction were selected for the parent group. In the second stage, animals from the parent group were mated. With the help of cytological examination of vaginal smears, the day of fertilization was determined. Simulation of the action of the influencing factor was performed in females during pregnancy and during the time determined by the research task. Newborn animals were kept with their mothers for twenty-one days. In the third stage, EAE was induced in all rats from the offspring of mothers with a certain sensitivity to EAE-inducing immunization. Immunization was carried out at the age determined by the task of the study.

The research first revealed the features of the age dynamics of the incidence of EAE in rats with different conditions of prenatal development. In animals whose development took place under standard conditions, the incidence rate depended on the age of EAE-inducing immunization. Pubertal rats had significantly less EAE than young and mature animals. In animals exposed to prenatal stress, the

incidence rates in the case of induction of EAE at puberty, young and adulthood did not differ.

Also, for the first time, features of morbidity and course of EAE for each separate age group of animals depending on conditions of prenatal development were revealed. At puberty, the number of sick individuals among prenatally stressed animals was slightly higher than among animals in the comparison group. In males, prenatal development did not have a significant effect on the course of the disease. In females, prenatal stress was associated with a prolongation of time from the day of the first manifestations of the disease to the day with the maximum rates of movement disorders, which led to the formation of higher levels of maximum movement disorders.

It was found that in the case of induction of EAE at a young age, the course of the disease in animals of different sexes depended on the combined effect of conditions of prenatal development and the sensitivity of mothers to EAE-inducing immunization. The lowest risk of morbidity and mortality among young rats was determined by the combined effect of “female sex” – “maternal sensitivity to in EAE-inducing immunization” – “transferred prenatal stress”. The combined effect of factors such as “male sex” – “maternal sensitivity to EAE-inducing immunization” – “prenatal stress” in sick animals was a condition for easier disease and survival.

It was shown that in the case of EAE induction in adult rats, the lowest incidence was determined by a combined effect of factors: “male sex” – “transferred prenatal stress” – “maternal sensitivity to EAE induction”. Females with different prenatal development conditions were equally ill with EAE, but some differences in the course of the disease were observed. For females from the litter of resistant mothers, prenatal stress was a condition for reducing the severity of the disease.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed an association between prenatal developmental conditions, sex hormone levels on the one hand, and the incidence and course of EAE in adult animals of different sexes on the

other. Estrogen levels in prenatally stressed males were significantly lower than in animals whose development took place under standard conditions. Among prenatally stressed animals of both sexes, resistance to EAE induction correlated with significantly higher testosterone levels. It was also found that the dynamics of corticosterone and AnA1 caused by EAE induction depended on the combined effect of rat sex, prenatal development conditions and animal sensitivity to immunization. A combination of factors such as prenatal stress and predisposition to the disease was associated in males with decreased levels of corticosterone and AnA1 after induction of EAE. In females, the main factor determining the decrease in corticosterone levels on day 10 after immunization was prenatal stress, and a decrease in AnA1 was associated with susceptibility to disease. Gender differences in the dynamics of AnA1 levels were observed in the offspring of mothers resistant to EAE inducement. In males with EAE, a decrease in AnA1 was observed in those animals that were exposed to prenatal stress. In females, prenatal stress resulted in lower AnA1 levels in both health and disease development. At the same time, regardless of the conditions of prenatal development in females there was a marked decrease in AnA1 on the 10th day of the disease.

The specificity of the action of prenatal stress as a factor influencing the formation of sensitivity to EAE-inducing immunization in rats was studied. The incidence and course of EAE in young animals from the offspring of mothers who were immunized with EAE during pregnancy and animals from the offspring of mothers exposed to chronic unavoidable stress in the last trimester of pregnancy were compared. Maternal illness during pregnancy was associated with a much higher incidence rate in offspring immunized at a young age than the effects of unavoidable stress. Conditions of prenatal development particularly affected the course of the disease in male offspring. Maternal illness during pregnancy determined the early onset and longer course of the disease in male offspring than the effects of prenatal chronic stress. In males (offspring of EAE-resistant mothers) prenatal stress was associated with a more severe course of the disease compared to males whose mothers were immunized for EAE during pregnancy and were

resistant. Therefore, prenatal stress is a specific influencing factor that determines the level of morbidity and features of EAE.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time, using the model of multiple sclerosis – experimental autoimmune encephalomyelitis – the dependence of the risk of developing EAE and the severity of EAE on the combined effects of such factors as “prenatal stress”, “the age of immunization”, “sex” and “the sensitivity of mothers to EAE-inducing immunization” was revealed. It was found that in the case of induction of EAE in males at puberty, the conditions of prenatal development did not have a significant impact on the course of the disease. Whereas in females, prenatal stress was associated with a prolongation of time from the day of the first manifestations of the disease to the day with the maximum rates of movement disorders, which led to higher levels of maximum movement disorders.

It was found that in the case of induction of EAE in young animals, the course of the disease depended on the combined effect of sex, conditions of prenatal development and the sensitivity of mothers to EAE-inducing immunization. The lowest risk of morbidity and mortality among young rats was determined by the combined effect of “female sex” – “maternal sensitivity to EAE-inducing immunization” – “prenatal stress”. The combined effect of factors such as “male sex” – “maternal sensitivity to EAE-inducing immunization” – “prenatal stress” in sick animals was a condition for easier EAE and survival.

It was found that in the case of induction of EAE in adulthood, the features of the disease in females were determined by the conditions of prenatal development. EAE severity parameters such as “maximum level of movement disorders” and “number of days of illness when motor disorders are equal to or greater than 2 CI scores” were significantly lower in prenatally stressed females than in animals whose prenatal development took place under standard conditions.

For the first time, the influence of prenatal development conditions on the age dynamics of EAE incidence in rats was revealed. In animals whose development took place under standard conditions, a significantly lower incidence was observed

in animals of pubertal age compared to young and mature rats. In animals exposed to prenatal stress, the incidence rates in the case of induction of EAE at puberty, young and adulthood did not differ statistically.

For the first time, it was found an association between sensitivity to EAE-inducing immunization of prenatally stressed rats of both sexes in adulthood and low serum testosterone levels.

For the first time, it was found that the dynamics of corticosterone and AnA1 caused by the induction of EAE in adult animals depended on the combined effect of rat sex, prenatal development conditions and animal sensitivity to immunization. In males, decreased corticosterone and AnA1 levels were caused by a combined effect of prenatal stress and a predisposition to disease development. In females, the main factor leading to a decrease in corticosterone levels on day 10 after immunization was prenatal stress, and a decrease in AnA1 was associated with susceptibility to disease.

The practical significance of the obtained results. The results are important for an in-depth understanding of the etiology of multiple sclerosis and determining the role of prenatal stress in the formation of age and gender aspects of predisposition to the development of EAE depending on the type of sensitivity of mothers to EAE induction. The obtained data allow to form a new direction of research, which focuses on the factors that act in the prenatal period of development and lead to epigenetic modifications of the genome, which, in turn, determine the features of both EAE and MS. The animal model of induction of experimental autoimmune encephalomyelitis used by us to study the influence of conditions of prenatal ontogenesis on the formation of predisposition to development and on the course of family-associated forms of multiple sclerosis expands experimental possibilities of studying the combined influence of environmental factors and genetic background on the etiology and pathogenesis of multiple sclerosis.

The results will contribute to the development of new methods for the prevention of MS, predicting the risk of developing the disease in the offspring of

mothers with MS, predicting the course of the disease in patients with family MS and identifying new therapeutic approaches to multiple sclerosis.

Publications. Based on the materials of the dissertation, 2 articles were published in scientific professional journals of Ukraine; 1 article in a foreign journal indexed by international scientometric databases; 1 article in a specialized scientific journal of Ukraine. Four abstracts of reports have been published in the materials of international and Ukrainian congresses and conferences.

Key words: experimental autoimmune encephalomyelitis, prenatal stress, age, sex, maternal sensitivity to EAE induction, pregnancy, sex hormones, corticosterone, annexin-A1.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації

– Публікації в виданнях, включених до переліку фахових видань України

1. Утевская, С. В., & Гейко, В. В. (2018) Половые особенности заболеваемости и течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита у крыс под влиянием пренатального стресса. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 23. 238–243. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1021> URL: http://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/issue/view/Factory_V23_2018

Особистий внесок здобувача: участь у розробці дизайну експерименту, виготовлення енцефалітогенної суміші, індукція експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів батьківської групи, тестування рівня рухових порушень, парування тварин і тестування настання вагітності у самок, моделювання неunikного стресу у вагітних самок, індукція експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів дослідних груп, тестування рівня рухових порушень, статистичний аналіз отриманих даних, обговорення отриманих результатів, підготовка матеріалів дослідження до друку.

2. Утевська, С. В. (2019) Перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) у пренатально-стресованих самців щурів, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 24, 244–248. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1109> URL: http://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/issue/view/FEEO_V24_2019

– Публікації в наукових виданнях інших держав, що індексуються у міжнародних наукометричних базах

3. Гейко, В. В., & Утевская, С. В. (2014) Беременность и индуцированный на разных сроках гестационного периода

експериментальний аутоімунний енцефаломієліт. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. Спецвыпуски*, 114 (10–2), 25–32.
URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85100123286&origin=resultslist> (Scopus, Росія).

Особистий внесок здобувача: розробка дизайну експерименту, виготовлення енцефалітогенної суміші, індукція експериментального аутоімунного енцефаломієліту у вагітних самок, тестування рівня рухових порушень, підготовка матеріалів дослідження до друку.

– ***Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації***

4. Гейко, В. В., Берченко, О. Г., & Утевська, С. В., (2019) Формування експериментального аутоімунного енцефаломієліту у потомства чутливих і стійких до його індукції щурів як моделі «сімейних» форм розсіяного склерозу. *Журнал національної академії медичних наук України*, 25 (1), 21-24.
URL: <http://journal.amnu.gov.ua/images/pdf/2019-25-1/5.pdf>

Особистий внесок здобувача: виготовлення енцефалітогенної суміші, індукція експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів батьківської групи та щурів дослідних груп, тестування рівня моторних порушень за шкалою КІ, збір даних, статистичний аналіз даних, підготовка матеріалів дослідження до друку.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

5. Утевська, С. В. (2016) Вплив пренатального стресу на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель розсіяного склерозу) у щурів репродуктивного віку. *Матеріали VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції»* 237. <https://pat.nuph.edu.ua/pdf/tezi.pdf>

6. Утевська, С. В. (2017, березень) Особливості розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель розсіяного склерозу) у пренатально стресованих щурів в залежності від віку. *Матеріали*

науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології. Шістнадцяті Данилевські читання» с. 108–109. Харків, Україна.

7. Utevska, S. V., Geyko, V. V., & Berchenko, O. G. (2017, June) Effect of prenatal stress on the risk of the development and the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. In G. Bakalkin, O. Berezovska (Chairmen), *Cellular and molecular mechanisms of brain dysfunctions VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, Kyiv, Ukraine. Retrieved from http://usn.org.ua/data/uploads/USN_Congress_2017.pdf

Особистий внесок здобувача: розробка дизайну експерименту, співучасть у виконанні експериментального дослідження, збір даних, статистичний аналіз даних).

8. Utevska, S., Geyko, V., & Berchenko, O. (2019, August) Prenatal stress-induced sex differences in the incidence and the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in adult rats, the offspring of mothers with different sensitivity to EAE. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 79, LXXIX. Retrieved from https://ptbun.org.pl/wp-content/uploads/2021/08/Acta-Neurobiol-Exp-2019_79_supplement.pdf

Особистий внесок здобувача: розробка дизайну експерименту, співучасть у виконанні експериментального дослідження, збір даних, статистичний аналіз даних.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	24
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	34
1.1 Визначення розсіяного склерозу, епідеміологія, фактори ризику..	34
1.1.1 Розсіяний склероз, типи перебігу.....	34
1.1.2 Епідеміологія розсіяного склерозу.....	35
1.1.3 Середовищні фактори ризику розвитку розсіяного склерозу.....	36
1.1.4 Біологічні фактори ризику розвитку розсіяного склерозу....	37
1.1.5 Генетична та епігенетична схильність до розсіяного склерозу.....	38
1.2 Механізми розвитку розсіяного склерозу.....	40
1.2.1 Взаємодія нервової та імунної систем в нормі.....	40
1.2.2 Роль Т- і В-лімфоцитів у патогенезі розсіяного склерозу.....	41
1.2.3 Роль запалення.....	43
1.2.4 Значення гематоенцефалічного бар'єру.....	43
1.2.5 Демієлінізація та ремієлінізація при розсіяному склерозі....	45
1.3 Гормони у розвитку розсіяного склерозу.....	46
1.3.1 Роль статевих гормонів.....	46
1.3.2 Роль глюкокортикоїдних гормонів та їх вторинного месенжера анексину-А1.....	47
1.3.3 Пренатальний стрес як фактор зміни рецептивної чутливості щодо статевих і глюкокортикоїдних гормонів.....	51
1.4 Експериментальні моделі розсіяного склерозу.....	53
Висновки до розділу 1.....	57
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	58
2.1 Організація експериментальних досліджень.....	58

	20
2.2 Експериментальні тварини.....	58
2.3 Індукція експериментального аутоімунного енцефаломієліту.....	59
2.4 Тестування неврологічних порушень при експериментальному аутоімунному енцефаломієліту.....	60
2.5 Показники перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту.....	61
2.6 Визначення стадії естрального циклу.....	61
2.7 Спарювання тварин з батьківської групи і визначення вагітності.	62
2.8 Моделювання пренатального стресу.....	62
2.9 Дизайн експерименту.....	63
2.10 Отримання біологічного матеріалу для імуноферментних досліджень.....	66
2.11 Імуноферментні дослідження стероїдних гормонів та анексину-А1.....	67
2.12 Вимірювання систолічного тиску у вагітних самок.....	67
2.13 Статистичні методи аналізу отриманих даних.....	68
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ НА ЗАХВОРЮВАНІСТЬ І ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ВІКУ І СТАТІ ЩУРІВ ТА ЧУТЛИВОСТІ ЇХНІХ МАТЕРІВ ДО ІНДУКЦІЇ ЕАЕ.....	69
3.1 Розробка експериментальної моделі (підходів) для вивчення родинних форм розсіяного склерозу та модифікація шкали для оцінки рухових порушень.....	70
3.2 Вплив пренатального стресу та чутливості матерів до індукції ЕАЕ на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання ЕАЕ у молодому віці.....	74
3.2.1 Вплив імунізації матерів на захворюваність і перебіг	

експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання в молодому віці.....	74
3.2.2 Вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання в молодому віці.....	81
3.2.2.1 Дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів різної статі, нащадків інтактних матерів, за умов моделювання цього захворювання в молодому віці.....	81
3.2.2.2 Дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів, нащадків імунізованих матерів, за умов моделювання цього захворювання в молодому віці.....	83
3.2.2.3 Дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ, за умов моделювання цього захворювання в молодому віці.....	84
3.3 Вплив пренатального стресу та чутливості матерів до індукції ЕАЕ на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання ЕАЕ у зрілому віці...	88
3.3.1 Вплив імунізації матерів на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання у зрілому віці...	88
3.3.2 Вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів різної статі, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, за умов моделювання цього захворювання у зрілому віці.....	93

3.4 Вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання у пубертатному віці.....	102
3.5 Динаміка захворюваності на експериментальний аутоімунний енцефаломієліт у щурів різної статі з різними умовами пренатального розвитку за умов моделювання цього захворювання.....	106
3.6 Вплив неunikного стресу, що діяв на вагітних самок у третьому триместрі вагітності, на показники систолічного артеріального тиску...	108
Висновки до розділу 3.....	109
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ НА РІВЕНЬ СТЕРОЇДНИХ ГОРМОНІВ ТА АНЕКСИНУ-A1 У ЩУРІВ ЗРІЛОГО ВІКУ.....	111
4.1 Вплив пренатального стресу на рівень статевих гормонів у щурів різної статі, нащадків матерів з різною чутливістю щодо індукції ЕАЕ, за умов моделювання експериментального аутоімунного енцефаломієліту.....	111
4.1.1 Рівень статевих гормонів у самців зрілого віку в залежності від умов пренатального розвитку.....	112
4.1.2 Рівень статевих гормонів у щурів зрілого віку в залежності від статі, умов пренатального розвитку та їхньої чутливості до індукції ЕАЕ.....	114
4.2 Вплив пренатального стресу на зміну рівнів кортикостерону та анексину-A1 у щурів зрілого віку, різної статі за умов розвитку ЕАЕ ...	117
4.2.1 Вплив індукції ЕАЕ на динаміку рівнів кортикостерону та анексину-A1 у щурів зрілого віку в залежності від статі тварин та їхньої чутливості до розвитку захворювання	119
4.2.2 Вплив індукції ЕАЕ на динаміку рівнів кортикостерону та анексину-A1 у чутливих до індукції ЕАЕ щурів зрілого віку з посліду матерів, резистентних до розвитку ЕАЕ в залежності від статі та умов	

	23
пренатального розвитку.....	124
Висновки до розділу 4.....	128
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ ЯК ФАКТОРУ, ЩО ВПЛИВАЄ НА ФОРМУВАННЯ СХИЛЬНОСТІ ЩОДО РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ.....	130
5.1 Дослідження ефектів імунізації на ЕАЕ та неунікного хронічного стресу на стан вагітних щурів і розвиток вагітності.....	131
5.2 Дослідження особливостей перебігу ЕАЕ за умов індукції захворювання у молодих нащадків матерів, яких імунізували під час вагітності, та нащадків матерів, що піддавалися дії хронічного неунікного стресу в останній триместр вагітності.....	134
Висновки до розділу 5.....	140
РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ.....	142
6.1 Вплив умов пренатального розвитку, віку і статі тварин та чутливості матерів щодо індукції експериментального аутоімуного енцефаломієліту на захворюваність і перебіг ЕАЕ.....	142
6.2 Роль статевих гормонів у формуванні схильності щодо розвитку експериментального аутоімуного енцефаломієліту.....	146
6.3 Роль кортикостерону та анексину-А1 на формування схильності до розвитку експериментального аутоімуного енцефаломієліту.....	148
6.4 Пренатальний стрес як специфічний фактор впливу на схильність до розвитку експериментального аутоімуного енцефаломієліту.....	150
Висновки до розділу 6.....	151
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	153
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	157
ДОДАТОК А.....	182

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АнА1	—	анексин-А1
АнА1 ^{-/-}	—	нокаутні по гену анексину-А1
вЕБ	—	вірус Епштейна-Барра
ГГА	—	гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова ось
ГГГ	—	гіпоталамо-гіпофізарно-гонадальна ось
ГЕБ	—	гематоенцефалічний бар'єр
ГКР	—	глюкокортикоїдні рецептори
ЕАЕ	—	експериментальний аутоімунний енцефаломієліт
ІФА	—	імуноферментний аналіз
КІ	—	клінічний індекс
КІ _{макс}	—	максимальний рівень рухових порушень, який спостерігався
КІ _{ср}	—	середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби
КІ _{сум}	—	сума показників рухових порушень за весь період спостережень
ЛП	—	латентний період
МР	—	матері резистентні до індукції ЕАЕекспериментального аутоімунного енцефаломієліту (не мали ознак рухових порушень після імунізації на ЕАЕ)
МРТ	—	магнітно-резонансна томографія
м-РНК	—	матрична рибонуклеїнова кислота
МЧ	—	матері чутливі до індукції експериментального аутоімунного енцефаломієліту (які хворіли на ЕАЕ)
ПС	—	піддавалися дії пренатального стресу
РС	—	розсіяний склероз
САТ	—	систоличний артеріальний тиск
СУ	—	стандартні умови пренатального розвитку
Т _{0-макс}	—	час від імунізації до дня з максимальним показником моторної

	дисфункції
$T_{ki \geq 2}$	– кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів клінічного індексу
$T_{п-макс}$	– час від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції
$T_{хв}$	– тривалість захворювання
ЦНС	– центральна нервова система
Estr	– естрадіол
HLA	– людський лейкоцитарний антиген (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN- γ	– інтерферон- γ (interferon- γ)
IL	– інтерлейкін (interleukin)
n	– кількість тварин
MBP	– основний білок мієліну (myelin basic protein)
MOG	– <i>мієлін</i> -олігодендрокітарний <i>глікопротеїн</i> (myelin oligodendrocyte glycoprotein)
PLP	– протеоліпідний білок (proteolipid protein)
Prog	– прогестерон (progesterone)
<i>Std. dev.</i>	– стандартне відхилення
Test	– тестостерон (testosterone)
Th	– Т-хелпери – субпопуляція Т-лімфоцитів (T helper)

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Розсіяний склероз (РС) – одне з найпоширеніших нейродегенеративних захворювань центральної нервової системи (ЦНС) з до кінця не з'ясованою етіологією та патогенезом. Найчастіше РС вражає людей працездатного віку та характеризується хронічним перебігом і невпинною інвалідизацією. У Європі та Північній Америці на РС хворіє приблизно 1 людина із 1000 [151]. Захворювання має виражену статеву схильність: жінки хворіють на РС більш ніж у 2 рази частіше за чоловіків.

За допомогою епідеміологічних досліджень в етіології РС була визначена роль як екологічних, так і генетичних чинників. На сьогодні причетними до підвищення ризику розвитку і тяжкості перебігу РС вважають алелі більше 100 генів [65], частина з яких знаходиться в регіоні головного комплексу гістосумісності [65, 78]. Індивідуальний вклад більшості з цих генів помітно не змінює імовірність розвитку РС, проте сукупний вплив таких алелів багаторазово посилюється, якщо кодовані ними білки є учасниками одного процесу або беруть участь у реакціях одного типу [37].

Дослідження ризику розвитку захворювання у родичів хворих на РС показало, що у вибірці із 748 монозиготних близнят у 17,25 % випадків обидва були хворими на РС, тоді як із 1326 дизиготних близнят хворі на РС сибси склали 4,37 % випадків, а у групі сиблінгів – 2,18 %. Той факт, що захворюваність на РС у дизиготних близнят вища за братів і сестер, які народились у різний час, передбачає тимчасову дію екологічних чинників ризику або потенційний внутрішньоутробний вплив екзогенної чи то ендогенної природи, що призводить до епігенетичних модифікацій [112]. Фактори навколишнього середовища здатні як викликати, так і модифікувати епігенетичні зміни, забезпечуючи потенційний зв'язок між зовнішніми впливами та успадкованою генетичною системою. Підвищена передача

матерями алелів з групи ризику свідчить про те, що епігенетична регуляція має значний вплив на ризик розвитку РС [78].

У механізмах розвитку РС провідна роль належить нейрозапаленню та демієлінізації нервових волокон. Різноманітність типів перебігу РС залежить від типів клітин, пулу регуляторних протеїнів, рівня статевих і глюкокортикоїдних гормонів, що формують патогенетичні механізми розвитку РС. Велику роль у дослідженні механізмів патогенезу РС відіграє експериментальне моделювання на тваринах, зокрема за допомогою експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE).

Одним з чинників, який, діючи на організм під час III триместру вагітності, викликає у плода зміни чутливості гіпоталамо-гіпофізарно-гонадальної (ГГГ) та гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової (ГГА) систем організму, є тривалий стрес. А. Barbazanges та співавтори показали, що стрес, який діє на матір, впливає на розвиток плоду через аномально високий рівень материнських глюкокортикоїдів (ГК) і призводить до зменшення у гіпокампі кількості кортикостероїдних рецепторів, що беруть участь у забезпеченні негативного зворотного зв'язку в механізмах регуляції глюкокортикоїдних гормонів [6]. У щурів пренатальна дія високого рівня материнського кортикостерону викликає зниження активності ГГГ-осі та призводить у нащадків-самців до зниження в крові рівня тестостерону і лютеїнізуючого гормону в дорослому віці [25]. У свою чергу, зміна рівня статевих гормонів може призвести до модифікації активності про- і протизапальних цитокінів, рівня циркулюючих Т-клітин, процесу адгезії [10, 56]. Від фонового рівня статевих гормонів залежить зміна концентрацій кортизолу та адренокортикотропіну у сироватці крові у відповідь на стимуляцію кортикотропін-релізінг гормоном і вазопресином [16]. Більшу частину ефектів глюкокортикоїди реалізують через вторинний месенжер – анексин-А1 (AnA1) [123].

Питання впливу пренатального стресу на формування схильності до розвитку і перебігу РС було поза увагою дослідників. На наш погляд, стрес,

що діє на плід у третьому триместрі пренатального розвитку, впливає на ризик розвитку та перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) у щурів. Цей вплив здійснюється через зміни активності ГГА-осі, що пов'язані зі змінами експресії генів рецепторів до ГК, а також зміни рівня статевих гормонів у тварин протягом життя. З огляду на вищезазначене, можна сказати, що наразі у проблемі РС найменш вивченим є епігенетичний аспект, який з урахуванням сучасних реалій набуває особливої актуальності.

Мета і завдання дослідження: Вивчити значення пренатального стресу як фактору впливу на статеві та вікові особливості чутливості до імунізації на ЕАЕ і перебігу ЕАЕ як моделі РС у спадково-обтяженого потомства щурів.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

1) на основі ЕАЕ створити тваринну модель для дослідження впливу пренатального стресу на формування схильності до розвитку і перебіг захворювання при родинних формах РС;

2) вивчити вікові та статеві особливості розвитку ЕАЕ у потомства, спадково-обтяженого за материнською лінією;

3) вивчити вплив пренатального стресу на вікові та статеві особливості розвитку ЕАЕ у потомства, спадково-обтяженого за материнською лінією;

4) вивчити вікові та статеві особливості розвитку і тяжкість перебігу ЕАЕ у щурів, народжених від стійких щодо розвитку ЕАЕ матерів;

5) вивчити вплив пренатального стресу на вікові та статеві особливості розвитку і тяжкість перебігу ЕАЕ у щурів, народжених від стійких щодо розвитку ЕАЕ матерів;

6) дослідити вміст кортикостерону та анексину-А1 у плазмі крові (до- і після імунізації енцефалітогенною тканиною) щурів зрілого віку, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, залежно від умов пренатального розвитку;

7) дослідити вміст статевих гормонів у плазмі крові щурів зрілого віку, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, в залежності від умов пренатального розвитку;

8) дослідити питання специфічності дії пренатального стресу в якості фактору впливу на формування ризику розвитку і перебіг ЕАЕ у щурів, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ.

Об'єкт дослідження: експериментальний аутоімунний енцефаломієліт.

Предмет дослідження: рівень захворюваності після індукції ЕАЕ, рівень смертності, клінічні показники тяжкості перебігу ЕАЕ, вміст статевих гормонів, кортикостерону та анексину-А1 у сироватці крові.

Методи дослідження. У роботі були використані такі методи: експериментальне моделювання РС внаслідок імунізації лабораторних щурів на ЕАЕ, тестування неврологічних порушень при ЕАЕ за допомогою Шкали неврологічних порушень, цитологічний аналіз вагінальних мазків для визначення стадії естрального циклу, моделювання неunikного стресу впродовж третього триместру вагітності самок щурів, імуноферментне визначення вмісту стероїдних гормонів та анексину-А1 у сироватці крові лабораторних тварин, вимірювання систолічного артеріального тиску у вагітних самок, статистичні методи аналізу (точний критерій Фішера або хі квадрат (χ^2), критерій Вілкоксона (критерій U Манна–Уїтні), критерій H Краскела–Уоліса.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на моделі РС – експериментальному аутоімунному енцефаломієліті – доведена залежність ризику розвитку ЕАЕ та тяжкості його перебігу від комбінованого впливу пренатального стресу, віку імунізації тварин, статі і чутливості матерів до індукції ЕАЕ. Було виявлено, що в разі індукції ЕАЕ у самців у пубертатному віці умови пренатального розвитку не мали суттєвого впливу на перебіг хвороби. Проте у самок перенесений пренатальний стрес асоціювався з пролонгуванням часу від дня перших проявів захворювання до дня з

максимальними показниками рухових порушень, що призводило до більш високих показників рівня максимальних рухових порушень.

Було виявлено, що в разі індукції ЕАЕ у тварин молодого віку перебіг хвороби залежав від комбінованого впливу статі, умов пренатального розвитку і чутливості матерів до індукції ЕАЕ. Найменший ризик захворюваності та смертності серед молодих щурів визначався комбінованим впливом факторів: «жіноча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес». Комбінована дія факторів «чоловіча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес» у тварин, що хворіли, виявлялася умовою легшого перебігу ЕАЕ та виживання.

Було з'ясовано, що в разі індукції ЕАЕ у щурів зрілого віку умови пренатального розвитку визначали у самок особливості перебігу хвороби. Такі показники тяжкості перебігу ЕАЕ, як «максимальний рівень рухових порушень» і «кількість днів хвороби» (коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ) у пренатально стресованих самок були значно нижчими, ніж у тварин, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов.

Уперше був виявлений вплив умов пренатального розвитку на вікову динаміку захворюваності на ЕАЕ у щурів. У тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов, значуще нижчий рівень захворюваності спостерігався у тварин пубертатного віку в порівнянні з щурами молодого і зрілого віку. У тварин, що зазнали дії пренатального стресу, рівні захворюваності в разі індукції ЕАЕ в пубертатному, молодому і зрілому віці практично співпадали.

Уперше встановлено зв'язок чутливості до індукції ЕАЕ пренатально стресованих щурів обох статей у зрілому віці та низького рівня тестостерону в сироватці крові.

Уперше було виявлено, що динаміка кортикостерону та АnА1, викликана індукцією ЕАЕ у тварин зрілого віку, залежала від комбінованого впливу статевієї приналежності щурів, умов пренатального розвитку і

чутливості тварин до імунізації. У самців зниження рівнів кортикостерону та АnА1 було викликано комбінованою дією пренатального стресу і схильністю до розвитку захворювання. У самок основним фактором, що призвів до зменшення рівня кортикостерону на 10 день після імунізації, виявився перенесений пренатальний стрес, а зниження АnА1 асоціювалося із чутливістю до розвитку хвороби.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи важливі для глибшого розуміння етіології РС, визначення ролі пренатального стресу у формуванні вікових та статевих аспектів схильності до розвитку ЕАЕ залежно від типу чутливості матерів до індукції ЕАЕ. Отримані дані дозволяють сформулювати новий напрямок дослідження, який концентрує увагу на факторах, що діють в пренатальний період розвитку і призводять до епігенетичних модифікацій геному, які, у свою чергу, визначають особливості перебігу як ЕАЕ, так і РС. Отримані результати будуть сприяти розробці нових методів профілактики захворюваності на РС, прогнозуванню ризику розвитку захворювання у нащадків хворих на РС матерів, прогнозуванню перебігу захворювання у пацієнтів з родинними формами РС та визначенню нових терапевтичних підходів до лікування РС.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. На основі проведеного аналізу наукової літератури з досліджуваної проблеми авторка обґрунтувала мету і завдання роботи, спланувала дизайн експерименту. Експериментальні дослідження виконані здобувачкою особисто: моделювання ЕАЕ, визначення стадії естрального циклу та вагітності щурів, моделювання пренатального стресу, тестування неврологічних порушень, отримання біологічного матеріалу для ІФА-дослідження, біохімічні дослідження методом ІФА та статистичний аналіз отриманих даних. Спільно з науковим керівником проведено аналіз отриманих результатів, їхня інтерпретація та обговорення, сформульовані висновки.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (05-07.10.2016, м. Харків, Україна); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Шістнадцяті Данилевські читання) (02-03.03.2017, м. Харків, Україна); VII Конгресі Українського товариства нейронаук (07-11.06.2017, м. Київ, Україна); XIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченій 100-річчю від часу заснування Національної академії наук України (17-21.09.2018, м. Яремче, Україна); XIV Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченій 140-річчю від дня народження видатного генетика і селекціонера академіка В. Я. Юр'єва (15-20.09.2019, м. Київ, Україна); 14-th International Congress of The Polish Neuroscience Society (28-30.08.2019, Katowice, Poland).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені в 4 наукових роботах: 2 – у фахових наукових виданнях України, 1 – у закордонному науковому журналі, який входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 1 – у спеціалізованому науковому виданні України. Опубліковано 4 тез доповідей в матеріалах міжнародних і Всеукраїнських конгресів та конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення результатів, загальних висновків, списку використаних джерел і додатку. Робота ілюстрована 10 таблицями і 36 рисунками. Список використаних джерел містить 176 найменувань. Загальний обсяг дисертаційної роботи складає 183 сторінки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота була виконана в лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії ДУ ІНПН НАМН України в рамках тем, які фінансувалися НАМН України: «Дослідити статеві особливості «сімейного» розсіяного склерозу та

розробити підходи щодо визначення ризику розвитку демієлінізуючої патології у спадкоємно-обтяженого розсіяним склерозом потомства (експериментальне дослідження)» (№ держреєстрації 0115U001048); «Вивчити нейробіологічні механізми впливу природно завершеної вагітності на перебіг розсіяного склерозу та схильність до формування демієлінізуючої патології у нащадків» (№ держреєстрації 0112U001251)

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Визначення розсіяного склерозу, епідеміологія, фактори ризику

1.1.1 Розсіяний склероз, типи перебігу

Розсіяний склероз – запальне захворювання з аутоімунним патогенезом, яке призводить до демієлінізації, загибелі аксонів, гліозу та формування чисельних зон ураження (бляшок) у центральній нервовій системі. Згідно з українським варіантом Міжнародної класифікації первинної медичної допомоги (ICPC-2-E) розсіяний склероз має шифр N86, який відповідає коду G35 у Міжнародному класифікаторі хвороб (МКХ-10) [170]. Міжнародний консультативний комітет з клінічних випробувань при розсіяному склерозі (International Advisory Committee On Clinical Trials In Multiple Sclerosis) рекомендує визначати чотири типи перебігу цього захворювання, а саме:

- 1) рецидивуючо-ремітуючий РС – РРРС (спостерігається низка рецидивів, кожен з яких закінчується або повним одужанням, або деяким дефіцитом функцій, в період ремісії відсутнє прогресування захворювання);
- 2) первинно-прогресуючий РС – ППРС (захворювання прогресує практично безперервно, ремісія не спостерігається);
- 3) вторинно-прогресуючий РС – ВПРС (розглядається як етап розвитку РРРС, при якому під час ремісії рівень функціональних порушень не досягає стану, що спостерігався перед рецидивом);
- 4) прогресуючо-рецидивуючий РС – ПРРС (гострі рецидиви змінюються періодами ремісії, під час яких спостерігається прогресування захворювання) [90].

З огляду на існуючу на сьогодні велику кількість нових клінічних даних про патогенез РС фахівці пропонують ввести корективи до прийнятої класифікації. Запропоновано включити до типів перебігу захворювання клінічно ізольований синдром і виключити прогресуючо-рецидивуючий РС [91]. Така значна гетерогенність перебігу РС вимагає

створення низки моделей для експериментального вивчення патогенезу різних типів перебігу, а також для дослідження окремих аспектів цього захворювання.

1.1.2 Епідеміологія розсіяного склерозу

Розсіяний склероз – одне з найпоширеніших нейродегенеративних захворювань ЦНС. У всьому світі у 2016 році кількість хворих на РС становила понад 2,2 млн. людей, а в Україні таких хворих нараховувалося близько 22000 людей [150]. Але порівнюючи відношення числа хворих на РС до загальної кількості населення в країнах центральної та східної Європи в 2016 році, можна припустити, що певна частка випадків цього захворювання в країнах, що входили раніше до складу СРСР, залишається не діагностованою (в Польщі – 94,9:100000; Словенії – 72,0:100000; Словаччині – 62,1:100000; Україні – 51,2:100000; Білорусі – 50,9:100000 чоловік) [50].

Розсіяний склероз в основному поражає людей віком від 20 до 40 років, з піком захворюваності у віці 30 років [107, 121]. У той час, коли в середньому в популяції вірогідний ризик захворіти на РС складає 0,1-0,2 %, наявність родичів другого ступеню спорідненості підвищує ризик розвитку хвороби до 1 %, а якщо є хворі родичі першого ступеню спорідненості, то ризик складає близько 2-4 % [28, 125]. Різні демографічні дослідження показують, що пацієнти молодші 18 років (педіатричний РС) складають від 1,7 до 5,6 % всіх випадків, а початок захворювання до 10-річного віку (дитячий РС) відбувається у менш ніж 1 % [121]. З віком кількість випадків першого епізоду підвищується, досягаючи піку між 25-35 роками [4, 152], і потім поступово знижується: так, лише в 3,4-7,7 % усіх випадків перший епізод РС розвивається у пацієнтів старше 50 років, а люди, що захворіли на РС після 59 років, складають 0,3-1,3 % від усіх спостережень [17, 39, 89].

Жіноча стать є фактором ризику розвитку РС. Згідно із спостереженнями, частка жінок серед хворих на РС зростала і в останні роки загальне співвідношення жінок до чоловіків складає (2,1-3,2):1,0 [17, 87, 115,

153]. Поєднання таких факторів, як стать і вік визначає динамічну зміну в співвідношенні хворих. Підвищення частки жінок серед хворих спостерігається від періоду статевого дозрівання і до віку, коли функціонування репродуктивної системи можна визначити як період розквіту, після якого частка жінок серед тих, у кого вперше діагностували РС, поступово зменшується [100]. Наприклад, серед дітей молодше 6 років співвідношення дівчат до хлопчиків складає близько 0,8:1,0; серед пацієнтів між 6 і 10 роками частка дівчаток підвищується і відповідає показнику 1,6:1,0. Серед хворих старше 10 років та підлітків переважають представники жіночої статі у співвідношенні від 2,1:1,0 до 3,0:1,0 відповідно [12, 121]. Серед людей віком від 25 до 34 років співвідношення між жінками і чоловіками становить 5,4:1,0 [100]. Періоди менопаузи і постменопаузи характеризуються зниженням частки жінок серед нових хворих. У віці від 50 до 59 років співвідношення жінки/чоловіки дорівнює (1,4–2,1):1,0 [17, 39, 89], а після 60 років складає (0,5–1,6):1,0 [17, 100].

1.1.3 Середовищні фактори ризику розвитку розсіяного склерозу

Вивчення епідеміології РС дозволило виявити асоціацію між ризиком розвитку цього захворювання і деякими чинниками навколишнього середовища. На сьогодні доведено, що у формуванні ризику розвитку РС певну роль відіграють географічна широта, що може бути пов'язано із синтезом вітаміну D та/або поширенням патогенних мікроорганізмів; рівень вітаміну D, отриманий у віці до 15 років; перенесений мононуклеоз, викликаний вірусом Епштейна-Барра (вЕБ); куріння та ожиріння [65, 125]. Найнижчі показники захворюваності фіксуються у тропічних широтах і складають менше 5 випадків на кожні 100000 осіб. Підвищення широти супроводжується ростом захворюваності. У Канаді та країнах північної Європи кількість людей з РС складає більш ніж 100 хворих на кожні 100000 населення [107]. За умов переїзду дітей до 15-річного віку їхній ризик захворіти змінюється і співпадає з ризиком захворювання країни, де вони

мешкають, в той же час під час переїзду у дорослому віці зберігаються ризики країни народження [4, 66, 69]. Зв'язок широти та захворюваності може бути пов'язаний з рівнем вітаміну D, що синтезується в організмі під дією сонячного ультрафіолету [69]. Низький рівень вітаміну D в сироватці асоційований з підвищеним ризиком розвитку РС [113]. В експериментальних дослідженнях було показано, що як високі дози вітаміну D, так і опромінювання ультрафіолетом тварин впродовж експерименту знижували тяжкість перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту. До того ж ультрафіолет не викликав значних змін в рівнях ендogenous вітаміну D і кальцію. R. Becklund та співавтори припускають існування незалежного від синтезу вітаміну D механізму протективної дії ультрафіолетового випромінювання [9].

Про важливість ролі вірусу Епштейна-Барра у захворюваності на РС свідчить той факт, що у ВЕБ-негативних людей у порівнянні з тими, хто був інфікованим на ВЕБ у дитячому віці, ризик захворіти на РС у 15 разів нижчий. Можливо, такий зв'язок є наслідком крос-реактивної реакції антитіл до ВЕБ та протеїнів мієліну [5].

Поєднання дії тих або інших факторів з віком і залежно від статі може збільшити ймовірність розвитку цього захворювання: куріння є більшим фактором ризику для чоловіків [134].

1.1.4 Біологічні фактори ризику розвитку розсіяного склерозу

Схильність щодо розвитку аутоімунних захворювань у жінок може бути пов'язана з наявністю двох статевих X-хромосом. Deborah L. Smith-Bouvier і співавтори в експерименті на фенотипічних самках мишей з генотипами XX і XY⁻ та фенотипічних самцях з генотипом XXSry і XY⁻Sry показали, що підвищена захворюваність на ЕАЕ у самок мишей залежить від наявності двох статевих X-хромосом [135].

У ході епідеміологічних досліджень був виявлений так званий «материнський ефект». Діти хворої матері уражаються РС більш ніж у 3,5

рази частіше, ніж діти хворого батька [74]. Основою цього явища може бути формування схильності щодо РС за рахунок впливів факторів зовнішнього середовища на ембріональний розвиток людини. У північній Європі частка хворих серед тих, хто народився у листопаді була найменшою, а найбільше на РС хворіли ті, хто народився у квітні, що вірогідно було пов'язано з низьким рівнем вітаміну D у матерів, які мали вагітність взимку [69]. Важливо зазначити, що носіями алеля HLADRB1*15, сполученого з більш високим ризиком розвитку РС, частіше виступають жінки, ніж чоловіки, а передача цього алеля більш ймовірна від матері до дочки, ніж від батька до дочки, що, у свою чергу, більш ймовірно, ніж від батька до сина. Вважається, що такий геномний імпринтинг та ефект нерівноважної передачі опосередковані епігенетичними ефектами, які забезпечують прояв материнського ефекту [78]. Voskuhl R. R. і співавтори припускають існування батьківського імпринтингу в якості механізму, що забезпечує більш високу експресію генів, розташованих на материнській X-хромосомі [148].

1.1.5 Генетична та епігенетична схильність до розсіяного склерозу

На початку 1970 р. було вперше показано, що деякі алелі гена людського лейкоцитарного антигену, що знаходиться в регіоні головного комплексу гістосумісності, збільшують ризик розвитку РС у 3 рази [78]. На сьогоднішній день причетними до підвищення ризику розвитку та впливу на перебіг РС вважають алелі більше 200 генів [125]. Сучасний метааналіз зв'язків на рівні широко геномного дослідження (GWAS) показав наявність асоційованих з РС 7-ми окремих локусів, розташованих в головному комплексі гістосумісності [119]. Найбільший вплив на ризик розвитку захворювання має однонуклеотидний поліморфізм, представлений в гаплотипі людського лейкоцитарного антигену (HLA) [65]. Останнім часом великий інтерес у дослідників викликають гени, чий індивідуальний внесок помітно не змінює ймовірність розвитку РС, проте сукупний вплив алелів багаторазово посилюється, якщо вони входять до складу групи генів

(кластерів), кодуєчих білки одного шляху (одного процесу) або тих, що беруть участь в реакціях одного типу [37]. За оцінками С. O'Gorman та співавторів, внесок генетичної спадковості у розвиток РС становить 54 % [112].

Розсіяний склероз у понад 2 рази частіше трапляється у жінок, ніж у чоловіків. Епігенетичні механізми можуть бути причиною змін експресії генів без зміни послідовності нуклеотидів в ДНК. Комбінований вплив генетичної схильності та факторів, що призводять до епігенетичних модифікацій, формують так званий «материнський ефект». Наслідками цього ефекту є підвищена кількість хворих серед тих, хто має родичів з РС за материнською лінією, ніж за лінією батька [72]. Той факт, що захворюваність на РС у дизиготних близнюків вище, ніж для братів та сестер, також передбачає тимчасову дію екологічного чинника ризику або потенційно внутрішньоутробного впливу [112]. Низький рівень конкордантності до РС у монозиготних близнюків (6-30 %) [112] і підвищена передача від матерів алелів з групи ризику свідчать про те, що епігенетичні зміни мають значний вплив на ризик розвитку цього захворювання [78].

Метилування CpG ділянок в ДНК, модифікація гістонів та викликане мікроРНК (mi-RNA) посттранскрипційне мовчання генів – три ключових механізми епігенетичного регулювання. Гіперметилування ускладнює або повністю блокує транскрипцію гена, призводячи до нестачі або повної відсутності кінцевого продукту. Гіпометилування, у свою чергу, призводить до полегшення транскрипції. Епігенетичні зміни можуть бути успадковані нащадками завдяки цитоплазматичній спадковості, сформовані під час внутрішньоутробного розвитку або набуті протягом життя. Важливо відзначити, що чинники навколишнього середовища здатні як викликати, так і модифікувати епігенетичні зміни, забезпечуючи потенційний зв'язок між зовнішніми впливами і успадкованою генетичною системою. Порівняння CD4⁺ Т-клітин здорових людей і хворих на РС дозволило М. С. Graves et al. виявити зв'язок РС з 74 CpGs ділянками, 55 з яких перебувають за межами

регіону ГКГ, розташованого на хромосомі 6p21. Тридцять ділянок CpGs знаходяться в генах, які, як було визначено, мають певне відношення до РС, а 19 з 55 ділянок знаходяться в генах з невідомою функцією [65]. Важливим для розуміння патофізіології РС є те, що гіперметилування CpGs було виявлено в 9 ділянках, що знаходяться в гені α -субодиниці антигенспецифічного Т-клітинного рецептора (TCR α), на двох CpGs ділянках промотору гену інтерлейкіну-32 (IL32) і гену, що кодує регуляторний білок тирозинфосфатазу SHP-1 [65]. Як було показано, деякі алелі цих генів асоційовані з РС [80, 114, 145]. Був виявлений зв'язок РС і зниженого метилування у двох сайтах гену ARSB, залученого в оксидативний стрес, а також асоційованого з атрофією гіпокампу, і два CpGs в гені KCTD11, що бере участь в нейрональному диференціюванні [65].

1.2 Механізми розвитку розсіяного склерозу

1.2.1 Взаємодія нервової та імунної систем в нормі

Особлива будова гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), яка забезпечує вибірккову проникність, відсутність в ЦНС дренуючих лімфатичних вузлів, продукування різними типами клітин нейроімунорегуляторних молекул, відсутність регуляторних молекул, необхідних для довгострокового виживання та належного функціонування Т-клітин забезпечують обмежену імунологічну реактивність і визначають так звану «іммунну привілейованість» ЦНС [3]. Раніше вважалось, що ГЕБ є непереборною перешкодою для проникнення Т-клітин в ЦНС. На сьогодні доказано, що в нормі деяка кількість Т-лімфоцитів долає ГЕБ. Для їхньої активації необхідна презентація антигену за допомогою антигенпрезентуючих клітин, однак в ЦНС такі клітини відсутні. Крім того, в ЦНС спостерігається недостача факторів виживання (інтерлейкін-7, інтерлейкін-15, CCL21), які необхідні для антиген-незалежної гомеостатичної проліферації Т-лімфоцитів. У захисті від індукції імунних реакцій Т-клітинами беруть участь астроцити, клітини глії та

нейрони, які, завдяки продукції Fas-ліганда, викликають апоптоз Т-лімфоцитів [8]. Ефекторна функція Т-лімфоцитів знаходиться під контролем мікроглії [24]. Все це, на думку I. Vechtmann та співавторів, дозволяє в нормі Т-лімфоцитам приймати участь у відновленні гомеостазу нервової тканини при ушкодженнях, але не призводить до їхньої проліферації [8].

1.2.2 Роль Т- і В-лімфоцитів у патогенезі розсіяного склерозу

Велика кількість даних свідчить, що РС викликається аутореактивними CD4⁺ Т-клітинами, активованими в периферійних лімфатичних органах. Наявність таких клітин може бути наслідком як порушення механізмів формування толерантності в тимусі або периферійних органах імунної системи, так і перехресної реакції з бактеріальними антигенами, схожими на антигени мієлінової оболонки. У дослідженнях на моделі РС – ЕАЕ – були визначені основні етапи патогенезу цього захворювання. Індукція ЕАЕ за допомогою білків мієліну або їхніх фрагментів призводить до активації та розмноження аутореактивних CD4⁺ Т-клітин. Незабаром активовані Т-лімфоцити втрачають такі поверхневі протеїни, як CD25 і OX-40, натомість на поверхні фіксуються антигени головного комплексу гістосумісності II та підвищується активність деяких рецепторів, зокрема, CCR1 і CCR-2b. В такому стані Т-лімфоцити набувають здатності долати ГЕБ. В ЦНС відбувається реактивація Т-клітин [55]. Виділення CD4⁺Th1 клітинами прозапальних цитокінів (інтерферону- γ (IFN- γ) і фактора некрозу пухлини- α (TNF- α)) ініціює розвиток ЕАЕ [138]. Імунна атака на такі мішені, як: мієлін-олігодендроцитарний *глікопротеїн* (MOG), основний білок мієліну (MBP), протеоліпідний білок (PLP); такі ліпіди, як: сульфатід та сфінгомієлін [105], призводить до руйнування мієлінової оболонки аксонів. Різноманітність типів перебігу РС залежить від типів клітин і пулу регуляторних протеїнів, що забезпечують патогенетичні механізми розвитку РС. Дозрівання та активація таких клітин, як CD8⁺, В-клітин, а також макрофагів і нейтрофілів, знаходяться під впливом Th клітин [105]. Th1 і Th17 є основними

патогенними популяціями Th клітин при РС. Th17 клітини відіграють важливу роль в патогенезі ЕАЕ завдяки продукції IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-9, IL-22 і TNF- α . Введення антитіл до IL-17 зменшувало тяжкість перебігу ЕАЕ [53].

Однією з експериментальних моделей РС є мишиний енцефаломієліт Тейлера, індукція якого відбувається за допомогою вірусу енцефаломієліту мишей. В цій моделі за пошкодження клітин нервової системи відповідальні CD8⁺ Т-клітини. Їх знаходять і в зонах пошкодження хворих на РС, де вони ініціюють запалення і пошкодження клітин нервової тканини. Однак не виключено, що частина CD8⁺ клітин проявляє регуляторну функцію. На моделі ЕАЕ показано, що ці клітини можуть пригнічувати запалення [83].

Було виявлено, що у пацієнтів з РС Т-клітини, специфічні до основного білка мієліну, резистентні до апоптозу, що викликається Fas-лігандом [158]. Можливо, в розвитку нейродегенеративних захворювань певну роль відіграє дисфункція гліальних клітин [8].

Роль В-клітин в патогенезі РС менш визначена. Вважається, що синтез антитіл є лише однією з форм участі В-клітин в розвитку цього захворювання. Також ці клітини задіяні в механізмах презентації антигенів, секреції про- і протизапальних цитокінів, транспорті антигенів до вторинних лімфоїдних органів. Важливим фактом у підтвердженні ролі В-клітин в РС є те, що використання препаратів, що призводять до зменшення кількості В-лімфоцитів та зниження кількості імуноглобуліну G в ЦНС (наталізумаб), блокування CD20 на поверхні В-клітин (окрелізумаб), лізису деяких фракцій В-лімфоцитів (алемтузумаб, ритуксимаб), у свою чергу, призводить до значного полегшення стану хворих на РС [136].

За експериментальними даними, основними індукторами запального процесу на початковому етапі розвитку захворювання є CD4⁺ Т-клітини. В прогресі захворювання домінуючу роль грають CD8⁺ Т-клітини, В-лімфоцити та плазматичні клітини [94].

1.2.3 Роль запалення

Запалення відіграє настільки значущу роль у патогенезі РС, що значна кількість вчених вважають РС хронічною запальною хворобою ЦНС [82]. При гострому або рецидивуючому РС спостерігається інвазія Т- і В-клітин через пошкоджений ГЕБ і формування локальних скупчень лімфоцитів [82]. Також спостерігається міграція макрофагів до ЦНС [71]. Активовані Th1-клітини продукують IFN- γ , за допомогою якого відбувається перепрограмування мікроглії та макрофагів. Замість виділення протизапального IL-10, клітини починають продукувати такі прозапальні цитокіни, як TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , а також активні форми кисню та нітрогену [20]. У присутності IFN- γ в Th17 клітинах починається синтез IL-23 и IL-17, блокада яких призводить до значного зменшення симптомів ЕАЕ [53,]. Розгортається гострий запальний процес, що призводить до демієлінізації та пошкодження аксонів [82].

У пацієнтів з тривалим перебігом РС спостерігається ще один тип пошкоджень. Повільне збільшення існуючих зон пошкодження білої речовини, субпіяльна коркова демієлінізація та дифузне пошкодження білої та сірої речовин пов'язані з хронічним запальним процесом. При цьому накопичення Т- і В-клітин в просторі оболонок мозку і периваскулярному просторі відбувається повільно, без значного пошкодження ГЕБ. Частково запальний процес проходить за участю мікроглії. Дихальний сплеск активованої мікроглії призводить до прогресуючого пошкодження аксонів та демієлінізації [84]. У літніх людей з тривалим перебігом РС спостерігалось зниження рівня запалення, яке супроводжувалося зниженням рівня поточної нейродегенерації [57].

1.2.4 Значення гематоенцефалічного бар'єру

Унікальна морфологічна будова ГЕБ дозволяє забезпечити мозок необхідними поживними речовинами і в той же час перешкоджає проникненню клітин і високомолекулярних сполук. У організації структури

ГЕБ надзвичайно важливу роль відіграють білки, що утворюють зони щільних з'єднань між сусідніми ендотеліальними клітинами. Різні типи трансмембранних білків і складний набір цитозольних білків зв'язують мембрани з цитоскелетом і регулюють бар'єрну функцію ендотелію. До трансмембранних білків ендотеліальних клітин, які формують зони щільних з'єднань, відносять клаудин-5, окклюдін і деякі сполучні адгезивні молекули [142].

Порушення цілісності ГЕБ та міграція великих молекул та активованих клітин імунної системи у ЦНС є початковою подією РС, що призводить, врешті-решт, до формування осередків ушкодження. Взаємодія експресованих активованими Т-клітинами інтегринів з молекулами адгезії, які присутні на поверхні ендотеліальних клітин ГЕБ, призводить до міграції лімфоцитів в простір ЦНС [46].

Послідовність подій, що розгортаються при РС або ЕАЕ, включає активацію аутоімунних Т-клітин, їхню адгезію до ендотелію кровоносних судин, трансміграцію Т-клітин через ГЕБ, встановлення аутоімунної відповіді в ЦНС, рекрутування запальних клітин до ЦНС та підтримку запалення ЦНС [64]. Порушення бар'єрних якостей ендотелію, викликаних відсутністю трансмембранного протеїну PECAM-1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) у нокаутних мишей, призводить до більш раннього прояву клінічних симптомів та збільшення часу, що потрібний для відновлення структури зон щільних з'єднань [64].

Експериментальне дослідження показало, що зв'язування антитіл з $\alpha 4$ -інтегрінами, поверхневими білками клітин ендотелію, блокувало шлях, за допомогою якого активовані лімфоцити і моноцити потрапляли в ЦНС [155]. Використання антитіл не тільки до $\alpha 4$ -інтегрину, але й до VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) попереджувало або значно зменшувало розвиток ЕАЕ [47].

При РС описані два типи порушень структури ГЕБ. Перший – інтенсивне руйнування, пов'язане із запаленням, спостерігається на МРТ в

зонах пошкодження в гостру і хронічну фази РС. Другий – великі дифузні порушення, що виявляються при довготривалій патологічній активності низької інтенсивності. Обидва типи пошкоджень пов'язані з порушенням будови зони щільних з'єднань. Патологічні ураження зон щільних з'єднань зустрічаються в однаковій мірі як у пацієнтів з РС, так і у тварин з ЕАЕ [13]. Аномалії будови ендотелію судин, що складають ГЕБ, в найбільшій мірі спостерігаються в зонах активного ураження мозку хворих на РС. Порушення охоплюють судини всіх розмірів та являються причиною витоку фібриногену. Дещо менше пошкоджених зон щільних з'єднань виявляється в ділянках неактивних уражень і зонах з неураженою сірою речовиною мозку [103].

Відновлення структури ендотелію, зниження проникності ГЕБ і блокування міграції лімфоцитів до ЦНС є одним із завдань лікування РС. Так, Наталізумаб, гуманізоване рекомбінантне моноклональне антитіло до $\alpha 4$ -інтегрину, не дозволяє лімфоцитам зв'язуватися з VCAM-1 і потрапляти до ЦНС, що зменшує кількість рецидивів на 30 % [106]. А одним з ефектів лікування як синтетичними глюкокортикоїдами, так і інтерфероном β -1b, є зменшення проникності ГЕБ за рахунок пригнічення експресії молекул адгезії та інгібіції секреції прозапальних цитокінів, матриксних металопротеїназ [128].

1.2.5 Демієлінізація та ремієлінізація при розсіяному склерозі

Claudia Lucchinett та співавтори за допомогою імуногістохімічних методів описали чотири основних типи зон ураження, які відрізнялися розташуванням та типом клітин, що викликали запалення, вмістом імуноглобулінів та антигену комплекменту C9neo, рівнем ремієлінізації та апоптозом олігодендроцитів. Ймовірно, формування зон першого типу відбувалося в результаті дії фактору некрозу пухлини, який виділявся макрофагами. Формування другого типу було пов'язане з дією антитіл. Розташування бляшок третього типу не було пов'язане з венами і венулами.

Особливістю цього патерну була присутність ознак дистрофії олігодендроцитів (відсутність мієлін-асоційованого глобуліну, в той час як інші білки були присутні у частково пошкодженій мієліновій оболонці, та відсутність ремієлінізації). Четвертий тип зустрічався тільки у пацієнтів з первинно-прогресуючим РС і характеризувався як активним запальним процесом, так і руйнуванням олігодендроцитів [92].

1.3 Гормони у розвитку розсіяного склерозу

1.3.1 Роль статевих гормонів

Статеві гормони мають значний вплив на ризик захворюваності та перебіг РС. Поєднання віку та статі, а також вагітність вносять свій вклад у формування характеристик перебігу цього аутоімунного захворювання.

Розсіяний склероз поражає жінок приблизно в 3 рази частіше за чоловіків [17, 87, 115, 153]. Не лише захворюваність, але й перебіг цієї хвороби у чоловіків та жінок має деякі відмінності. Так, у чоловіків частіше спостерігається первинно-прогресивний перебіг, є найгірший прогноз перебігу та більш виражене пошкодження мозочка [1].

У період вагітності відбуваються найбільш значні зміни рівня естрогену та прогестерону (Prog). У порівнянні з перебігом РС протягом року, що передуює вагітності, частота рецидивів у хворих жінок в період вагітності знижується, досягаючи найменших значень в третьому триместрі, а в перші три місяці після пологів значно збільшується [29, 52]. Разом з тим, моніторинг стану хворих на РС жінок за один рік до вагітності, протягом вагітності та в період двох років після пологів за допомогою шкали оцінки ступеню інвалідизації Disability Status Scale (DSS) показав поступове наростання рівня інвалідизації [29]. Дослідження впливу вагітності на перебіг ЕАЕ у мишей, щурів, кроликів і морських свинок показали, що за умов індукції захворювання на різних термінах вагітності рівень захворюваності був нижчим, а латентний період довший у порівнянні з перебігом цього

захворювання при його індукції у післяпологовому періоді [102]. Одним з механізмів, що модифікують перебіг ЕАЕ в період вагітності, є зміна пулу Т-клітин під дією високих доз прогестерону. Виявилося, що прогестерон викликав апоптоз у $CD4^{+}$ клітин і «збагачення» Т-регуляторних клітин. Ці ефекти прогестерон викликав через вплив на глюкокортикоїдні рецептори (ГКР), а не через рецептори до прогестерону [48].

Дослідження ролі естрогенів та їх рецепторів (рецепторів до естрогену- α і рецепторів до естрогену- β) при ЕАЕ у мишей виявило, що активація рецепторів до естрогену- α призводила до зниження рівня запалення в ЦНС. Протизапальні ефекти забезпечувалися значним зниженням рівня прозапальних цитокінів TNF- α , IFN- α та IL-6, підвищенням продукції протизапального цитокіну IL-5, а також блокадою збільшення кількості CD45 в білому і сірому речовинах мозку. Крім того, активація рецепторів до естрогену- α знижувала демієлінізацію, зменшувала втрату аксонів і патологію нейронів при ЕАЕ. Активація рецепторів до естрогену- β призводила до підтримки пізньої нейропротекції: знижувала демієлінізацію і зменшувала втрату аксонів [141].

Протизапальні та нейропротективні ефекти статевих гормонів визначають можливість їхнього використання в лікуванні РС. Протягом другої фази клінічних випробувань комбінованої терапії естріол + глатимер ацетат спостерігалось зниження частоти рецидивів без збільшення частки пацієнтів із серйозними побічними ефектами у порівнянні з монотерапією глатимер ацетатом [149].

1.3.2 Роль глюкокортикоїдних гормонів та їх вторинного месенжера анексину A-1

Важливу роль у підтримці гомеостазу відіграє гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова система. Глюкокортикоїди, що виділяються наднирковими залозами у відповідь на активацію ГГА осі, впливають на клітини різних типів завдяки експресії в них глюкокортикоїдних рецепторів. Через

різноманітні механізми глюкокортикоїди пригнічують велику кількість прозапальних і стимулюють виділення протизапальних цитокінів [56]. Зокрема, вони інгібують вивільнення цистеїн-цистеїн-хемокінів (СС-хемокіни), що виділяються клітинами бронхіального епітелію. СС-хемокіни підсилюють в ендотеліальних клітинах експресію молекул адгезії, які, зв'язуючись з відповідними рецепторами на поверхні еозинофілів, базофілів і Th2 клітин, дозволяють їм переміститися через стінку судини. Глюкокортикоїди пригнічують трансміграцію нейтрофілів, стимулюючи скидання нейтрофілами молекул адгезії, зокрема, L-селектину. Також вони інгібують експресію L-селектину в прогеніторних клітинах кісткового мозку і нейтрофілах, що диференціюються [56].

Активація ГГА осі є одним з важливих елементів контролю організму за підтриманням гомеостазу за умови запалення та аутоімунних реакцій. Порушення активності ГГА осі зазвичай спостерігається в клініці в широкому діапазоні аутоімунних і запальних захворювань. Резистентність щурів лінії BN щодо індукції ЕАЕ зумовлена високим рівнем циркулюючих глюкокортикоїдів. Введення тваринам антагоніста глюкокортикоїдів призводило до розвитку захворювання [120]. Адреналектомія призводила до розвитку ЕАЕ і загибелі щурів іншої резистентної лінії – PVG [98]. Чутливі до розвитку ЕАЕ щури лінії Levis мають низький рівень базального циркулюючого кортикостерону в порівнянні з щурами резистентних ліній PVG і BN [15]. Мимовільне одужання тварин цієї лінії залежить від вироблення ними високого рівня глюкокортикоїдів під час розвитку захворювання. З 9 дня після імунізації, тобто до перших проявів моторних порушень, у інтактних тварин спостерігається підвищення секреції ендогенних глюкокортикоїдів, які досягають максимуму в день найвищих показників рухових порушень. Якщо щурам лінії Levis видалити надниркові залози перед індукцією ЕАЕ, то хвороба виявляється смертельною. Попередити їхню загибель може замісна терапія на синтетичні глюкокортикоїди. Режим введення екзогенних глюкокортикоїдів має

визначальний вплив на виживання тварин. Ведення адреналектамованим щурам лінії Levis на 9 день після імунізації пелети з кортикостероном в дозі, що відповідає ендogenous рівню на піку захворювання, призводить до найлегшого перебігу ЕАЕ. Якщо пелета вводилася щурам у день, коли показники порушень дорівнювали або були більше 1 балу, хвороба мала більш тяжкий перебіг та спостерігалася загибель частини тварин [96]. У дослідженнях *in vitro* введення ліпополісахариду до складної культури клітин, яка складається з ендотеліальних клітин ГЕБ і астроцитів, призводило до зниження трансендотеліальної електричної резистентності (до підвищення проникності). Додавання до такої культури клітин дексаметазону призводило до дозо-залежного відновлення бар'єрних властивостей моделі ГЕБ. Причому ефект дексаметазону на монокультуру ендотеліальних клітин був значно нижчим [38].

У понад половини хворих з різними типами перебігу РС спостерігалася активація ГГА осі з одночасним зниженням афінності тканинних рецепторів до глюкокортикоїдів. Така зміна чутливості до глюкокортикоїдів супроводжувалася підвищенням продукції IL-1 β , IL-6, IFN- γ і TNF- α [156]. У резистентних до глюкокортикоїдів пацієнтів спостерігалася підвищені проліферація мононуклеарних клітин та рівень IL-2 у порівнянні з чутливими до глюкокортикоїдів хворими [99]. У ході досліджень перебігу ЕАЕ у мишей лінії C57BL/6 була виявлена динамічна зміна чутливості до дексаметазону. Найбільша резистентність спленоцитів до антипроліферативного ефекту глюкокортикоїдів відзначалася на піку захворювання (15 день), а відновлення чутливості – на 21 день після імунізації. До того ж, чим вище рівень резистентності, тим тяжчий перебіг ЕАЕ у щурів. Два типи Т-клітин, неспецифічно активовані та активовані MOG 35-55, мали схожу динаміку чутливості до глюкокортикоїдів. Резистентність до інгібуючих ефектів глюкокортикоїдів спостерігалася, починаючи з 9 дня, і мала максимальні значення на 12 і 15 дні після імунізації. MOG-активовані Т-клітини набували резистентності щодо впливу глюкокортикоїдів до дня перших проявів

моторних порушень у мишей, хворих на ЕАЕ (13 день після імунізації). Зниження на 50 % рівня експресії м-РНК глюкокортикоїдного рецептору α на 15 день після імунізації спостерігалось в $CD4^{+}$ і $CD8^{+}$ Т-клітин, але не в інших типів імунних клітин [61].

Більшість ефектів кортикостерону опосередковується його вторинним месенджером анексином А1. Вплив глюкокортикоїдів на рівень АНА1 залежить від типу клітин. Так, інкубація Т-клітин з дексаметазоном призводить до зниження рівня м-РНК АНА1 та експресії самого АНА1 [123]. Гістохімічне фарбування виявило присутність АНА1 в нейронах гіпокампу, астроцитах і клітинах мікроглії щурів, які попередньо отримали метилпреднізолон [59]. Через АНА1 глюкокортикоїди здійснюють контроль над міграцією клітин, зростанням і диференціацією клітин, апоптозом, злиттям везикул, ліпідним обміном та експресією цитокінів, а також над забезпеченням регуляції активності ГГА осі по типу зворотного зв'язку [21, 123]. Важливою функцією АНА1 є підтримка цілісності ГЕБ. У нокаутних по АНА1 мишей (АНА1^{-/-} мишей) виявлено значні порушення в розподілі білків окклюдіна (occludin) і судинно-ендотеліального кадхерину (VE-cadherin), які грають важливу роль у формуванні зон щільних зв'язків між клітинами ендотелію, а також у формуванні та стабільності актинового цитоскелету епітеліальних клітин [33]. За допомогою методів гістохімії було виявлено різке зниження/відсутність експресії АНА1 в клітинах цереброваскулярного ендотелію у пацієнтів з РС, але не у пацієнтів із хворобою Паркінсона. Також у хворих на РС значно нижчий рівень АНА1 у плазмі крові, ніж у здорових людей. Обробка *in vitro* лінії цереброваскулярних ендотеліальних клітин людини hCMEC/D3 рекомбінантним АНА1 відновлювала клітинну полярність, цілісність цитоскелету і парацелюлярну проникність [33]. Інтрацеребровентрикулярне (у шлуночки мозку) введення АНА1 протягом латентного періоду щурам, імунізованим на ЕАЕ, знижувало кількість тварин з клінічними проявами, тяжкість перебігу і тривалість проявів захворювання [76]. У дослідженнях *in vitro* додавання до культури ендотеліальної клітини

лише сироватки крові хворих на РС призводило до зниження рівня АНА1 на 72 % у порівнянні з контрольними зразками. Дослідження механізму дії інтерферону $\beta 1b$, рекомендованого для лікування РС, показало, що введення сироватки хворих на РС та інтерферону $\beta 1b$ в культуру клітин ендотелію призводило до незначного зниження рівня АНА1, який виявився лише на 12 % меншим, ніж в контрольних зразках [2].

Під час визначення ролі ендогенної глюкокортикоїдної системи і АНА1 надзвичайно важливо враховувати той факт, що ефект дії глюкокортикоїдів залежить від проміжку часу після початку захворювання і типу досліджуваних клітин. Так, N. Paschalidis та співавтори реєстрували у мишей АНА1^{-/-} на пізній стадії захворювання на ЕАЕ (18-й день та пізніше після індукції) меншу кількість макрофагів в ЦНС, а також більш низький рівень цитокінів IFN- γ , IL-2, і TNF- α , виділених Th1 клітинами, і IL-17, виділених Th17 клітинами, ніж у мишей дикого типу. Крім того, у порівнянні з мишами дикого типу, індукція ЕАЕ у нокаутних по АНА1 мишей призводила до меншої виразності клінічних ознак та зменшення смертності без зміни рівня захворюваності, що супроводжувалося зниженням інфільтрації Т-клітин в спинний мозок. У дослідженнях *in vitro* після стимуляції MOG35-55 АНА1^{-/-} Т-клітини показали зниження проліферації зі значно зменшеним фенотипом Th1/Th17 у порівнянні з клітинами дикого типу [118].

Активаторами глюкокортикоїдних рецепторів можуть виступати й інші стероїдні гормони. Показано, що протективний вплив вагітності на перебіг ЕАЕ забезпечується, зокрема, прогестероном, який, діючи на Т-клітини через глюкокортикоїдні рецептори, викликає апоптоз CD4⁺ клітин і збільшення числа Т-регуляторних клітин [48].

1.3.3 Пренатальний стрес як фактор зміни рецептивної чутливості щодо статевих і глюкокортикоїдних гормонів

Хронічний неunikний стрес, який зазнає організм в ембріональний період розвитку, є потужним фактором, що викликає епігенетичні

модифікації геному і, як наслідок, призводить до зміни активності експресії різних генів. Основними кандидатами в опосередкуванні ефектів пренатального стресу у плода є материнські глюкокортикоїди. За нормальних умов перебігу вагітності плацентарний фермент 11 β -гідроксистероїддегідрогеназа 2 типу (11-HSD2) метаболізує значну частину материнських глюкокортикоїдів. Однак, вплив материнських глюкокортикоїдів на плід може бути значним при їх високому рівні або пригніченій активності 11-HSD2 [11, 97]. Підвищення рівня глюкокортикоїдів у вагітних самок викликає у потомства уповільнення зростання таких показників, як: ріст/розмір/розвиток, зміни поведінки, дисрегуляцію ГГА осі та непереносимість глюкози [11].

Дія неunikного стресу на самку в III триместрі вагітності призводила до зменшення ваги плоду при народженні. У дорослих нащадків самців щурів виявлено збільшення вивільнення ацетилхоліну в гіпокампі у відповідь на м'який стрес. Пренатальний стрес порушує контроль глюкокортикоїдів за ГГА по типу негативного зворотного зв'язку. Цей ефект опосередковується зменшенням експресії кортикостероїдних рецепторів у гіпокампі [146]. У пренатально стресованого потомства на 21 день постнатального розвитку показано скорочення на 70 % кількості мінералокортикоїдних та зниження на 30 % глюкокортикоїдних рецепторів у гіпокампі. Це викликало зміни регуляції негативного зворотного зв'язку, що призводило до більш високої базальної секреції кортикотропін-релізінг-гормону і кортикостерону [45], підвищувало рівень прогестерону у пренатально стресованих самців [19]. Стресування адреналектомованих матерів, яким вводили кортикостерон у дозі, що відповідає стану спокою, не призводило до значних змін показників у порівнянні з групою контролю, тоді як введення інтактним матерям кортикостерону в кількостях, які спостерігаються під час стресу, порушувало у їхніх нащадків функціонування ГГА системи, кількість рецепторів до кортикостерону I типу в гіпокампі [6]. Таким чином, підвищення рівня кортикостерону, яке супроводжувало неабортівну інфекцію у вагітних

самок, призводило до зниження рівня мінералокортикоїдних і глюкокортикоїдних рецепторів у гіпокампі та порушення функціонування ГГА осі у дорослих нащадків-самців [126].

1.4 Експериментальні моделі розсіяного склерозу

Велике значення в дослідженні РС та вивченні його вікових та статевих особливостей перебігу має експериментальне моделювання хвороби за умов *in vitro* та *in vivo*. На сьогодні існує широкий спектр експериментальних моделей для вивчення окремих аспектів патогенезу РС.

Найпоширенішою моделлю є ЕАЕ, який може бути викликаний у лабораторних тварин або активною імунізацією антигеном (активна імунізація), або введенням сенсibilізованих Т-клітин (пасивна імунізація). Дослідження проводяться на морських свинках, кроликах, козах, мишах, щурах, хом'яках, собаках, вівцях, мавпах, курчатах [7] і навіть на рибках *Daniorerio* [22].

Розвиток ЕАЕ у щурів має деякі особливості. Перебіг захворювання нагадує рецидивуючо-ремітуючий РС. У тварин породи Lewis зони запалення спинного мозку, які спостерігаються в гостру фазу, викликають моторні порушення. Зони демієлінізації, які є характерними ознаками ураження спинного і головного мозку при РС, у щурів відсутні [34]. Спостерігається пошкодження ГЕБ, яке відіграє значну роль у проникненні в ЦНС периферійно активованих лімфоцитів [42]. Після гострої фази захворювання відзначається мимовільне одужання. Таким чином, моделювання ЕАЕ на щурах дозволяє дослідити нейрозапалення, що викликається активованими Т-клітинами [34]. У мишей, в залежності від лінії, індукція ЕАЕ викликає демієлінізацію у спинному мозку, локальне пошкодження аксонів, загибель нейронів та гліоз. На відміну від щурів, миші демонструють часткове одужання [22]. Також моделювання РС за допомогою ЕАЕ дозволяє вивчати статеві відмінності у захворюваності та перебігу цього захворювання. Серед

самок щурів лінії Dark Agouti захворюваність на ЕАЕ вище, ніж серед самців. Однак у хворих самців спостерігається більш високий рівень неврологічного дефіциту. Такий перебіг захворювання у самців супроводжується підвищеною кількістю Т-клітин з $IL-17^+IFN-\gamma^+$ -субпопуляції. Ці клітини мають підвищену здатність пошкоджувати тканини [110]. Перебіг ЕАЕ у щурів різного віку також відрізняється. Кількість мононуклеарних клітин і Т-лімфоцитів, виділених зі спинного мозку імунованих 26-місячних щурів лінії Dark Agouti, була нижчою, ніж у 3-місячних тварин. У старих щурів відзначалося зниження експресії цитокінів та підвищений рівень апоптозу $CD4^+$ клітин [43].

Для активної імунізації тварин на ЕАЕ в ролі антигену використовують або імуногенні фрагменти, або цілі білки, що входять до складу мієлінової оболонки, такі як: мієлін-асоційований глобулін, основний білок мієліну, протеоліпідний білок, а також гомогенат спинного мозку, який може бути або алогенним, або ксеногенним. Збільшення рівня захворюваності та показників тяжкості перебігу досягається додатковим введенням ад'ювантів, таких як: коклюшний токсин (Pertussis toxin) і повний ад'ювант Фрейнда [85]. Під впливом коклюшного токсину судини стають більш чутливими до вазоактивних амінів та підвищується їхня проникність у тканинах мозку, що сприяє розвитку ЕАЕ [88]. У дослідженнях з використанням трансгенних ліній мишей показано, що введення лише коклюшного токсину призводить до розвитку специфічної аутоімунної відповіді до основного білка мієліну [63]. Повний ад'ювант Фрейнда є сумішшю вбитих мікобактерій, частіше *Mycobacterium tuberculosis*, та водно-масляної емульсії. Введення енцефалітогенної суміші з повним ад'ювантом Фрейнда призводить до розвитку ЕАЕ вже після однократної імунізації, а перебіг захворювання характеризується коротким латентним періодом [122]. *M. tuberculosis*, що входить до складу повного ад'юванта Фрейнда, викликає імунологічну відповідь, яка є основною причиною порушення цілісності ГЕБ [111]. Використання ад'юванта забезпечує стійкість антигену та індукує переважно

клітинну імунну реакцію за рахунок підвищення в антигенпрезентуючих клітинах експресії генів головного комплексу гістосумісності і цитокінів IL-1 та IL-12 [85]. Негативним ефектом від використання повного ад'юванта Фрейнда є те, що він викликає неспецифічну резистентність щодо реіндукції ЕАЕ [137].

На сьогоднішній день більша частина досліджень проводиться на мишах. Для вивчення різних типів перебігу цього захворювання використовують, зокрема, мишей ліній SJL/J, BALB/c, C57BL/6, ABH, PL/J, B10.PL, C3H/HeJ [140]. Окремі аспекти патогенезу досліджуються за допомогою великої кількості трансгенних ліній, наприклад, мишей ліній C57BL/6HLA-DR15/TCR tg, B10.PL/TCR tg [140]. Серед щурів чутливими щодо розвитку ЕАЕ є породи *Lewis* та *Dark Agouti* [31]. Причому у щурів лінії *Dark Agouti* розвиток ЕАЕ відбувається після введення суміші енцефалітогену і неповного ад'юванта Фрейнда, в той час, як у інших чутливих ліній щурів індукція цього захворювання можлива лише за умов використання антигенної емульсії в повному ад'юванті Фрейнда [93]. Деякі лінії щурів є резистентними до індукції цього захворювання, наприклад, лінії PVG і Brown Norway (BN) [41]. Існує проблема відмінності між патогенезом ЕАЕ у тварин, які не належать до приматів, та перебігом РС у людини. Деякі методи лікування, що дали хороші результати в експериментах на мишах, були неефективними або ж мали дуже серйозні побічні ефекти в клінічних дослідженнях [60, 70]. Зменшення рівня міжвидових розбіжностей в механізмах розвитку аутоімунної демієлінізуючої патології досягається при використанні в якості лабораторних тварин нелюдиноподібних приматів (макака резус *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, ігрунка звичайна *Callithrix jacchus*) [70]. Проте в наш час такі дослідження є вкрай рідкісними з етичних та фінансових міркувань.

Дослідження найрізноманітніших аспектів патогенезу РС потребує моделювання різних типів перебігу ЕАЕ (монофазного, рецидивуючо-ремітуючого і хронічно-прогресивного), які досягаються комбінацією та

режимом введення типу антигену, коклюшного токсину, ад'юванта Фрейнда і лінії тварин [101]. Рецидивуючо-ремітуючий тип захворювання викликають у мишей лінії SJL/J при використанні цілого протеоліпідного білка чи одного з п'яти його імуногенних фрагментів (PLP₅₇₋₇₀, PLP₁₀₄₋₁₁₇, PLP₁₃₉₋₁₅₁, PLP₁₇₈₋₁₉₁, PLP₁₈₀₋₁₉₉), також для імунізації використовують повний основний білок мієліну або його фрагменти 84-104 чи то 89-101 [140]. Хронічний перебіг ЕАЕ моделюється у мишей ліній BALB/c із застосуванням як цілого протеоліпідного протеїну, так і його фрагменту 180-199 (PLP₁₈₀₋₁₉₉). Імунізація мишей лінії C57BL/6 за допомогою як фрагментів 178-191 чи 180-199 протеоліпідного протеїну, так і при використанні в якості антигену фрагменту 35-55 мієлін-олігодендроцитарного глікопротеїну також призводить до хронічного перебігу ЕАЕ [140]. Перебіг, схожий на вторинно-прогресуючий РС, спостерігається у мишей лінії Biozzi ABH, імунізованих гомогенатом спинного мозку, і мишей лінії NOD після введення фрагменту MOG₃₅₋₅₅ [133].

Пасивна імунізація побудована на виділенні у імунізованих донорів Th1 або Th17 клітин та їх перенесенні «наївним» сінгенним реципієнтам. Такий підхід дозволяє оцінити роль окремих субпопуляцій імунних клітин в патогенезі ЕАЕ [101].

Спонтанний ЕАЕ спостерігається у створених ліній мишей, які експресують мієлінспецифічні трансгенні Т-клітинні рецептори [63, 133]. Спонтанний розвиток захворювання, дуже подібного до РС, відзначається серед японських макак (*Macaca fuscata*), що утримуються в Орегонському національному центрі дослідження приматів [14].

Також індукція демієлінізуючого захворювання можлива за допомогою введення тваринам вірусу енцефаломієліту мишей (Theiler's Murine Encephalitis Virus-Induced Demyelinating Disease (TMEV-IDD)). Залежно від штаму вірусу та лінії мишей можна досягти різного перебігу захворювання. Високо вірулентні штами призводять до розвитку фатального енцефаломієліту. Зараження менш вірулентним штамом BeAn і Daniel's

TMEV чутливих до цієї інфекції ліній мишей (SJL/J) призводить до розвитку хронічно-прогресуючого демієлінізуючого захворювання. Цей варіант моделі характеризується наявністю зон демієлінізації та пошкодженням аксонів у спинному мозку [40].

Введення таких токсинів, як: купрізон, етидіум бромід або лізолецитин, також викликає демієлінізуюче захворювання. Ця модель використовується для вивчення процесів осередкової демієлінізації та ремієлінізації, які не пов'язані з імунною відповіддю. Комбінація способу введення токсину, а саме, пероральний або транскраніальний, різним видам лабораторних тварин (мишам, щурам, морським свинкам) дозволяє створювати різні модифікації цієї моделі [40].

Висновки до розділу 1

1. Розсіяний склероз характеризується хронічним перебігом, в механізмах якого провідна роль належить нейрозапаленню та демієлінізації нервових волокон. Незважаючи на довгу історію його вивчення, доводиться визнати, що причини розвитку і багато аспектів патогенезу цього захворювання все ще залишаються не з'ясованими. Одним з аспектів, що визначають труднощі вивчення розсіяного склерозу є значна гетерогенність перебігу.

2. Пошук нових факторів, що впливають на ризик розвитку та перебіг розсіяного склерозу, залишається важливим завданням, що сприяє розробці нових превентивних стратегій та визначенню можливих цілей для створення персоналізованих методів лікування. На наш погляд, пренатальний стрес, що діє на плід в третьому триместрі вагітності, через зміни активності гіпоталамо-гіпофізарно-адrenalової осі, які пов'язані зі змінами експресії генів рецепторів до глюкокортикоїдів, а також зміною кількості статевих гормонів у дорослих тварин, може бути одним з факторів, що впливає на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту в щурів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Організація експериментальних досліджень

Дослідження проводилися в атестованій лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії (далі – лабораторія) Державної установи «Інститут неврології, психіатрії та наркології Національної академії медичних наук України» (свідоцтво про атестацію № 100-124/2014 від 03.07.2014 р., чинне до 02.07.2018 р., видане Державним підприємством «Харківстандартметрологія»). Свідоцтво засвідчує, що лабораторія атестована на підставі Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність», відповідає критеріям атестації вимірювальних лабораторій відповідно Правил уповноваження та атестації у державній метрологічній системі. Лабораторія атестована на проведення вимірювання показників об'єктів згідно з галуззю, що зазначена в додатках до свідоцтва та є невід'ємною його складовою частиною.

Усі процедури з експериментальними тваринами схвалені Комісією з питань етики та деонтології ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології Національної академії медичних наук України» та виконані згідно з «Порядком проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (№ 249 від 01.03.2012) [172] і Законом України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) [168].

2.2 Експериментальні тварини

Дослідження проведено в хронічному експерименті на статевозрілих щурах обох статей. Батьківську групу склали 44 тварини (32 самок та 12 самців). Їхнє потомство, тварини першого і другого послідів, складалося з 129 самок і 135 самця. Батьківські групи – тварини, взяті з популяції, що

утримувалася за умов віварію ДУ ІНПН НАМН України. Батьківську групу склали статевозрілі самки, які не раніше ніж за 45 днів до вагітності були імунізовані енцефалітогенною сумішшю (індукція ЕАЕ), а в третьому триместрі вагітності піддавалися дії неunikного стресу.

2.3 Індукція експериментального аутоімунного енцефаломієліту

Для приготування алогенного гомогенату спинного мозку використовували нервову тканину здорових тварин. Після декапітації у щурів вилучали спинний мозок і стовбур головного мозку і поміщали в охолоджений до температури від +2 до +4⁰С фізіологічний розчин. Мозок очищали від сполучнотканинних оболонок і судин. Невеликі фрагменти мозкової тканини зважували і гомогенізували в скляних гомогенізаторах разом з фізіологічним розчином у співвідношенні 1:2. Гомогенат нервової тканини витримували 1 годину при +4⁰С, потім центрифугували протягом 15 хв при 3000 обертів/хв. Видаляли надосадову рідину. До гомогенату нервової тканини додавали повний ад'ювант Фрейнда («Sigma-Aldrich», США) у співвідношенні на кожні 60 мг вихідної тканини спинного мозку – 100 мкл повного ад'юванту Фрейнда. Індукція ЕАЕ проводилася шляхом одноразового введення енцефалітогенної суміші в подушечки задніх кінцівок в дозі 0,06 г гомогенату спинного мозку і 0,1 мл повного ад'юванту Фрейнда на 100 г маси тварини. День інокуляції антигену вважався нульовим днем експерименту. Спостереження за перебігом ЕАЕ здійснювалося протягом 30 діб (в одному дослідженні – 20 діб).

Імунізація проводилася у тварин трьох вікових груп. Вибір віку імунізації проводився за допомогою коефіцієнтів, що були отримані в результаті порівняння морфометричних даних становлення систем органів в пренатальному і постнатальному періодах онтогенезу людини і лабораторного щура. Перша вікова група складалася з тварин віком 13 тижнів. Цей вік відповідає пубертатному періоду розвитку і

співвідноситься з 13 роками людини. Друга вікова група – щури віком від 18 до 21 тижня. Цей вік відповідає 18-21 року розвитку людини і визначається як молодий вік. До третьої вікової групи увійшли тварини віком від 29 до 35 тижнів. Цей вік відноситься до статевозрілого або дорослого віку і співпадає з 29-35 роками людини [166].

Для дослідження впливу епізоду експериментального аутоімунного енцефаломієліту, який співпадає з вагітністю матерів на, захворюваність та перебіг ЕАЕ у нащадків, ЕАЕ індукували у самок в період вагітності.

2.4 Тестування неврологічних порушень при експериментальному аутоімунному енцефаломієліті

Тестування неврологічних порушень у тварин проводили щодня за допомогою Шкали неврологічних порушень, яка була модифікована для більш детального опису динаміки захворювання [176]. Рівень викликаних ЕАЕ неврологічних порушень оцінювався в балах (клінічний індекс, КІ): 0 – відсутність неврологічних порушень; 0.5 – гіпертонус хвоста або хвіст в тонусі частково, кінчик хвоста висить; 1.0 – параліч хвоста, рухи активні, щур стає в стійку без опори; 1.5 – параліч хвоста, слабо виражені парези кінцівок, рухи активні, щур стоїть в стійці тільки з опорою; 2.0 – парези однієї або двох кінцівок, виражені порушення ходи; 2.5 – тетрапарез, сильна хиткість при ходьбі, може періодично не утримувати рівновагу і завалюватись або задня частина тіла притиснута до підлоги; 3.0 – активне пересування на передніх кінцівках, задні кінцівки висять, але ще роблять невеликі рухи; 3.5 – параліч задніх кінцівок, помірне пересування на передніх кінцівках; 4.0 – параліч задніх кінцівок, парапарез передніх кінцівок, пересувається насилу; 4.5 – параліч задніх кінцівок, парапарез передніх кінцівок, пересувається насилу, порушення функції сфінктера сечового міхура; 5.0 – тетрапараліч, лежить на боці, не рухається, відсутність інтересу до їжі, п'є воду (якщо стан не змінюється протягом 2-х днів, тварині

проводять евтаназію); 5.5 – парапараліч, лежить на боці, необхідно поїти (якщо стан не змінюється протягом 1-го дня, тварині проводять евтаназію); 6.0 – щур виявлений мертвим або проведена евтаназія. Якщо стан тварини оцінюється як проміжний між сусідніми балами, додається 0,25 балів до нижнього значення. Початком захворювання вважається стан, який відповідає рівню рухових порушень не менш ніж 0,5 балів КІ [176].

2.5 Показники перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту

Для оцінки перебігу ЕАЕ використовуються показники тривалості окремих етапів: ЛП (латентний період) – час від дня імунізації до дня, що передує першим проявам захворювання, одиниця вимірювання «день»; $T_{0-макс}$ – час від імунізації до дня з максимальним показником моторної дисфункції, одиниця вимірювання «день»; $T_{п-макс}$ – час від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції, одиниця вимірювання «день»; $T_{ki \geq 2}$ – кількість днів хвороби, коли рівень рухових порушень дорівнює або більше 2 балів КІ, одиниця вимірювання «день»; $T_{хв}$ (тривалість захворювання) – кількість днів, коли фіксуються моторні порушення, одиниця вимірювання «день». Також для оцінки ЕАЕ використовуються показники тяжкості перебігу ЕАЕ: $KI_{cp.xv}$ – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби, одиниця вимірювання «бали Клінічного Індексу»; $KI_{макс}$ – максимальний рівень рухових порушень, який спостерігався, одиниця вимірювання «бали Клінічного Індексу»; $KI_{сум}$ – сума показників рухових порушень за весь період спостережень.

2.6 Визначення стадії естрального циклу

Визначення стадії естрального циклу здійснювали шляхом мікроскопічного дослідження вагінальних мазків з використанням

мікроскопу «Біолам». Цитологічна картина вагінальних мазків фази еструсу характеризувалася наявністю без'ядерних епітеліоцитів. У період метеструсу у мазку переважали клітини проміжних епітеліоцитів, також спостерігалися поодинокі без'ядерні епітеліоцити і лейкоцити. Фазі діеструсу відповідала морфологічна картина, що складалася зі значної кількості лейкоцитів та скупчень проміжних епітеліоцитів. У фазі проеструсу у вагінальному мазку спостерігалися проміжні та поверхневі та поодинокі парабазальні епітеліоцити [169].

2.7 Спарювання тварин з батьківської групи і визначення вагітності

Перше спарювання проводилося не менш ніж за 50 днів після імунізації тварин з батьківської групи. Для спарювання у клітці розміщали одного самця з 2-3 самками. Настання вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у вагінальних мазках [169] за допомогою мікроскопа «Біолам». Вагінальні мазки робили раз на день з 9⁰⁰ до 10⁰⁰ години. Друге спарювання – не менш ніж за 60 днів після закінчення періоду молочного вигодовування щурят.

2.8 Моделювання пренатального стресу

На 15-й день вагітності самок розміщували в індивідуальні клітки і до пологів тримали в умовах цілодобової освітленості. Три рази на день (о 9⁰⁰, 12⁰⁰ і 17⁰⁰ годині) самок поміщали на 45 хв в імобілізаційні циліндри (довжиною – 15 см, висотою – 7 см). Доступ до їжі та води не обмежувався [6]. Період молочного вигодовування складав 21 день, після чого дитинчат відсаджували від самок-матерів в окремі клітки, сформувавши групи по 10-15 тварин в залежності від статі. Доступ до їжі та води не обмежувався. Освітлення вмикали з 7⁰⁰ до 19⁰⁰ години.

2.9 Дизайн експерименту

Для дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність та перебіг ЕАЕ у щурів було сформовано десять груп дослідження. Процес створення груп дослідження проходив у три етапи. Перший етап: імунізації на ЕАЕ матерів задля визначення їхньої чутливості до індукції захворювання. Другий етап: моделювання умов пренатального розвитку. Третій етап: імунізація на ЕАЕ нащадків задля визначення їхньої чутливості до індукції захворювання.

До батьківської групи відібрали самок, які ніколи не були імунізованими на ЕАЕ. Після спарювання для частини самок умови утримання протягом їхньої вагітності відповідали стандартним умовам утримання на віварії. Нащадки с посліду цих самок були імунізовані на ЕАЕ у відповідному до цілей та завдань дослідження віці (І група: 18-21 тижня; V група: 29-35 тижнів) (Рис. 2.1).

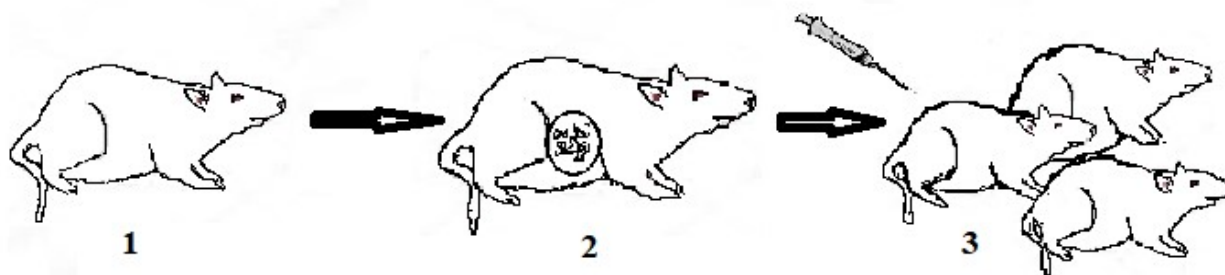


Рис. 2.1 Дизайн формування групи дослідних тварин – нащадків інтактних матерів

Примітки: 1 – інтактна самка з материнської групи; 2 – вагітність проходить за стандартних умов утримання; 3 – нащадки, імунізовані на ЕАЕ у відповідному віці (І група: 18-21 тижня; V група: 29-35 тижнів).

Частину самок з батьківської групи піддавали дії неунікного стресу протягом третього триместру вагітності. Для цього самок утримували за умов

цілодобового освітлення та із заданою періодичністю поміщали в імобілізаційний бокс. Імунізацію на ЕАЕ нащадків з посліду самок, яких піддавали дії стресу, проводили по досягненню тваринами відповідного до цілей та завдань дослідження віку (II група: 18-21 тижня; VI група: 29-35 тижнів) (Рис. 2.2).

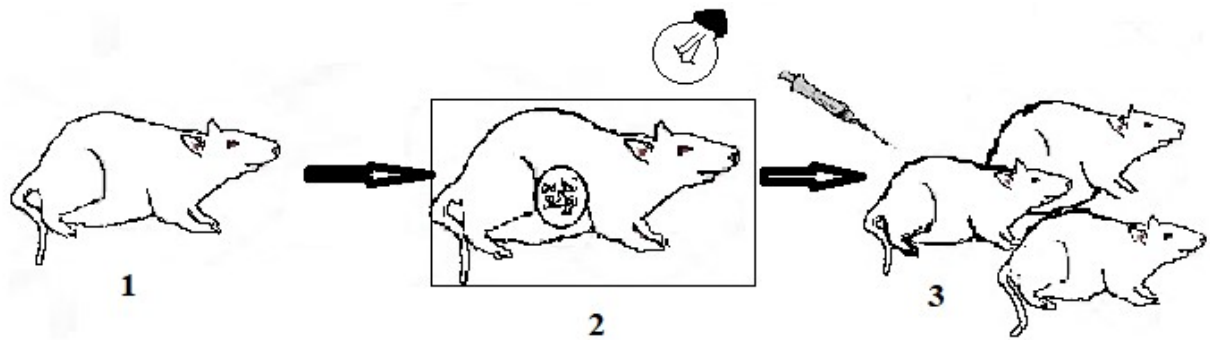


Рис. 2.2 Дизайн формування групи дослідних тварин, нащадків матерів, що піддавались дії хронічного неунікного стресу

Примітки: 1 – інтактна самка з материнської групи; 2 – вагітність проходить під дією неунікного стресу; 3 – нащадки, імунізовані на ЕАЕ у відповідному віці (II група: 18-21 тижня; VI група: 29-35 тижнів).

Тварини III, IV, VII, VIII, IX, X груп склалися з нащадків матерів, імунізованих на ЕАЕ не менш ніж за 50 днів до вагітності. Самки, у яких спостерігався розвиток експериментального енцефаломієліту, були визначені як «чутливі до ЕАЕ» або «хворіли на ЕАЕ». Самки, які не мали ознак рухових порушень, визначались як «резистентні до імунізації на ЕАЕ». Після спарювання частину вагітних самок утримували у стандартних умовах. Нащадки від цієї вагітності були імунізовані у віці 18-21 тижня (III група), 29-35 тижнів (VII група) та 13 тижнів (IX група) (Рис. 2.3). Другу частину вагітних самок піддавали дії неунікного стресу впродовж третього триместру вагітності. Тварини, що народилися, були імунізовані на ЕАЕ у віці 18-21 тижня та увійшли до IV групи, у віці 29-35 тижнів – до VII групи, у віці 13 тижнів визначили як IX група (Рис. 2.4).

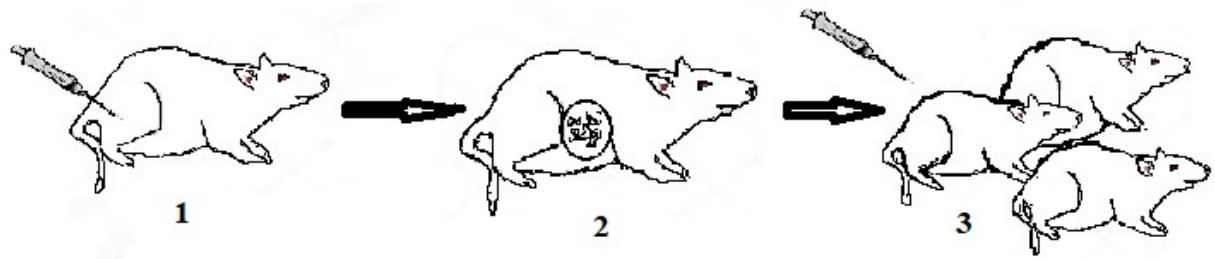


Рис. 2.3 Дизайн формування групи дослідних тварин, нащадків імунізованих на ЕАЕ матерів

Примітки: 1 – самка з материнської групи, що була імунізована на ЕАЕ; 2 – вагітність проходить за стандартних умов утримання; 3 – нащадки, імунізовані на ЕАЕ у відповідному віці (III група: 18-21 тижня; VII група: 29-35 тижнів; IX група: 13 тижнів).

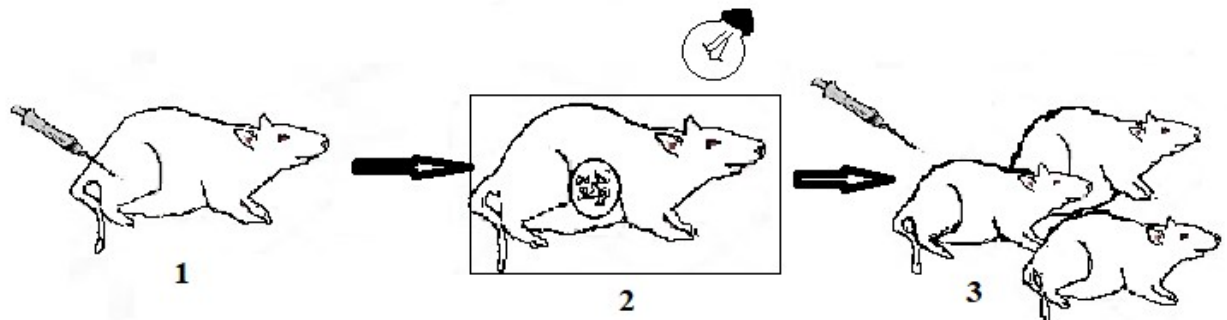


Рис. 2.4 Дизайн формування групи дослідних тварин, нащадків імунізованих на ЕАЕ матерів, що піддавались під час вагітності дії хронічного неунікного стресу

Примітки: 1 – самка з материнської групи, що була імунізована на ЕАЕ; 2 – вагітність проходить під дією неунікного стресу; 3 – нащадки, імунізовані на ЕАЕ у відповідному віці (IV група: 18-21 тижня; VIII група: 29-35 тижнів; X група: 13 тижнів).

Для дослідження впливу імунізації на експериментальний аутоімунний енцефаломієліт та перебігу захворювання під час вагітності матері на захворюваність та динаміку ЕАЕ у нащадків, було сформована XI група дослідження. На першому етапі проводилась імунізація на ЕАЕ у вагітних самок. Беручи до уваги, що перші ознаки рухових порушень спостерігаються не раніше ніж через сім днів після індукції захворювання частину вагітних тварин з материнської групи імунізували на ЕАЕ на $1,67 \pm 0,41$ добу вагітності

(перший триместр вагітності). Іншим тваринам індукували ЕАЕ в другому триместрі вагітності ($9,69 \pm 0,51$ доба). На другому етапі тварини, що народилися у резистентних та чутливих до індукції ЕАЕ матерів, були імунізовані на експериментальний аутоімунний енцефаломієліт у віці 22-24 тижня (Рис. 2.5).

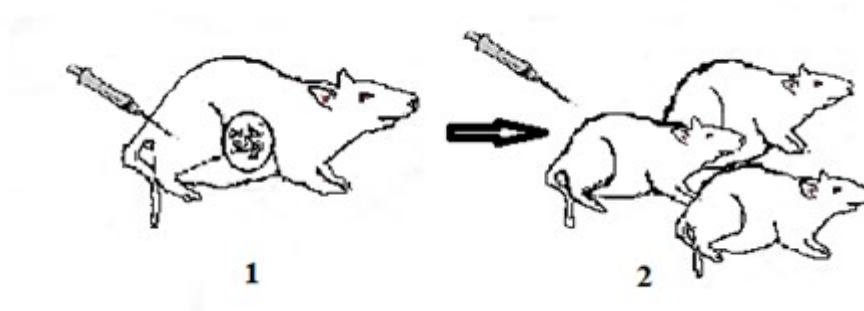


Рис. 2.5 Дизайн формування групи дослідних тварин, нащадків матерів, що піддавались під час вагітності імунізації на ЕАЕ

Примітки: 1 – самка з материнської групи, що були імунізовані на ЕАЕ в період вагітності; 2 – імунізація на ЕАЕ нащадків у віці 22-24 тижня (XI група).

2.10 Отримання біологічного матеріалу для імуноферментних досліджень

Для визначення вмісту кортикостерону та анексину-A1 кров у щурів брали з хвостової вени за 7 діб до імунізації та на 10 день після імунізації на ЕАЕ. Тварин поміщали в імобілізаційний бокс. Голку інсулінового шприца вводили в бічну хвостову вену на відстані 5-7 см від кореня хвоста. У залежності від маси тварини для аналізу брали від 300 до 500 мкл крові. Кров витримували при кімнатній температурі протягом години, після чого центрифугували 15 хв при 3000 обертів/хв. Сироватку об'ємом 100 мкл відбирали в епандорфи і одразу заморожували. Зберігання проб відбувалося за температури нижче -65°C . Розморожування проб проводилось за одну годину до ІФА аналізу.

Для визначення вмісту статевих гормонів кров отримували після декапітації тварин, яку проводили на наступний день після закінчення періоду спостереження за перебігом ЕАЕ. Кров витримували при кімнатній температурі протягом години. Центрифугували 15 хв при 3000 обертів/хв. Сироватку відбирали в епандорфи і одразу заморожували. Зберігання проб відбувалося за температури нижче -65°C . Розморожування проб проводилось за одну годину до ІФА аналізу.

2.11 Імуноферментні дослідження стероїдних гормонів та анексину-A1

Імуноферментний аналіз, що оснований на кількісному визначенні наявності антигенів за допомогою реакції антиген-антитіло, проводився на мікропланшетному аналізаторі GBG Stat FAX 2100 (США) згідно з інструкцією до наборів для визначення.

Для визначення вмісту анексину-A1 використовували набір реагентів Annexin A1 Rat ELISA KitCat; № E1124Ra. Вміст кортикостерону визначали з використанням набору реагентів Corticosteron Rat ELISA KitCat; № E0496Ra. Визначення вмісту статевих гормонів проводили на наборах реагентів: «Естрадіол-ІФА» (НВЛ «Гранум», Харків), Lot 879; «Тестостерон-ІФА» (НВЛ «Гранум», Харків), Lot 902; «Кортизол-ІФА» (НВЛ «Гранум», Харків), Lot 889/2; «Прогестерон-ІФА» (НВЛ «Гранум», Харків), Lot 893.

2.12 Вимірювання систолічного тиску у вагітних самок

Вимірювання систолічного артеріального тиску у вагітних самок здійснювалося електрографічним методом з використанням графітного датчика, сфігмоманометра ПМР та осцилографа С1-93. Вимірювальний датчик і манжету накладали на проксимальну частину хвоста [171].

2.13 Статистичні методи аналізу отриманих даних

Розрахунок довірчого інтервалу для показників захворюваності на ЕАЕ і смертності, які були виражені у відсотках, проводився методом Джеффріса за допомогою калькулятора EpiTools [49]. Порівняння рівнів захворюваності та смертності проводилося в залежності від обсягу вибірки за допомогою методів χ^2 (хі квадрат) або точного критерію Фішера за допомогою калькулятору [104]. У випадках, коли проводилися множинні порівняння вибірок, які за нульовою гіпотезою відносяться до однієї сукупності, визначення рівня значущості проводилося із застосуванням поправки Бонферроні. Порівняння показників перебігу ЕАЕ між двома групами здійснювалося за допомогою критерію Вілкоксона (критерій U Манна-Уїтні). При порівнянні показників більш ніж між двома групами використовувався критерій H Краскела-Уоліса. Приймаючи до уваги, що це перше дослідження пренатального стресу як фактору впливу на захворюваність та перебіг ЕАЕ у щурів та задля зменшення вірогідності хибнонегативного результату ми встановили рівень значущості $p \leq 0,1$. При описі результатів показник рівня значущості від 0,05 до 0,1 наводиться конкретним числом. Якщо рівень значущості менше ніж 0,05, дані представлені як $p \leq 0,05$ [161].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ НА ЗАХВОРЮВАНІСТЬ І ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ВІКУ І СТАТІ ЩУРІВ ТА ЧУТЛИВОСТІ ЇХНІХ МАТЕРІВ ДО ІНДУКЦІЇ ЕАЕ

Розсіяний склероз відноситься до захворювань, ризик розвитку яких залежить від сукупної дії різноманітних факторів. Важливу роль у визначенні шансу захворіти на РС відіграє генетична схильність [112, 125]. Асоціація генетичної схильності та зовнішніх факторів, що діють на жінку, призводить до так званого материнського ефекту [74], який формує підвищений ризик захворіти у людей, які мають хворих родичів за материнською лінією [72]. Окремим фактором, який підвищує вірогідність захворіти, є жіноча стать [17, 87, 115, 153]. Крім того, популяційні дослідження захворюваності на РС дозволили виявити вікову динаміку випадків першого епізоду РС. Менш ніж у 6 % хворих ознаки хвороби проявилися у віці від 10 до 18 років [121]. З віком кількість випадків першого епізоду підвищується, досягаючи піку між 25–35 роками [4]. Розвиток ЕАЕ – тваринної моделі РС – також залежить від впливу різноманітних факторів. На захворюваність ЕАЕ сильно впливає вік імунізації. Так, миші лінії C57BL/6 у віці від 4 днів до 5 тижнів є резистентними до індукції ЕАЕ, але у віці 8 або 20 тижнів введення антигену призводить до розвитку хвороби [32]. Перебіг ЕАЕ у мишей у молодому віці проходить менш тяжко, ніж у тварин зрілого віку [131], а у старих тварин показники рухових порушень знов зменшуються [43]. Різниця в кількості тих, хто хворіє, та перебігу хвороби у тварин різних ліній відображає вплив генетичного фону на чутливість щодо імунізації ЕАЕ [31, 117, 140]. Статеві особливості захворюваності та перебігу ЕАЕ серед мишей показані, зокрема, в роботі Т. L. Papenfuss та співавторів. Серед тварин ліній SJL та ASW більш тяжкий перебіг ЕАЕ спостерігається у самок, ніж у самців. В той же час самці лінії PL/J хворіють тяжче за самок [117]. Фактори зовнішнього

середовища також впливають на відповідь тварин щодо імунізації на ЕАЕ. Стрес, що діяв на мишей з 2 по 14 день після народження, призводив до зміни перебігу ЕАЕ у самок і самців. Якщо серед тварин контрольної групи найтяжче хворіли самки, то серед тварин, що піддавалися дії стресу, більш тяжкий перебіг ЕАЕ спостерігався у самців. Причому найменший рівень рухових порушень серед тварин дослідної та контрольної груп відзначався у самок, які піддавалися дії стресу [27]. Таким чином, при вивченні ефектів потенційного фактору впливу необхідно брати до уваги, що прояв його дії може бути посилений або нівельований окремою чи то спільною дією інших факторів.

3.1 Розробка експериментальної моделі (підходів) для вивчення родинних форм розсіяного склерозу та модифікація шкали для оцінки рухових порушень

Експериментальне дослідження РС є потужним інструментом у вивченні патогенезу цього захворювання. Для вивчення різних типів перебігу ЕАЕ використовуються моделі, що відповідають динаміці монофазного, рецидивуючо-ремітуючого і хронічно-прогресивного перебігу РС [101], а також вторинно-прогресуючого [133]. Використання лінійних тварин дозволяє знизити індивідуальну мінливість і дослідити окремі етапи активації імунної системи та аутоімунного або запального пошкодження мієлінових оболонок і нервових клітин [22, 34, 42, 110, 140]. Водночас при імунізації на ЕАЕ тварин однієї лінії частина хворих може складати від 0 до 95 % [75], що може бути відображенням впливу як генетичних [125], так і епігенетичних факторів [65]. Епідеміологічні дослідження свідчать, що ризик захворіти на РС в середньому в популяції у людини становить 0,1-0,2 %, а з наявністю родичів другого та першого ступеню спорідненості шанси захворіти підвищуються (0,1-0,2 % і 2-4 % відповідно) [28, 125]. Раннє використання протизапальної та імуномодуючої терапії призводить до

більш повільного наростання неврологічного дефіциту, що дозволяє хворим на РС з упевненістю планувати майбутнє батьківство. Таким чином, вивчення особливостей перебігу родинних випадків РС стає актуальною проблемою дослідження різноманітності аспектів цього захворювання. В якості моделі родинних форм РС ми пропонуємо проводити індукцію ЕАЕ у нащадків чутливих і резистентних щодо індукції ЕАЕ щурів [162, 163, 164, 165, 175, 176].

Формування дослідних груп починається з відбору тварин до батьківської групи за ознакою чутливості та стійкості щодо індукції ЕАЕ. Після імунізації тварин на ЕАЕ за показниками рівня рухових порушень тварин поділяють на тих, хто має моторні пошкодження («чутливі до індукції ЕАЕ» або «хворіли на ЕАЕ») та не має ознак моторної дисфункції («резистентні до розвитку ЕАЕ»). Серед чутливих до індукції тварин до батьківської групи відбираються тварини, чий середньодобовий рівень рухових порушень дорівнює від 1,5 до 2,5 балів клінічного індексу (КІ) та у яких по закінченню 30 денного періоду спостережень за розвитком хвороби фіксують повне одужання. Таким чином, батьківське покоління складається з чутливих до розвитку ЕАЕ самок, резистентних до розвитку ЕАЕ самок, чутливих до розвитку ЕАЕ самців і резистентних до розвитку ЕАЕ самців. В залежності від цілей дослідження проводиться спарювання тварин з визначеною чутливістю щодо індукції ЕАЕ. Нащадки від таких спарювань мають в анамнезі дані про реакцію батьків на імунізацію на ЕАЕ [162, 163, 164, 165, 175, 176] (Рис. 3.1).

Імунізація на ЕАЕ ініціює у тварин розвиток запальних та імунних реакцій, які призводять до порушення роботи нейронів, відповідальних, зокрема, за рух. Щоденна оцінка рівня рухових порушень за допомогою Шкали рухових порушень дозволяє зафіксувати динамічні зміни у стані тварини. Оцінка тяжкості перебігу ЕАЕ складається з оцінки моторних порушень. За допомогою Шкали рухових порушень визначають стан тварин в балах клінічного індексу від стану «без ознак захворювання» і через

градації «параліч хвоста», «хитка хода», «парез кінцівок», «параліч кінцівок» до «стан смерті». Однак єдиної шкали для такої оцінки немає.

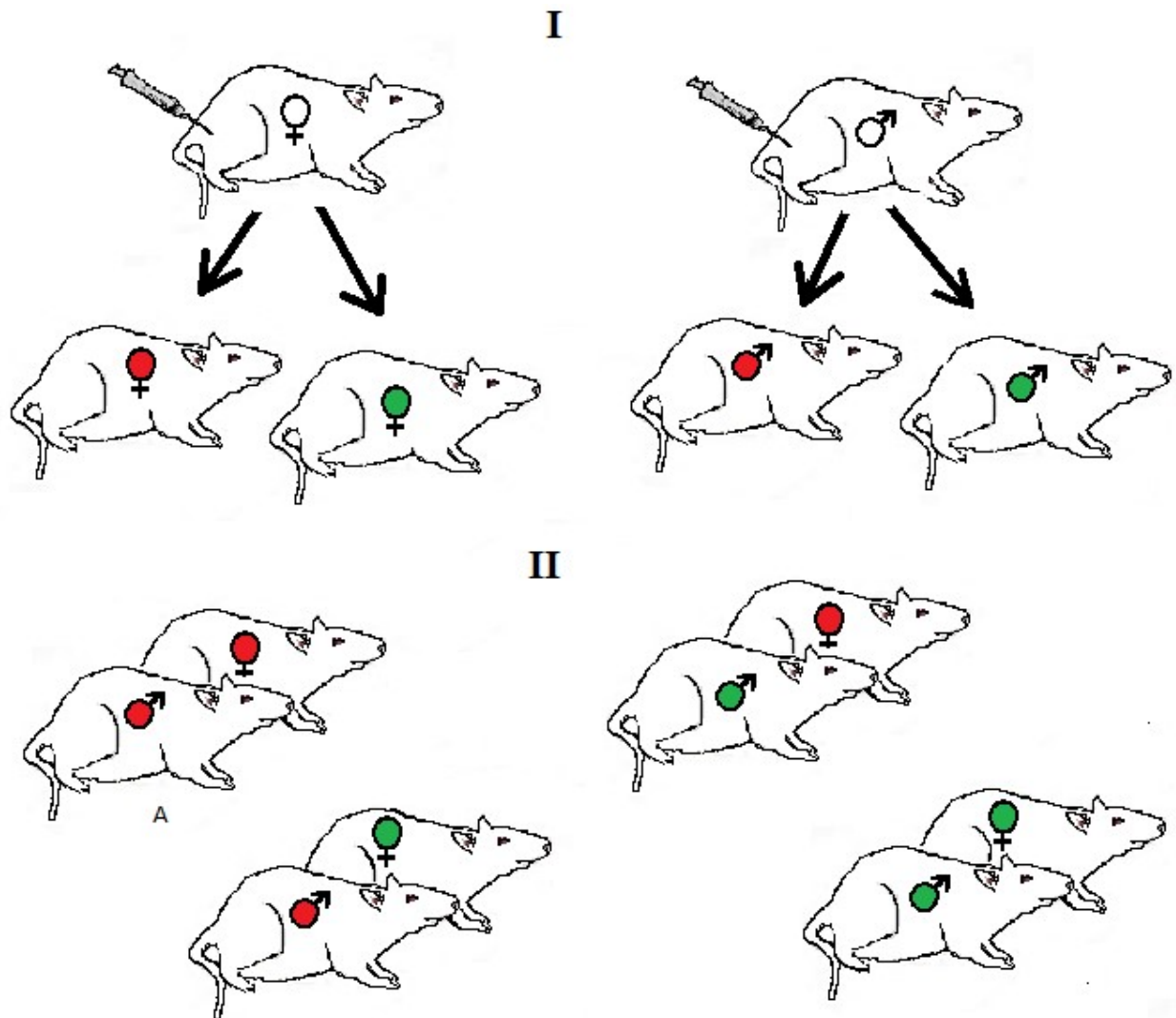


Рис. 3.1 Формування батьківських груп серед тварин з визначеною чутливістю до ЕАЕ для дослідження родинних форм РС

Примітки: I – індукція ЕАЕ у щурів обох статей, визначення чутливості щодо розвитку захворювання; II – спарювання щурів з визначеною чутливістю до індукції ЕАЕ в залежності від цілей дослідження; ● – самки, чутливі до індукції ЕАЕ; ● – самки, резистентні до індукції ЕАЕ; ● – самці, чутливі до індукції ЕАЕ; ● – самці, резистентні до індукції ЕАЕ.

Дослідники використовують шкали від 0 до 5 балів клінічного індексу з шагом в один бал [13, 63, 102]; 5-бальну шкалу з шагом оцінки 0,5 балів [73, 77]; 6-бальну шкалу оцінки з шагом 0,25 балів [176]; 6-бальну шкалу оцінки з

шагом в один бал [118]; 10-бальну шкалу з шагом оцінки в один бал [130]. Lee Y. та співавтори у статті, присвяченій статистичним методам аналізу перебігу ЕАЕ, рекомендують фіксувати факт захворювання, якщо протягом 2 днів буде спостерігатися повний параліч хвоста (відповідає КІ в 1 бал) [86]. Таким чином, деяка кількість випадків захворювання з дуже легким перебігом виключаються з дослідження. Ми вважаємо, що таке жорстке визначення настання випадку захворювання виправдано при оцінці дозозалежного ефекту лікарської сполуки на перебіг хвороби і необхідності відокремити ефект дії сполуки від особливостей персональної відповіді на імунізацію. Для дослідження схильності тварини щодо розвитку аутоімунної патології, сформованої генетичною основою та умовами навколишнього середовища, нами була модифікована Шкала рухових порушень. За мінімальний рівень рухових порушень, який визначає початок захворювання, був прийнятий стан, що відповідає рівню рухових порушень «0,5 балів – гіпертонус хвоста або хвіст в тонусі частково, кінчик хвоста висить» впродовж одного дня спостереження. Оцінка рівня неврологічних порушень, викликаних ЕАЕ, оцінюється в балах клінічного індексу (КІ): 0 – відсутність неврологічних порушень; 0,5 – гіпертонус хвоста або хвіст в тонусі частково, кінчик хвоста висить; 1,0 – параліч хвоста, рухи активні, щур стає в стійку без опори; 1,5 – параліч хвоста, слабо виражені парези кінцівок, рухи активні, щур може стояти в стійці тільки з опорою; 2,0 – парези однієї чи двох кінцівок, виражені порушення ходи; 2,5 – тетрапарез, сильна хиткість при ходьбі, може періодично не утримувати рівновагу і завалюватися або задня частина тіла притиснута до підлоги; 3,0 – активне пересування на передніх кінцівках, задні кінцівки висять, але ще роблять невеликі рухи; 3,5 – параліч задніх кінцівок, помірне пересування на передніх кінцівках; 4,0 – параліч задніх кінцівок, парапарез передніх кінцівок, пересувається насилу; 4,5 – параліч задніх кінцівок, парапарез передніх кінцівок, пересувається насилу, порушення функції сфінктера сечового міхура; 5,0 – парапараліч, лежить на боці, не рухається, відсутність інтересу до їжі, п'є воду. Якщо стан не

змінюється протягом 2-х днів, тварині проводять евтаназію; 5,5 – парапараліч, лежить на боці, необхідно давати воду. Якщо стан не змінюється протягом 1-го дня, тварині проводять евтаназію; 6,0 – щур виявлений мертвим або проведена евтаназія. При визначенні стану тварини як проміжного між показниками для сусідніх балів, додається 0,25 балів до нижнього значення [176].

3.2 Вплив пренатального стресу та чутливості матерів до індукції ЕАЕ на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання ЕАЕ у молодому віці

Для вивчення впливу пренатального стресу на захворюваність ЕАЕ у щурів молодого віку, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ, проводилася імунізація чотирьох груп тварин. В залежності від умов пренатального розвитку з нащадків інтактних матерів формували дві групи дослідних тварин. Щури, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов, складали I групу, а їхні сибси, які піддавалися дії пренатального стресу, – II групу. Щури з послідів імунізованих матерів також були розділені на дві групи: тварини, чий ембріональний розвиток відбувався за стандартних умов, визначалися як група III, а пренатально стресовані тварини – IV група. На початку експерименту вік тварин складав 17-21 тиждень, що відповідає 17-21 років людини [166].

3.2.1 Вплив імунізації матерів на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання в молодому віці

Для дослідження можливого впливу перенесеної матерями імунізації, що передувала вагітності, на формування у їхніх нащадків схильності до розвитку ЕАЕ було проведено порівняння показників захворюваності та

смертності, а також перебігу ЕАЕ серед тварин зі стандартними умовами ембріонального розвитку, нащадків інтактних та імунізованих самок (І і ІІ групи).

В ході аналізу показників перебігу ЕАЕ у тварин молодого віку, чий ембріональний розвиток проходив за нормальних умов, було виявлено, що частина хворих серед щурів від імунізованих матерів (ІІІ група) склала 79,6 %, що було нижче, ніж кількість хворих з посліду інтактних матерів (І група) – 95,5 %, але ця різниця не набула прийнятного рівня значущості ($p=0,086$). (Табл. 3.1). Серед тварин ІІІ групи частина щурів, що загинули внаслідок дуже тяжкого перебігу захворювання, склала 15,7 %, що було значуще нижче, ніж серед нащадків інтактних матерів – 44,2 % ($p\leq 0,05$) (Табл. 3.2).

Самці ІІІ і І груп хворіли на ЕАЕ приблизно в однаковій мірі (84,2 %; 90,9 %) (Табл. 3.1). Серед хворих самців тяжкий перебіг ЕАЕ призвів до загибелі 31,3 % тварин в ІІІ групі і 30,0 % – в І групі (Табл. 3.2). Дослідження перебігу захворювання показало, що у самців, нащадків імунізованих матерів (група ІІІ-♂), перші прояви моторної дисфункції були зафіксовані на $10,3\pm 3,3$ день (ЛП), досягаючи максимальних значень рухових порушень за $4,3\pm 1,9$ днів ($T_{п-мах}$). Середня тривалість хвороби для самців ІІІ групи складала $9,9\pm 5,9$ днів ($T_{хв}$), з яких показники рухових порушень дорівнювали або були більше 2 балів клінічного індексу ($T_{KI\geq 2}$) протягом $5,0\pm 4,5$ днів. Порівняння часових показників перебігу ЕАЕ у самців ІІІ групи і самців з посліду інтактних матерів (група І-♂) не виявило значної різниці у тривалості етапів захворювання (група І-♂: ЛП = $10,1\pm 2,3$; $T_{п-мах}$ = $3,2\pm 1,6$; $T_{хв}$ = $11,3\pm 7,1$; $T_{KI\geq 2}$ = $4,2\pm 3,6$) (Рис. 3.2).

Не було виявлено суттєвих відмінностей в показниках, які відображають ступінь рухових порушень у самців, нащадків імунізованих та інтактних матерів (група ІІІ-♂: $KI_{макс}$ = $3,92\pm 1,88$; $KI_{ср.хв}$ = $2,32\pm 1,39$; група І-♂: $KI_{макс}$ = $3,55\pm 1,98$; $KI_{ср.хв}$ = $2,29\pm 1,61$) (Рис. 3.3).

Таблиця 3.1

Рівень сприйнятливості щодо індукції ЕАЕ у щурів молодого віку в залежності від статі, умов пренатального розвитку і чутливості матерів до індукції ЕАЕ

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Матері нащадків	Стать нащадків	Кількість нащадків	захворіли	
					<i>n</i>	% (95 % ДІ)
I	СУ	інтактні	самці	11	10	90,9 (64,4–99,0)
			самки	12	12	100,0 (81,5–100,0)
			всього*	23	22,0	95,5 (84,1–99,5)
II	ПС	інтактні	самці	9	8	88,9 (58,6–98,8)
			самки	4	2	50,0 (12,3–87,7) ^{●●}
			всього*	13	9,0	69,5 (42,3–88,6) [●]
III	СУ	хворіли	самці	8	7	87,5 (54,6–98,6)
			самки	9	7	77,8 (45,6–95,1)
			всього	17	14	82,4 (60,0–94,8)
		резистентні	самці	11	9	81,8 (53,3–96,0)
			самки	19	14	73,7 (51,6–89,2)
			всього	30	23	76,7 (59,6–88,9)
		всього	самці	19	16	84,2 (63,6–95,3)
			самки	28	21	75,0 (57,1–88,1)
			всього*	47	37,4	79,6 (65,5–88,5)
IV	ПС	хворіли	самці	16	9	56,2 (32,6–77,8)
			самки	10	3	30,0 (9,3–60,6) [■]
			всього	26	12	46,2 (25,0–61,3) ^{▲; ▲▲}
		резистентні	самці	13	10	76,9 (50,3–93,0)
			самки	8	6	75,0 (40,8–94,4)
			всього	21	16	76,2 (55,4–90,3)
		всього	самці	29	19	65,5 (47,4–80,7)
			самки	18	9	50,0 (28,4–71,6)
			всього*	47	27,1	57,8 (43,2–70,78) [▼]

Примітки: ПС – піддавалися дії пренатального стресу; СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена; ● (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед тварин I групи; ●● (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед тварин I групи; ■ (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед самок III гр., нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів; ▲ (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед тварин, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов (III гр.), нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів; ▲▲ (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед пренатально стресованих тварин (IV гр.), нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів; ▼ (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед тварин III групи.

Таблиця 3.2

Рівень загибелі за умов індукції ЕАЕ у щурів молодого віку в залежності від статі, умов пренатального розвитку і чутливості матерів до індукції ЕАЕ

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Матері нащадків	Стать нащадків	Кількість хворих нащадків	загинули	
					<i>n</i>	% (95 % ДІ)
I	СУ	інтактні	самці	10	3	30,0 (9,3–60,6)
			самки	12	7	58,3 (31,2–82,0)
			всього*	22,0	9,7	44,2 (26,3–65,7)
II	ПС	інтактні	самці	8	3	37,5 (11,9–70,5)
			самки	2	0	0,0 (0,0–66,7)
			всього*	9,0	1,7	18,8 (4,9–54,4)
III	СУ	хворіли	самці	7	3	42,9 (13,9–76,5)
			самки	7	0	0,0 (0,0–29,2)
			всього	14	3	21,4 (6,4–46,9)
		резистентні	самці	9	2	22,2 (4,9–54,4)
			самки	14	0	0,0 (0,0–16,2)
			всього	23	2	11,1 (3,8–30,4)
		всього	самці	16	5	31,3 (13,1–55,6)
			самки	21	0	0,0 (0,0–11,1) ^{••}
			всього*	37,4	5,9	15,7 (6,9–29,7) [•]
IV	ПС	хворіли	самці	9	0	0,0 (0,0–23,8) ^{▲; ▲▲}
			самки	3	0	0,0 (0,0–53,6)
			всього	12	0	0,0 (0,0–20,0)
		резистентні	самці	10	4	40,0 (15,3–69,6)
			самки	6	0	0,0 (0,0–33,0)
			всього	16	4	25,0 (9,1–49,1)
		всього	самці	19	4	21,1 (7,6–42,6)
			самки	9	0	0,0 (0,0–23,8)
			всього*	27,1	2,8	10,5 (3,1–25,9)

Примітки: ПС – піддавалися дії пренатального стресу; СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена; • ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем смертності серед тварин I групи; •• ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем смертності серед самок I групи; ▲ ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем смертності серед пренатально стресованих самців (IV гр.), нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів; ▲▲ ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем захворюваності серед самців, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов (III гр.), нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів.

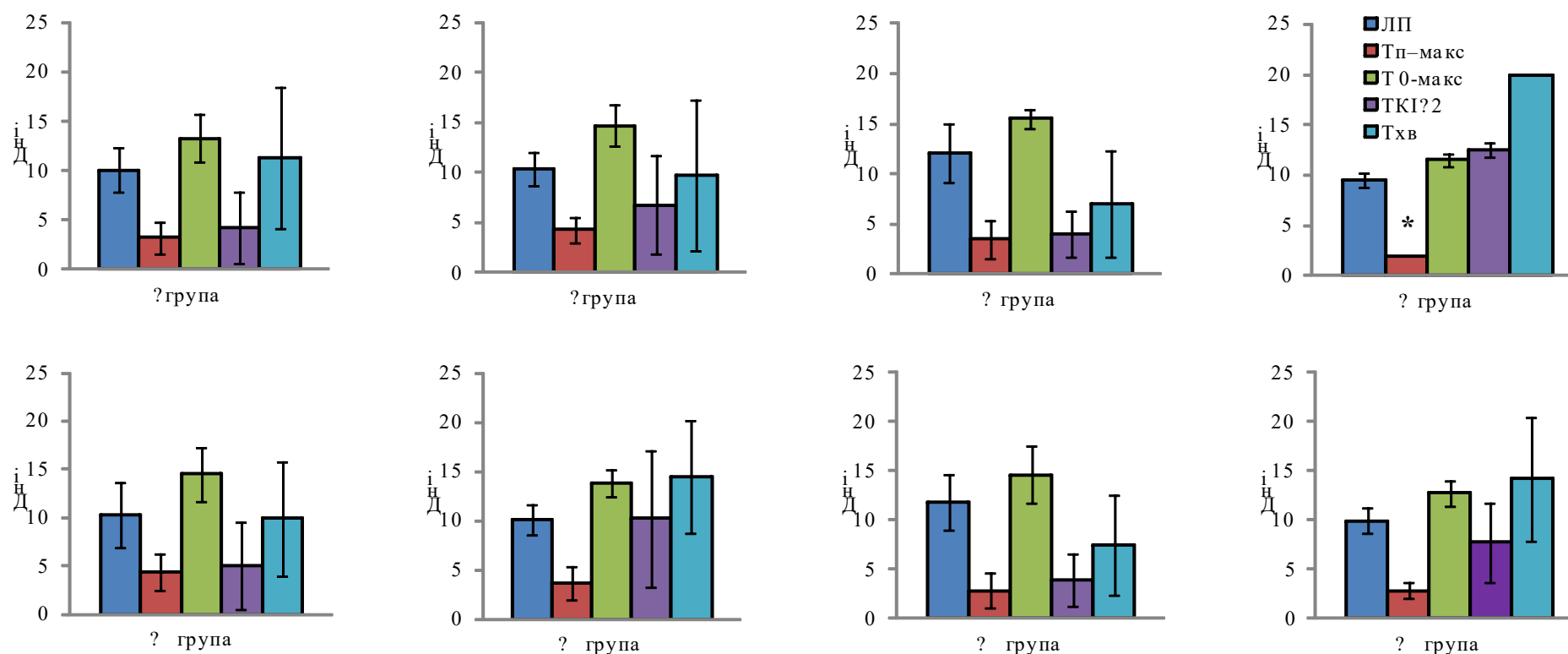


Рис. 3.2 Тривалість етапів перебігу ЕАЕ у тварин, імунізованих у молодому віці

Примітки: I група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки інтактних матерів; I група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки інтактних матерів; II група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки інтактних матерів; II група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки інтактних матерів; III група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки імунізованих матерів; III група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки імунізованих матерів; IV група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки імунізованих матерів; IV група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки імунізованих матерів; ЛП – латентний період; $T_{п-макс}$ – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; $T_{0-макс}$ – тривалість періоду наростання рухових порушень від імунізації до дня з максимальним показником моторної дисфункції; $T_{KI \geq 2}$ – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ; $T_{хв}$ – тривалість захворювання; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками I групи.

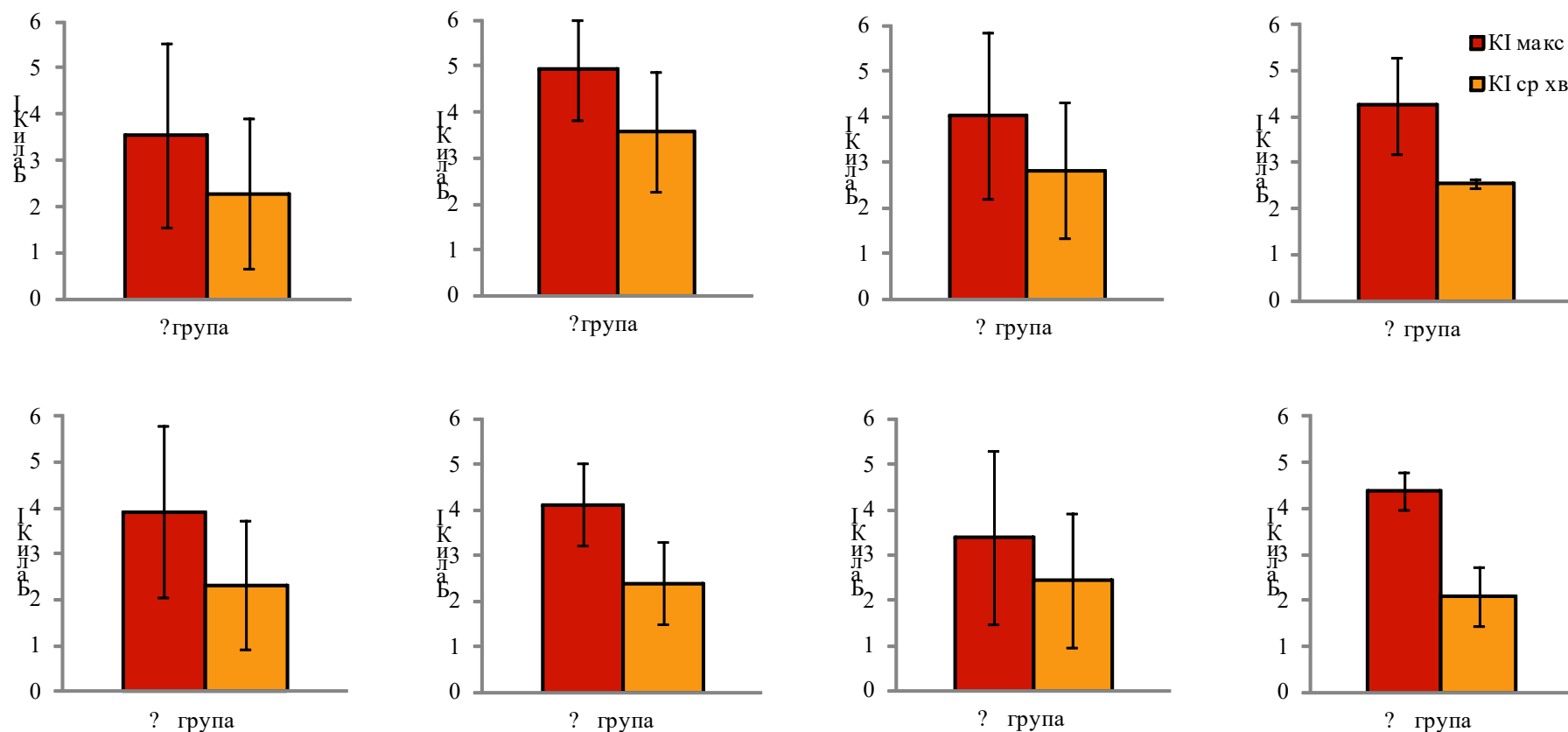


Рис. 3.3 Показники тяжкості перебігу ЕАЕ у тварин, імунізованих у молодому віці

Примітки: I група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки інтактних матерів; I група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки інтактних матерів; II група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки інтактних матерів; II група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки інтактних матерів; III група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки імунізованих матерів; III група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, нащадки імунізованих матерів; IV група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки імунізованих матерів; IV група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу, нащадки імунізованих матерів; $KI_{\text{макс}}$ – максимальний рівень рухових порушень, який спостерігався; $KI_{\text{ср хв}}$ – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби.

Таким чином, в ході дослідження було з'ясовано, що рівні захворюваності і смертності, а також тяжкість і динаміка захворювання у молодих самців, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов, не залежали від імунізації матерів на ЕАЕ.

Спостерігалися деякі відмінності щодо рівня захворюваності та перебігу ЕАЕ серед самок з послідів інтактних та імунізованих матерів, чия вагітність протікала у стандартних умовах утримання. Так, 100 % самок І групи (група I-♀) мали прояви цього захворювання, тоді як серед самок ІІІ групи (група III-♀) таких було 75 %, однак різниця не набула прийнятного рівня значущості ($p=0,064$) (Табл. 3.1). Не фіксувалося жодного випадку загибелі серед самок з посліду імунізованих матерів (група III-♀), в той же час серед самок І групи частка загиблих була значно вищою – 58,3 % ($p\leq 0,05$) (Табл. 3.2).

Порівняння показників тяжкості та тривалості ЕАЕ у самок з різними умовами пренатального розвитку, імунізованих у молодому віці, ускладнене великою кількістю загиблих тварин (58,3 %) серед самок з І групи, тоді як серед пренатально стресованих тварин випадків загибелі не було зафіксовано. Самки І групи, що вижили та які загинули, мають значущі відмінності в таких показниках, як: тривалість хвороби (група I-♀, що вижили: $T_{\text{хв}} = 17,6\pm 4,5$ днів; група I-♀, що загинули: $T_{\text{хв}} = 4,1\pm 1,5$ днів; $p\leq 0,05$); кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ (група I-♀, що вижили: $T_{\text{кі}\geq 2} = 10,6\pm 5,5$ днів; група I-♀, що загинули: $T_{\text{кі}\geq 2} = 4,0\pm 1,5$ днів; $p\leq 0,05$); максимальний рівень рухових порушень (група I-♀, що вижили: $\text{КІ}_{\text{макс}} = 3,40\pm 0,95$ балів КІ; група I-♀, що загинули: $\text{КІ}_{\text{макс}} = 6,00$ балів КІ; $p\leq 0,05$) і середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби (група I-♀, що вижили: $\text{КІ}_{\text{ср.хв}} = 2,25\pm 0,48$ балів КІ; група I-♀, що загинули: $\text{КІ}_{\text{ср.хв}} = 4,53\pm 0,66$ балів КІ; $p\leq 0,05$).

Беручи до уваги таку значущу різницю в показниках тяжкості перебігу ЕАЕ у тварин, що вижили, і тих, хто загинув, ми прийняли рішення провести

аналіз тільки тих параметрів, які відображали етапи розвитку хвороби по досягненню піку захворювання.

Було виявлено, що часові проміжки перших етапів перебігу ЕАЕ у самок з посліду імунізованих матерів (група III-♀: ЛП = $10,1 \pm 1,6$ днів; $T_{п-маx} = 3,7 \pm 1,7$ дня) не мали значущих відмінностей від показників у самок I групи (група I-♀: ЛП = $10,4 \pm 1,7$; $T_{п-маx} = 4,3 \pm 1,3$) (Рис. 3.2).

Таким чином, було показано, що імунізація матерів, яка передувала вагітності, по-різному впливала на формування схильності щодо розвитку ЕАЕ у нащадків різної статі, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов. Для нащадків жіночої статі імунізація матерів до вагітності асоціювалася з виживанням після індукції ЕАЕ. Не було виявлено впливу на захворюваність та смертність, а також перебіг ЕАЕ у молодих самців-нащадків. Після проведення дослідження впливу імунізації матерів на рівень захворюваності та смертності їхніх нащадків внаслідок індукції ЕАЕ не проводилася імунізація інтактних матерів з метою визначити їх чутливість до імунізації. Залишається відкритим питання, чи може зниження рівня смертності у самок з посліду імунізованих матерів залежати не від факту імунізації, а від чутливості матерів до індукції ЕАЕ.

3.2.2 Вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання в молодому віці

3.2.2.1 Дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів різної статі, нащадків інтактних матерів, за умов моделювання цього захворювання в молодому віці

Дослідження можливого впливу перенесеного пренатального стресу на схильність до ЕАЕ у нащадків інтактних матерів проводилося на щурах I і

II груп. Аналіз рівня захворюваності показав, що частина хворих серед щурів, що зазнали дії пренатального стресу (II група) склала 69,5 %, що було значуще нижче, ніж серед тварин, чий розвиток проходив у стандартних умовах (I група: 95,5 %; $p \leq 0,05$) (Табл. 3.1). Серед тварин II групи відзначався дещо нижчий рівень загибелі від ЕАЕ у порівнянні з тваринами I групи (18,8 % і 44,2 % відповідно), але ця різниця не була значущою (Табл. 3.2).

Аналіз рівня захворюваності в залежності від статі нащадків показав, що частки хворих серед самців I і II груп були практично однаковими (90,9 % і 88,9 % відповідно) (Табл. 3.1). Частки загиблих серед самців цих груп також практично не відрізнялися (30,0 % і 31,3 % відповідно) (Табл. 3.2). Не було виявлено різниці ні у тривалості різних періодів перебігу ЕАЕ, ні у показниках тяжкості перебігу захворювання між показниками у самців, нащадків інтактних та імунізованих матерів (Рис. 3.2; Рис. 3.3).

Жіноча стать і перенесений пренатальний стрес (група II-♀) виявилися такою сукупністю факторів, яка визначала найменший рівень захворюваності (50 %), і цей показник був значуще нижчим, ніж у самок з I групи (100 %; $p \leq 0,05$) (Табл. 3.1). За період дослідження не було зафіксовано випадків загибелі серед пренатально стресованих самок з посліду інтактних матерів, в той же час серед самок I групи смертність становила 58,3 %, проте невелика кількість хворих серед самок II групи (2 тварини) не дозволила з'ясувати, чи впливає перенесений пренатальний стрес на рівень смертності серед самок, чії матері були інтактними (Табл. 3.2). Аналіз тривалості етапів перебігу ЕАЕ показав, що відрізок часу від перших проявів захворювання до дня максимальних рухових порушень у самок II групи ($T_{\text{II-макс}} = 2$ дні) був значно коротшим, ніж у самок з групи порівняння (група I-♀: $T_{\text{II-макс}} = 4,3 \pm 1,3$ днів; $p \leq 0,05$), в той же час тривалість захворювання у пренатально стресованих самок була довшою, ніж у самок I групи, але ця різниця не набула прийнятного рівня значущості (група II-♀: $T_{\text{хв}} = 20$ днів; група I-♀: $T_{\text{хв}} = 9,8 \pm 7,5$ днів; $p = 0,09$) (Рис. 3.2).

Таким чином, було виявлено, що перенесений пренатальний стрес не впливав на захворюваність та смертність від ЕАЕ, а також перебіг цього захворювання у самців молодого віку з посліду інтактних матерів. Для самок перенесений пренатальний стрес виявився фактором, асоційованим з меншим ризиком захворіти на ЕАЕ та більш швидким розвитком захворювання від дня перших ознак до дня набуття максимальної моторної дисфункції ($T_{п-макс}$). Питання впливу умов пренатального розвитку на ризик загинути від ЕАЕ у самок, нащадків інтактних матерів, залишається відкритим.

3.2.2.2 Дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів, нащадків імунізованих матерів, за умов моделювання цього захворювання в молодому віці

З метою з'ясування можливого впливу умов пренатального розвитку на захворюваність та смертність за умови ЕАЕ серед нащадків матерів, імунізованих до вагітності, порівнювався перебіг ЕАЕ у пренатально стресованих тварин (IV група), і тих, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах (III група). Частка хворих серед пренатально стресованих тварин (IV група) складала 57,8 % і була значуще нижче, ніж частка хворих серед тварин, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах (III група: 79,6 %; $p \leq 0,05$).

Ця різниця сформувалася за рахунок більш низької захворюваності як серед самців IV групи у порівнянні з хворими самцями III групи (III група-♂: 84,2 %; IV група-♂: 65,5 %), так і більш низької кількості чутливих до індукції ЕАЕ серед самок IV групи у порівнянні з самками III групи (III група-♀: 75,0 %; IV група-♀: 50,0 %; $p=0,089$) (Табл. 3.1). Жодна самка з III і IV груп не загинула за 30 днів спостереження за перебігом у тварин експериментального аутоімунного енцефаломієліту. Рівень смертності серед

самців цих груп між собою суттєво не відрізнявся (III група: 31,3 %; IV група: 21,1 %) (Табл. 3.2).

Таким чином, було виявлено, що серед молодих нащадків імунізованих матерів найнижчий рівень захворюваності спостерігався у тих, хто піддавався дії пренатального стресу.

3.2.2.3 Дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ, за умов моделювання цього захворювання в молодому віці

Щури з материнської групи за типом відповіді на індукцію ЕАЕ поділялися на резистентних до імунізації і тих, хто захворів (чутливих). Був проведений аналіз впливу умов пренатального розвитку на перебіг ЕАЕ у тварин III і IV груп в залежності від чутливості їхніх матерів до індукції ЕАЕ.

Аналіз рівня захворюваності тварин в залежності від умов пренатального розвитку і чутливості матерів до індукції ЕАЕ показав, що серед пренатально стресованих нащадків резистентних матерів (група IV-MP) частка хворих тварин склала 76,2 % і практично не відрізнялася від кількості хворих нащадків резистентних матерів з III групи (III-MP – 76,7 %) (Табл. 3.1). Частина загиблх щурів в цих групах також істотно не відрізнялася (відповідно 25,0 % і 11,1 %) (Табл. 3.2). Не спостерігалось різниці у захворюваності на ЕАЕ залежно від статі серед щурів з цих груп (III-MP-♂ – 81,8 %; III-MP-♀ – 73,7 %; IV-MP-♂ – 76,9 %; IV-MP-♀ – 75,0 %) (Табл. 3.1) [176].

Серед пренатально стресованих нащадків чутливих до ЕАЕ матерів (група IV-MX) захворюваність склала 46,2 %, що було значно нижче, ніж у щурів, чий ембріональний розвиток проходив за нормальних умов (III-MX – 82,4 %; $p \leq 0,05$). Частина хворих серед пренатально стресованих самок була значно нижчою порівняно із самками відповідної групи порівняння (IV-MX-

♀ – 30,0 %; III-MX-♀ – 77,8 %; $p \leq 0,05$). Пренатально стресовані самці також хворіли в меншій мірі, ніж їх брати, чий ембріональний розвиток проходив у стандартних умовах, але прийнятного рівня значущості ця різниця не набула (група IV-MX-♂ – 56,2 %; III-MX-♂ – 87,5 %; $p = 0,13$) (Табл. 3.1) [176].

Взаємодія таких факторів, як пренатальний стрес і чутливість матерів до індукції ЕАЕ, призвела до найменшого рівня захворюваності серед нащадків (IV-MX – 46,2 %), який був значно нижчим у порівнянні як із захворюваністю серед нащадків резистентних матерів (IV-MP – 76,2 %; $p \leq 0,05$), так і порівняно із сибсами, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов (III-MX – 82,4 %; $p \leq 0,05$). Рівень захворюваності серед тварин III групи, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ, практично не відрізнявся (III-MX – 82,4 %; III-MP – 76,7 %) (Табл. 3.1) [176]. Комбінований вплив чутливості матері до розвитку ЕАЕ та перенесеного пренатального стресу призвів до нульової смертності від розвитку ЕАЕ серед нащадків чоловічої статі, що було значуще нижче у порівнянні як із самцями, нащадками резистентних матерів (IV-MP-♂ – 40 %; $p \leq 0,05$), так і самцями, чий розвиток проходив за стандартних умов, з посліду матерів, що хворіли на ЕАЕ (III-MX-♂ – 42,9%; $p \leq 0,05$) (Табл. 3.2).

Аналіз перебігу ЕАЕ показав, що найлегше хвороба протікала у пренатально стресованих самців з посліду чутливих до індукції ЕАЕ матерів (група IV-MX-♂), що характеризувалося короткою тривалістю хвороби ($T_{\text{хв}} = 8,2 \pm 6,2$ днів), невеликим періодом від дня перших проявів захворювання і до дня настання піку захворювання ($T_{\text{п-макс}} = 2,3 \pm 1,0$ днів), низьким середньодобовим показником рівня рухових порушень ($KI_{\text{ср.хв}} = 1,76 \pm 1,00$ балів КІ). Кількість днів, коли рівень рухових порушень дорівнював 2 або більше балам КІ, складала $3,9 \pm 6,5$ днів ($T_{KI \geq 2}$). Показник рівня максимальних порушень досягав $2,42 \pm 1,48$ балів КІ ($KI_{\text{макс}}$) і був значуще нижчим, ніж у самок з того ж посліду (група IV-MX-♀: $KI_{\text{макс}} = 4,67 \pm 0,29$ балів КІ; $p \leq 0,05$) і самців з посліду резистентних матерів (група IV-MP-♂: $KI_{\text{макс}} = 4,25 \pm 1,91$ балів КІ; $p \leq 0,05$) (Рис. 3.4; Рис. 3.5).

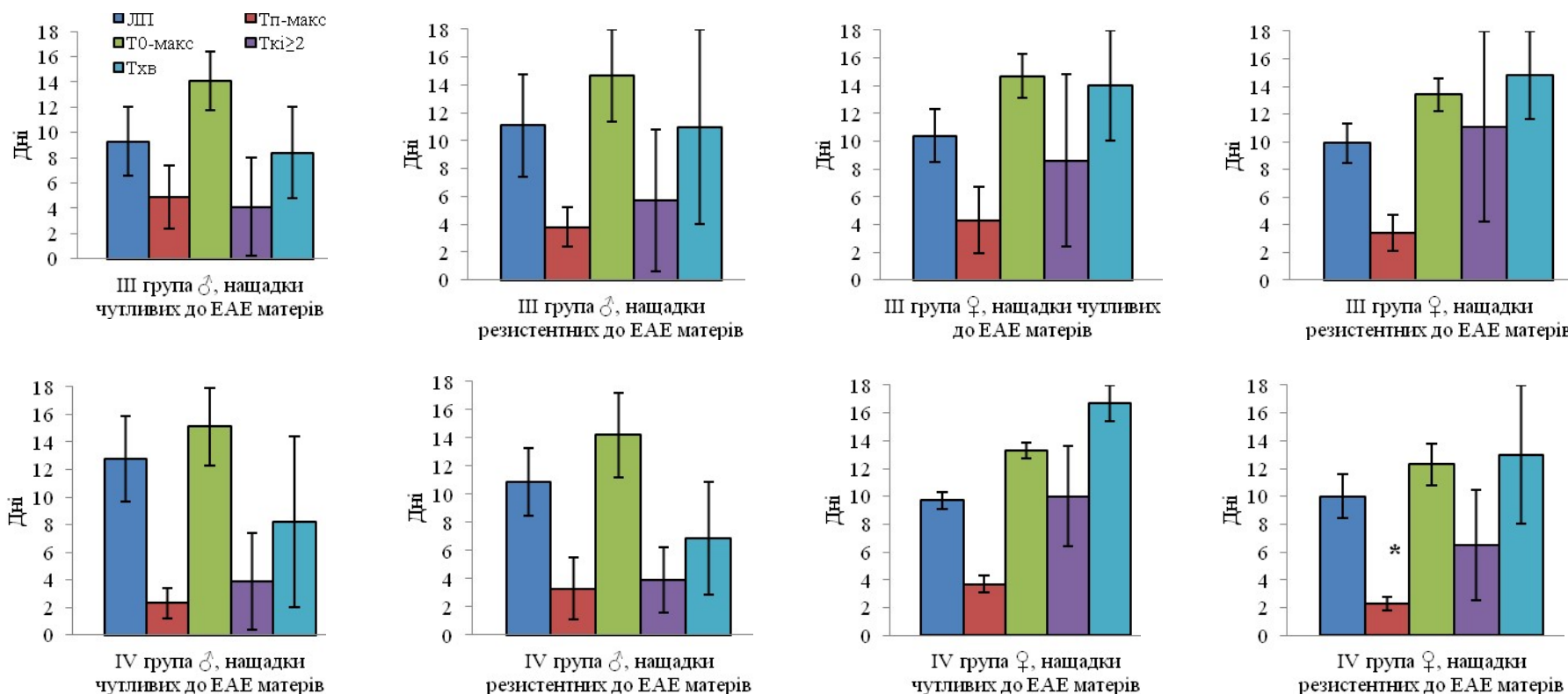


Рис. 3.4 Тривалість етапів перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту у імунізованих у молодому віці тварин, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ

Примітки: III група – тварини, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; IV група – тварини, що зазнали дії пренатального стресу; ЛП – латентний період; Т_{п-макс} – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; Т_{0-макс} – тривалість періоду наростання рухових порушень від імунізації до дня з максимальним показником моторної дисфункції; Т_{ки≥2} – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ; Т_{хв} – тривалість захворювання; * (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно із самками IV групи, чий матері хворіли на ЕАЕ.

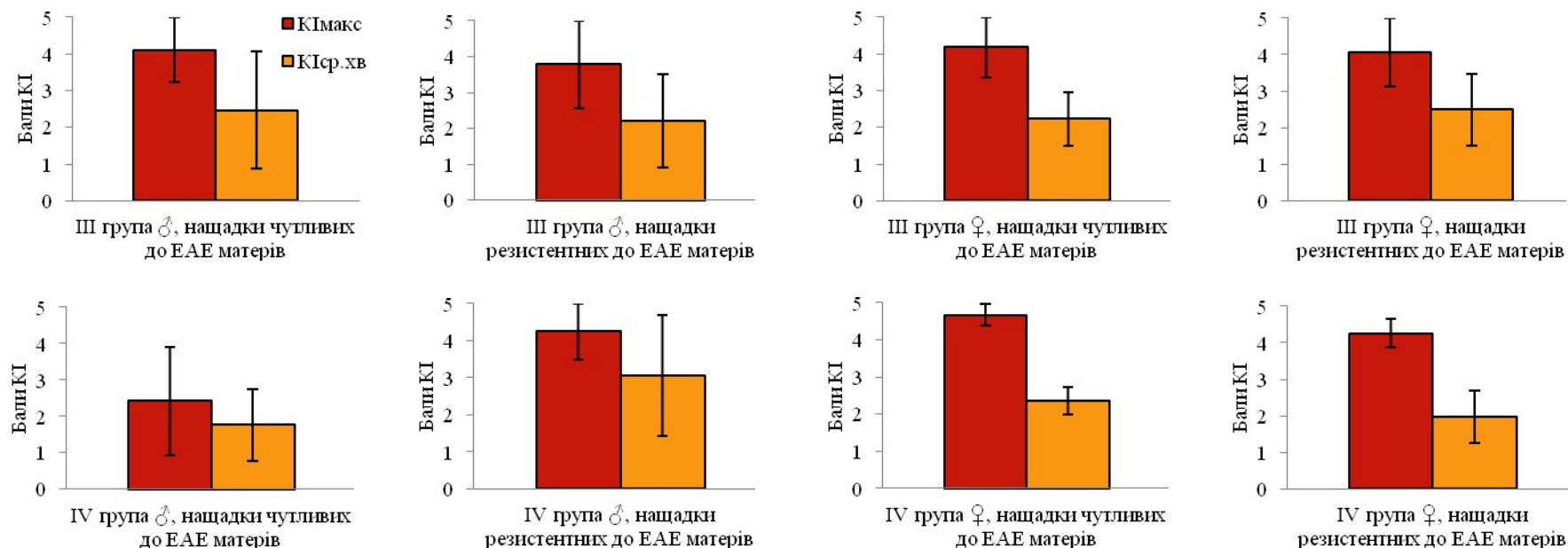


Рис. 3.5 Показники тяжкості перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту у імунізованих у молодому віці тварин, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ

Примітки: III група – тварини, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; IV група – тварини, що зазнали дії пренатального стресу; KI_{макс} – максимальний рівень рухових порушень; KI_{ср.хв} – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби. * - ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками з того ж посліду (група IV-MX-♀) і самців з посліду резистентних матерів (група IV-MP-♂)

Аналіз перебігу ЕАЕ у самок показав, що у пренатально стресованих нащадків резистентних матерів (група IV-MP-♀) розвиток хвороби від першого дня клінічних проявів і до дня максимальних рухових порушень складав $2,3 \pm 0,5$ дня ($T_{\text{п-макс}}$), що було значуще коротшим за самок з посліду чутливих матерів (група IV-MX-♀: $T_{\text{п-макс}} = 3,7 \pm 0,6$ днів; $p \leq 0,05$), а також тривалість цього періоду була меншою, ніж у самок зі стандартними умовами пренатального розвитку (III-MP-♀: $T_{\text{п-макс}} = 3,6 \pm 1,3$ днів; $p = 0,051$) (Рис. 3.4).

Таким чином, було з'ясовано, що умови пренатального розвитку безпосередньо впливають на формування схильності щодо розвитку і тяжкості перебігу ЕАЕ у тварин, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ. Найменший ризик захворюваності та смертності серед молодих щурів визначався комбінованим впливом факторів «жіноча стать» – «чутливість матері до імунізації» – «перенесений пренатальний стрес». Умовою більш легкого перебігу захворювання та виживання нащадків самців за умов індукції ЕАЕ у молодому віці була комбінація таких факторів, як «чутливість матері до індукції ЕАЕ» – «дія хронічного стресу в останню третину періоду ембріонального розвитку».

3.3 Вплив пренатального стресу та чутливості матерів до індукції ЕАЕ на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання ЕАЕ у зрілому віці

3.3.1 Вплив імунізації матерів на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у нащадків-щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання у зрілому віці

З метою дослідження впливу імунізації матерів на схильність щодо розвитку ЕАЕ, у їхніх нащадків було сформовано дві групи щурів, чий пренатальний розвиток проходив у стандартних умовах. Тварини, нащадки інтактних самок, визначалися як V група, а тварини з посліду імунізованих

матерів склали VI групу. Індукція ЕАЕ була проведена у віці від 29 до 35 тижнів, що відповідає 29-35 рокам людини [166].

Сталою практикою дослідження перебігу ЕАЕ у щурів, яка прийнята в лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії ДУ ІНПН НАМН України, є спостереження за розвитком захворювання протягом 30 днів. Через дію нездоланих обставин спостереження за перебігом ЕАЕ у тварин зрілого віку проводилося протягом 20 днів. Досліджувалися рівень захворюваності ЕАЕ, рівень смертності, а також такі показники перебігу ЕАЕ, як тривалість латентного періоду (ЛП), тривалість періоду від перших проявів захворювання і до дня максимальних рухових порушень ($T_{п-макс}$), кількість днів, коли рівень рухових порушень дорівнював або був більше 2-х балів КІ ($T_{KI \geq 2}$), та рівень максимальних рухових порушень ($KI_{макс}$). У ході дослідження можливого впливу імунізації матерів на перебіг ЕАЕ у їхніх нащадків зрілого віку було виявлено, що рівень захворюваності серед нащадків інтактних матерів дорівнював 91,7 % (V група), що практично співпадало з рівнем захворюваності у тварин з посліду імунізованих матерів (VI група – 92,3 %) (Табл. 3.3).

Також не було виявлено різниці у рівні загибелі між тваринами з посліду інтактних матерів та імунізованих на ЕАЕ до вагітності (V група – 0 % і VI група – 4,2 %) (Табл. 3.4). Аналіз рівня захворюваності в залежності від статі показав, що у самців V і VI груп частки хворих на ЕАЕ були приблизно однаковими ($V-\sigma - 100\%$; $VI-\sigma - 87,5\%$) (Табл. 3.3). Також не було виявлено відмінностей за кількістю загиблих серед самців V і VI груп ($V-\sigma - 0\%$; $VI-\sigma - 14,3\%$) (Табл. 3.4). Серед самок з посліду імунізованих на ЕАЕ матерів ознаки захворювання спостерігались у 88,9 % випадків, що практично не відрізнялось від частки хворих самок з посліду інтактних матерів ($V-\phi - 83,3\%$) (Табл. 3.3). Випадків загибелі серед самок V і VI груп зафіксовано не було (Табл. 3.4).

Таблиця 3.3

Рівень сприйнятливості щодо індукції ЕАЕ у щурів зрілого віку, чий ембріональний розвиток пройшов за стандартних умов утримування, в залежності від статі і чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Матері нащадків	Стать нащадків	Кількість нащадків	Захворіли	
					<i>n</i>	% (95 % ДІ)
V	СУ	інтактні	самці	5	5	100,0 (62,1–100,0)
			самки	6	5	83,3 (44,2–98,1)
			всього*	11	10,1	91,7 (64,7–99,0)
VI	СУ	імунізовані на ЕАЕ	самці	8	7	87,5 (54,6–98,6)
			самки	9	8	88,9 (58,6–98,8)
			всього*	17	15,7	92,3 (75,6–99,4)

Примітки: СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена.

Таблиця 3.4

Рівень загибелі за умов індукції ЕАЕ у щурів зрілого віку, чий ембріональний розвиток пройшов за стандартних умов утримування, в залежності від статі і чутливості матерів до індукції ЕАЕ

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Матері нащадків	Стать нащадків	Кількість хворих нащадків	загинули	
					<i>n</i>	% (95 % ДІ)
V	СУ	інтактні	самці	5	0	0,0 (0,0–37,9)
			самки	5	0	0,0 (0,0–37,9)
			всього*	10	0	0,0 (0,00,0–21,7)
VI	СУ	імунізовані на ЕАЕ	самці	7	1	14,3 (1,6–50,1)
			самки	8	0	0,0 (0,0–26,2)
			всього*	15	1,1	7,1 (0,7–27,2)

Примітки: СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена.

У самців, нащадків інтактних матерів (група V-♂), ознаки захворювання спостерігалися після латентного періоду, що тривав $10,8 \pm 1,8$ днів. За $3,0 \pm 1,0$ дні ($T_{\text{п-макс}}$) рівень рухових порушень досягав максимальних значень – $3,25 \pm 1,00$ балів КІ ($T_{\text{макс}}$). Кількість днів, коли показники рухових порушень дорівнювали або були більше 2-х балів КІ ($T_{\text{КІ} \geq 2}$) складала $4,0 \pm 1,2$ днів ($T_{\text{КІ} \geq 2}$) (Рис. 3.6).

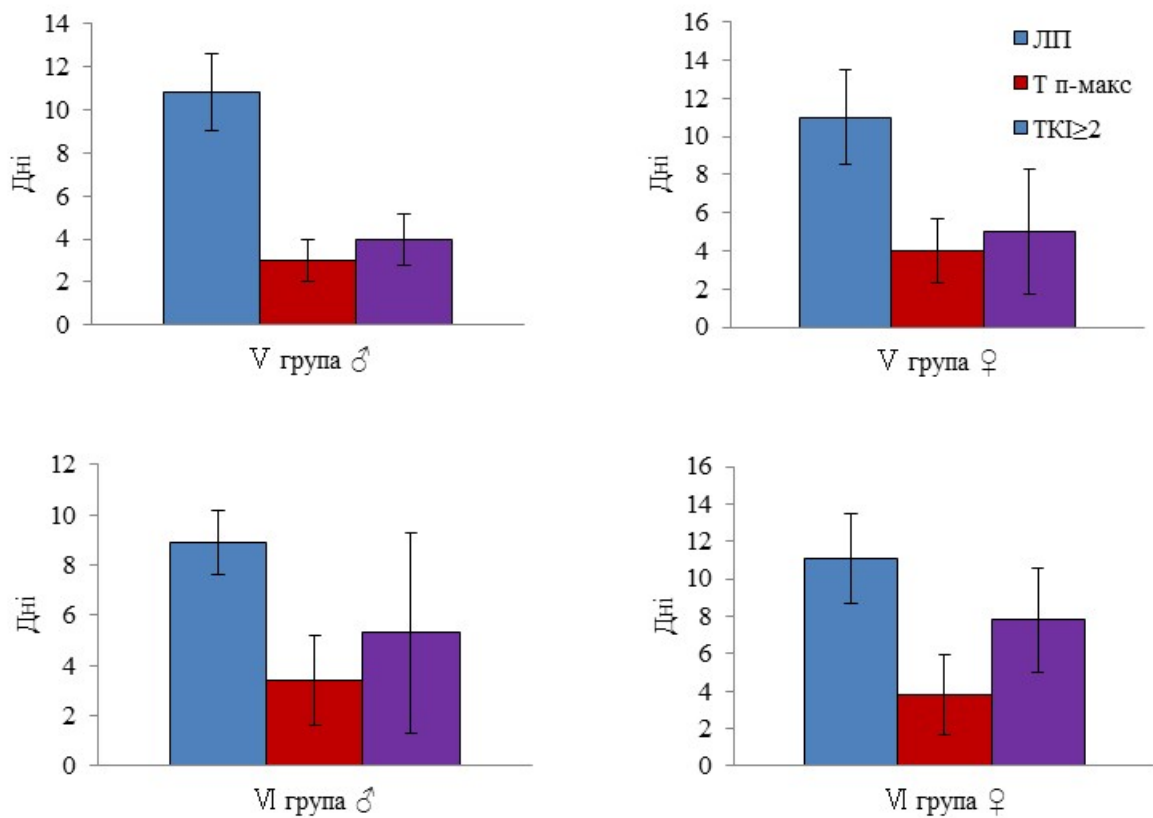


Рис. 3.6 Тривалість етапів перебігу ЕАЕ у імунізованих у зрілому віці тварин, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов.

Примітки: V група ♂ – самці, нащадки інтактних матерів; V група ♀ – самки, нащадки інтактних матерів; VI група ♂ – самці, нащадки імунізованих матерів; VI група ♀ – самки, нащадки імунізованих матерів; ЛП – латентний період; $T_{\text{п-макс}}$ – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; $T_{\text{КІ} \geq 2}$ – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ.

У самців VI групи перші ознаки розвитку хвороби з'явилися за $8,9 \pm 1,3$ днів і досягали максимальних значень за $3,4 \pm 1,8$ днів ($T_{\text{п-макс}}$), що

відповідало $3,86 \pm 1,73$ балам КІ ($T_{\text{макс}}$). Кількість часу, коли показники рухових порушень досягали або були більше 2-х балів КІ ($T_{\text{КІ} \geq 2}$), дорівнювала $5,3 \pm 4,0$ днів (Рис. 3.6; Рис. 3.7). Аналіз перебігу ЕАЕ не виявив статистичної різниці в динаміці захворювання у самців V і VI груп.

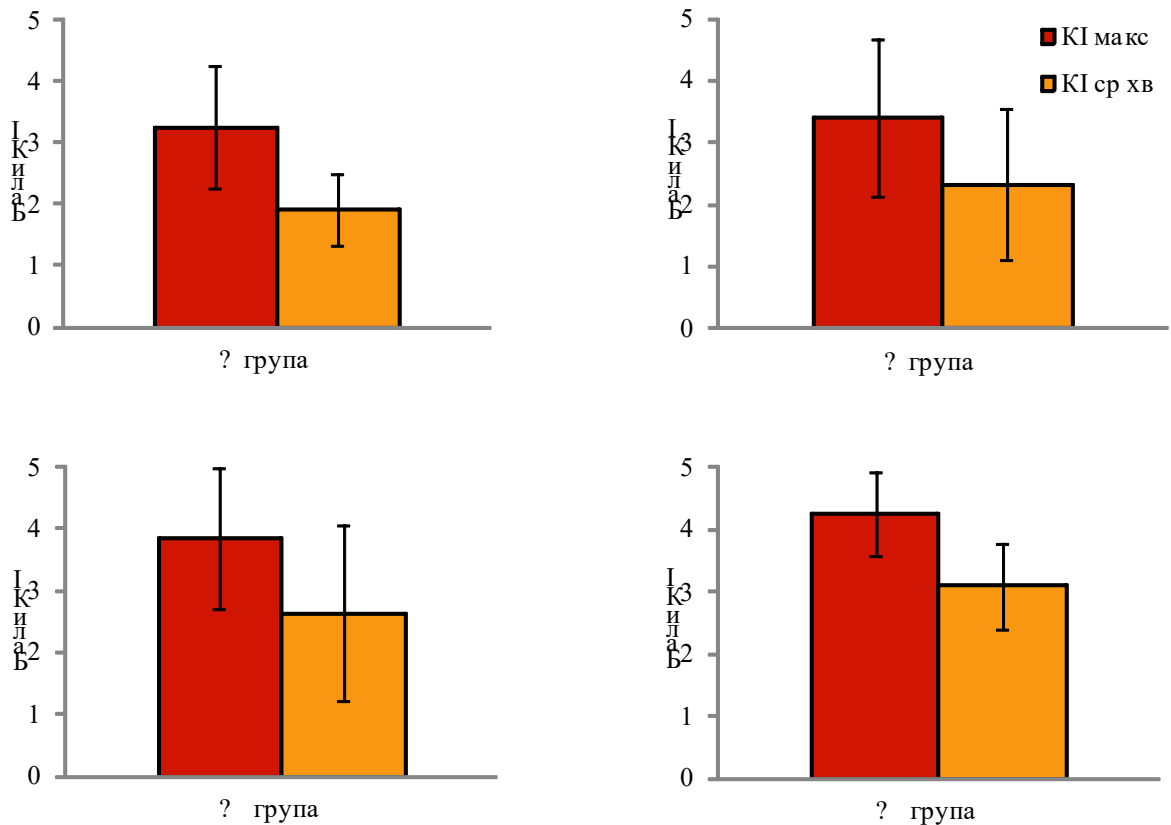


Рис. 3.7 Показники тяжкості перебігу ЕАЕ у імунізованих у зрілому віці тварин, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов

Примітки: V група ♂ – самці, нащадки інтактних матерів; V група ♀ – самки, нащадки інтактних матерів; VI група ♂ – самці, нащадки імунізованих матерів; VI група ♀ – самки, нащадки імунізованих матерів; $KI_{\text{макс}}$ – максимальний рівень рухових порушень; $KI_{\text{ср хв}}$ – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби.

Аналіз рівня захворюваності на ЕАЕ серед самок V і VI груп не виявив різниці за цим показником (група V-♀ – 83,3 %; група VI-♀ – 91,7 %) (Табл. 3.3). За час спостереження не було зафіксовано випадків загибелі серед самок цих груп (Табл. 3.4). Динаміка захворювання у самок з посліду

інтактних матерів (група V-♀) складалась з латентного періоду, який тривав $11,0 \pm 2,5$ днів (ЛП), наростання рівня рухових порушень протягом $4,4 \pm 1,7$ днів ($T_{\text{п-макс}}$) до максимального значення – $3,40 \pm 1,26$ балів КІ ($KI_{\text{макс}}$). Кількість днів з рівнем рухових порушень, які дорівнювали або були більше 2-х балів КІ, складала $4,4 \pm 3,3$ днів. Не було виявлено статистичної різниці у показниках тривалості та тяжкості перебігу ЕАЕ у порівнянні з динамікою ЕАЕ у самок імунізованих матерів (VI-♀: ЛП = $11,1 \pm 2,4$ днів; $T_{\text{п-макс}}$ = $3,8 \pm 2,1$ днів; $T_{KI \geq 2}$ = $7,8 \pm 2,8$ днів; $KI_{\text{макс}}$ = $4,25 \pm 0,67$ балів КІ) (Рис. 3.6; Рис. 3.7).

Таким чином, було виявлено, що імунізація матерів, яка передувала вагітності, не впливала на захворюваність та смертність, а також перебіг ЕАЕ у імунізованих у зрілому віці нащадків, незалежно від їхньої статі.

3.3.2 Вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів різної статі, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, за умов моделювання цього захворювання у зрілому віці

Приймаючи до уваги результати досліджень, які не виявили залежності показників захворюваності, смертності, а також динаміки ЕАЕ у імунізованих в дорослому віці нащадків від проведення індукції ЕАЕ матерям за 50 днів до вагітності, та задля підвищення потужності дослідження, було прийнято рішення провести імунізацію інтактних самок з материнської групи з метою визначення їхньої чутливості до імунізації на ЕАЕ. Дві самки померли з природних причин до проведення імунізації на ЕАЕ, тому їхня чутливість до імунізації на ЕАЕ не була визначена.

Для дослідження впливу пренатального стресу на захворюваність на ЕАЕ, смертність та динаміку цього захворювання було сформовано дві групи дослідних тварин. До кожної групи входили нащадки як чутливих, так і резистентних до імунізації матерів: VII група – тварини, чий ембріональний

розвиток проходив за стандартних умов; VIII група – тварини, які піддавалися дії стресу в третьому триместрі ембріонального розвитку. Серед тварин VIII групи один самець загинув на 4 день після імунізації. Оскільки перша фаза перебігу ЕАЕ (латентний період) триває близько 9 днів [18], така рання загибель не може бути віднесена до випадків загибелі внаслідок розвитку ЕАЕ. Нами було прийнято рішення виключити з аналізу цей випадок.

Аналіз перебігу ЕАЕ у тварин зрілого віку показав, що рівень захворюваності щурів, які піддавалися дії пренатального стресу (VIII група), склав 71,8 % і був нижчим за рівень захворюваності у тварин, чий ембріональний розвиток відбувався за стандартних умов (VII група – 89,5 %), але прийнятного рівня значущості ця різниця не мала ($p=0,08$) (Табл. 3.5). Частина загиблих серед тварин VIII і VII груп була практично однаковою і складала 10,5 % і 4,2 % відповідно (Табл. 3.6).

У ході дослідження рівня захворюваності імунізованих у зрілому віці щурів в залежності від статі було з'ясовано, що серед самців, які зазнали дії пренатального стресу (група VIII-♂), прояви хвороби були зафіксовані у 71,4 %. Цей показник був нижчим за частку хворих серед самців групи порівняння (група VII-♂ – 92,3 %), але ця різниця не була значущою (Табл. 3.5) [175].

Частка загиблих пренатально стресованих самців склала 13,3 %, що було в незначній мірі вище, ніж серед самців VII групи (8,3 %) (Табл. 3.6). Аналіз показників ЕАЕ показав, що у самців з різними умовами пренатального розвитку часові характеристики розвитку даного захворювання не мали відмінностей (група VII-♂: ЛП = $9,7 \pm 1,8$; $Me = 9,5$ днів; $T_{п-макс} = 3,3 \pm 1,4$; $Me = 3,5$ днів; група VIII-♂: ЛП = $11,4 \pm 2,7$; $Me = 11,0$ днів; $T_{п-макс} = 3,3 \pm 1,9$; $Me = 3,0$ днів). Також практично не відрізнялися показники тяжкості перебігу ЕАЕ (група VII-♂: $KI_{макс} = 3,60 \pm 1,44$; $Me = 3,88$ балів KI; $KI_{ср\ хв} = 2,34 \pm 1,16$; $Me = 2,42$ балів KI; група VIII-♂: $KI_{макс} = 3,73 \pm 1,69$; $Me = 4,25$ балів KI; $KI_{ср\ хв} = 2,60 \pm 1,21$; $Me = 2,33$ балів KI) (Рис. 3.8) [175].

Таблиця 3.5

Рівень сприйнятливості щодо індукції ЕАЕ у щурів зрілого віку в залежності від статі, умов пренатального розвитку і чутливості матерів до індукції ЕАЕ

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Чутливість матерів до ЕАЕ	Стать нащадків	Кількість нащадків	захворіли	
					<i>n</i>	% (95 % ДІ)
VII	СУ	хворіли	самці	2	2	100,0 (33,3–100,0)
			самки	6	6	100,0 (67,0–100,0)
			всього*	8	8	100,0 (73,8–100,0)
		резистентні	самці	11	10	90,9 (64,7–99,0)
			самки	9	7	77,8 (45,6–95,1)
			всього*	20	17	85,0 (65,1–95,6)
		всього	самці	13	12	92,3 (69,3–99,2)
			самки	15	13	86,7 (63,7–97,1)
			всього*	28	24,6	89,5 (72,3–96,6)
VIII	ПС	хворіли	самці	4	1	25,0 (2,8–71,6) ^{••}
			самки	2	2	100,0 (33,3–100,0)
			всього*	6	3	50,0 (16,7–83,3) [•]
		резистентні	самці	15	12	80,0 (55,6–94,0)
			самки	16	11	68,8 (44,4–86,9)
			всього*	31	23	74,2 (57,1–87,0)
		не визначено	самці	2	2	100,0 (33,3–100,0)
			самки	—	—	—
			всього	—	—	—
		всього	самці	21	15	71,4 (50,3–87,1)
			самки	18	13	72,2 (48,8–88,5)
			всього*	39	28,0	71,8 (59,3–86,0)

Примітки: ПС – піддавалися дії пренатального стресу; СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена; • ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із тваринами VII групи, нащадками хворих матерів; •• ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із тваринами VIII групи, нащадками резистентних матерів.

Таблиця 3.6

Рівень загибелі за умов індукції ЕАЕ у щурів зрілого віку в залежності від статі, умов пренатального розвитку і чутливості матерів до індукції ЕАЕ

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Чутливість матерів до ЕАЕ	Стать нащадків	Кількість хворих нащадків	загинули	
					<i>n</i>	% (95 % ДІ)
VII	СУ	хворіли	самці	2	0	0,0 (0,0–66,7)
			самки	6	0	0,0 (0,0–33,0)
			всього*	8	0	0,0 (0,0–26,2)
		резистентні	самці	10	1	10,0 (1,1–38,1)
			самки	7	0	0,0 (0,0–29,2)
			всього*	17	1	5,9 (0,7–27,2)
		всього	самці	12	1	8,3 (0,9–32,8)
			самки	13	0	0,0 (0,0–17,3)
			всього*	24,6	1,0	4,2 (0,5–17,9)
VIII	ПС	хворіли	самці	1	0	0,0 (0,0–85,3)
			самки	2	0	0,0 (0,0–66,7)
			всього*	3	0	0,0 (0,0–44,5)
		резистентні	самці	12	1	8,3 (0,9–32,8)
			самки	11	1	9,1 (1,0–35,3)
			всього*	23	2	8,7 (1,9–25,1)
		не визначено	самці	2	1	50,0 (6,1–93,9)
			самки	—	—	—
			всього	—	—	—
		всього	самці	15	2	13,3 (2,9–36,3)
			самки	13	1	7,7 (0,8–30,7)
			всього*	28,0	2,9	10,5 (3,0–27,2)

Примітки: ПС – піддавалися дії пренатального стресу; СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена.

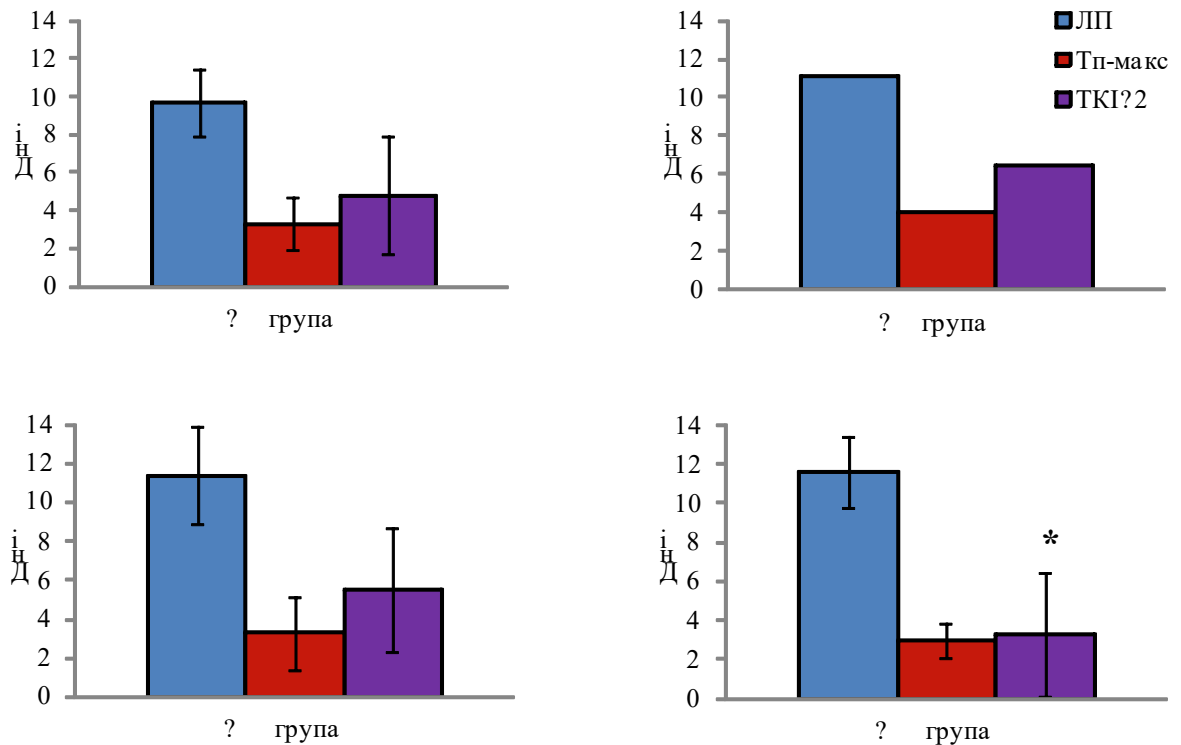


Рис. 3.8 Тривалість етапів перебігу ЕАЕ у імунізованих у зрілому віці тварин, які мали різні умови пренатального розвитку, нащадків матерів з визначеною чутливістю до ЕАЕ

Примітки: VII група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VII група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VIII група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; VIII група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; ЛП – латентний період; Т_{п-макс} – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; Т_{кІ≥2} – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ; * (p≤0,05) – відмінності статистично значущі порівняно із самками VII групи.

Спостерігалася незначуща різниця в кількості хворих серед самок VII і VIII груп (86,7 % і 72,2 % відповідно) (Табл. 3.5). Серед пренатально стресованих самок одна тварина загинула внаслідок важкого перебігу ЕАЕ. В групі самок, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов, випадків загибелі зафіксовано не було (Табл. 3.6). У самок, що зазнали дії пренатального стресу, спостерігалася значуще зниження показників тяжкості перебігу ЕАЕ у порівнянні із самками, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов (група VII-♀: Т_{кІ≥2} = 6,5±3,3; Me=6,0 днів; група VIII-♀:

$T_{KI \geq 2} = 3,3 \pm 3,2$; $Me = 4,0$ днів; $p \leq 0,05$) (група VII-♀: $KI_{\text{макс}} = 3,92 \pm 0,99$; $Me = 4,25$ балів KI; група VIII-♀: $KI_{\text{макс}} = 3,00 \pm 1,48$; $Me = 3,00$ балів KI; $p \leq 0,05$). Показник середнього значення KI за час хвороби у самок VIII групи також виявився нижчим за самок VII групи, але прийнятного рівня значущості ці різниця не набула (група VII-♀: $KI_{\text{ср. хв}} = 2,78 \pm 0,96$; $Me = 2,58$ балів KI; група VIII-♀: $KI_{\text{ср. хв}} = 1,97 \pm 1,24$; $Me = 1,75$ балів KI; $p = 0,057$) (Рис. 3.9).

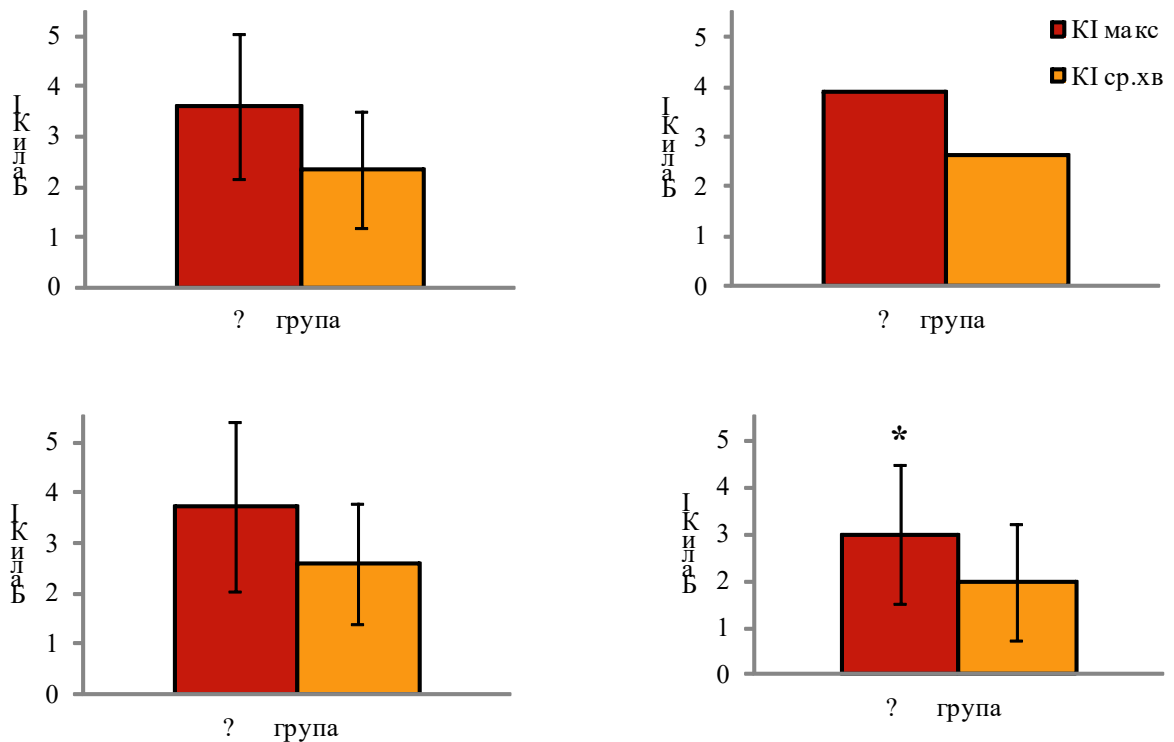


Рис. 3.9 Показники тяжкості перебігу ЕАЕ у імунізованих у зрілому віці тварин, які мали різні умови пренатального розвитку, нащадків матерів з визначеною чутливістю до ЕАЕ

Примітки: VII група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VII група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VIII група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; VIII група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; $KI_{\text{макс}}$ – максимальний рівень рухових порушень; $KI_{\text{ср. хв}}$ – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками VII групи.

Був проведений аналіз рівня захворюваності і перебігу ЕАЕ у тварин в залежності від умов пренатального розвитку і чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ. Серед пренатально стресованих тварин з посліду чутливих щодо індукції ЕАЕ матерів (VIII-MX) хворими виявилися 50 % щурів. Цей показник є дещо нижчим за рівень захворюваності серед нащадків резистентних матерів з тієї ж групи (VIII-MP – 74,2 %) і значуще нижчим за рівень захворюваності серед нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів, чия вагітність проходила у стандартних умовах (VII-MX – 100 %; $p \leq 0,05$) (Табл. 3.5). Аналіз рівня захворюваності в залежності від статі нащадків виявив, що комбінована дія пренатального стресу і чутливості матерів щодо імунізації, в основному, мала протективний ефект для нащадків чоловічої статі. Так, рівень захворюваності самців, чий матері хворіли на ЕАЕ, склав 25 %, що було значуще нижче, ніж серед самців з посліду резистентних матерів (80 %; $p \leq 0,05$) (Табл. 3.5) [175].

Невелика чисельність хворих тварин серед щурів VII і VIII груп, нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів, не дозволяє провести аналіз можливого впливу перенесеного пренатального стресу на перебіг ЕАЕ у цих тварин.

Дослідження впливу пренатального стресу на перебіг ЕАЕ у нащадків резистентних до імунізації матерів не виявило суттєвої різниці щодо динаміки хвороби, а також тяжкості неврологічних порушень у нащадків-самців. У нащадків жіночої статі, що зазнали дії пренатального стресу, показники тяжкості моторної дисфункції були значно нижче, ніж у самок, чий розвиток проходив за стандартних умов (VIII-MP-♀: $T_{KI \geq 2} = 2,5 \pm 2,7$ днів; VII-MP-♀: $T_{KI \geq 2} = 8,1 \pm 2,5$ днів; $p \leq 0,05$), (VIII-MP-♀: $KI_{\max} = 2,80 \pm 1,52$ балів KI; VII-MP-♀: $KI_{\max} = 4,2 \pm 0,7$ балів KI; $p \leq 0,05$), (VIII-MP-♀: $KI_{\text{ср.хв}} = 1,77 \pm 1,22$ балів KI; VII-MP-♀: $KI_{\text{ср.хв}} = 2,80 \pm 0,81$ днів; $p \leq 0,05$) (Рис. 3.10; Рис. 3.11).

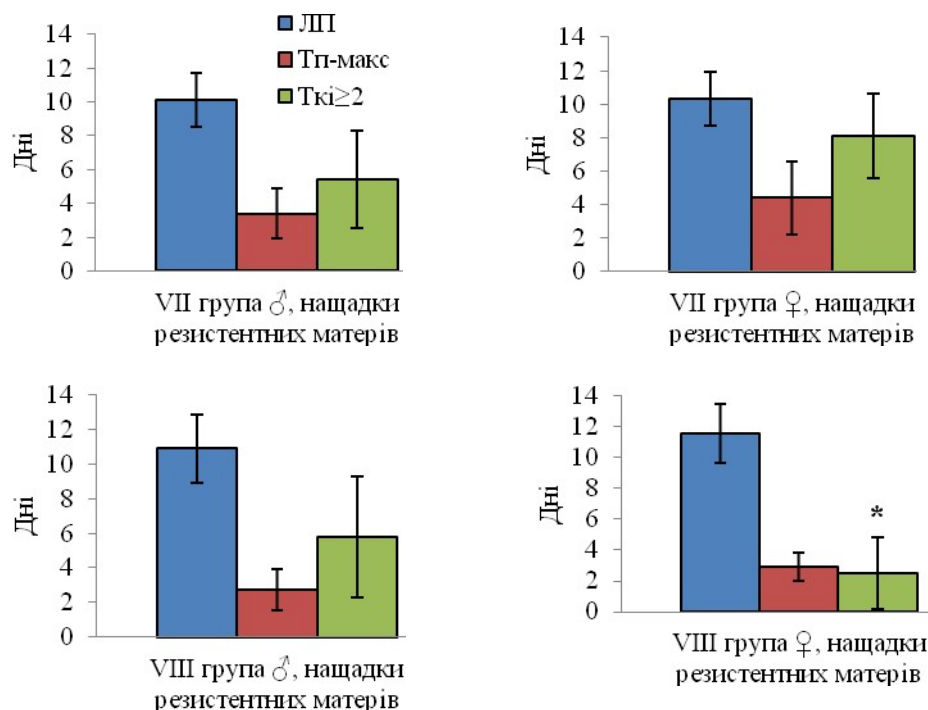


Рис. 3.10 Тривалість етапів перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту у імунізованих у зрілому віці тварин, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів, з різними умовами пренатального розвитку

Примітки: VII група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VII група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VIII група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; VIII група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; ЛП – латентний період; Тп-макс – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; Тки≥2 – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками VII групи, нащадками резистентних матерів.

Таким чином, було з'ясовано, що комбінований вплив перенесеного пренатального стресу та чутливості матері щодо індукції ЕАЕ визначав найменший ризик захворіти на ЕАЕ серед самців, імунізованих у дорослому віці. У самок з посліду резистентних матерів пренатальний стрес асоціюється зі зниженням показників тяжкості перебігу ЕАЕ на відміну від самок, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов.

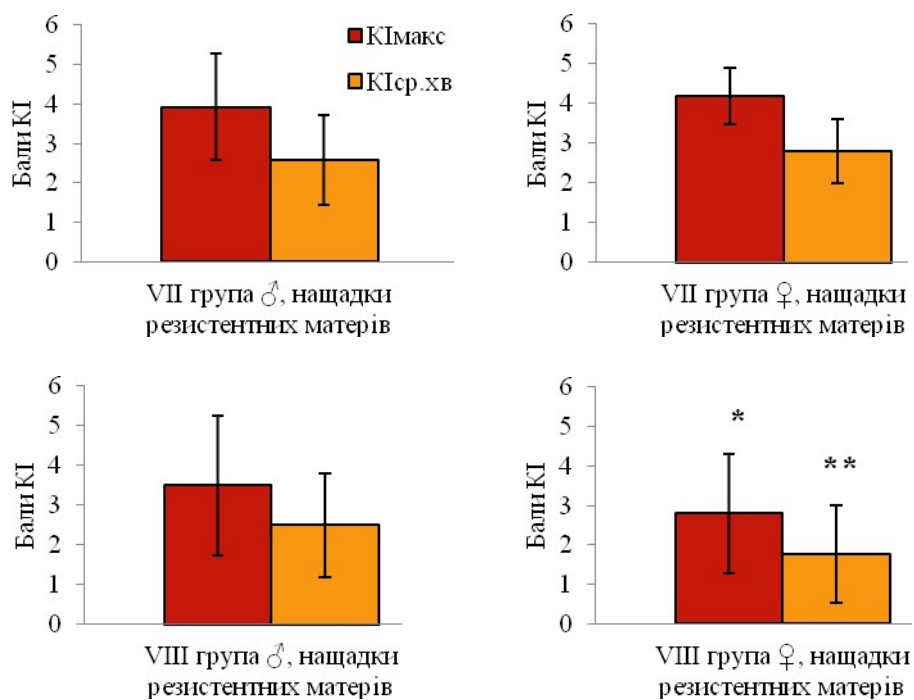


Рис. 3.11 Показники тяжкості перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту у імунізованих у зрілому віці тварин, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів, з різними умовами пренатального розвитку

Примітки: VII група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VII група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VIII група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; VIII група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; KI_{макс} – максимальний рівень рухових порушень; KI_{ср.хв} – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками VII групи, нащадками резистентних матерів; ** ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками VII групи, нащадками резистентних матерів.

Ці дані свідчать про те, що ефект пренатального стресу на перебіг ЕАЕ за умов індукції захворювання щурам у зрілому віці залежить від статі нащадків та реакції матерів на імунізацію.

3.4 Вплив пренатального стресу на захворюваність і перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів різної статі за умов моделювання цього захворювання у пубертатному віці

Початок РС у віці до 18 років спостерігається лише в 1,7-5,6 % всіх випадків цього захворювання [121] і характеризується деякими особливостями перебігу у порівнянні з динамікою захворювання у дорослих хворих. Так, у педіатричних хворих відзначається більш висока частота рецидивів. Другий приступ розвивається за менший проміжок часу, ніж у дорослих, проте відновлення після приступу у дітей відзначається за більш короткий проміжок і проходить більше часу до настання незворотної інвалідності [139].

Для вивчення особливостей перебігу ЕАЕ у щурів пубертатного віку проводилася імунізація двох груп тварин. Тварини, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов утримання, складали ІХ групу, а тварини, нащадки матерів, чия вагітність протікала під дією неunikного стресу, сформували Х групу. Індукція ЕАЕ була проведена у віці 13 тижнів, що відповідає 13 рокам людини [166].

В ході дослідження впливу пренатального стресу на перебіг ЕАЕ у тварин за умов моделювання цього захворювання у пубертатному віці було з'ясовано, що рівень захворюваності у нащадків матерів, чия вагітність проходила під дією неунікаючого стресу (Х група), склав 63,4 %, що було вище, ніж серед тварин, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов (ІХ група) – 37,8 %, однак прийнятого рівня значущості ця різниця не набула ($p=0,057$) (Табл. 3.7) [143, 174]. Частка тварин серед пренатально стресованих щурів, що загинули внаслідок імунізації, склала 33,4 %, що було незначуще вище, ніж серед тварин, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов (16,3 %) (Табл. 3.8).

Таблиця 3.7

Рівень сприйнятливості щодо індукції ЕАЕ у щурів пубертатного віку в залежності від статі та умов пренатального розвитку

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Стать нащадків	Кількість нащадків	Захворіли	
				<i>n</i>	% (95 % ДІ)
ІХ	СУ	самці	23	10	43,5 (25,0–63,5)
		самки	25	8	32,0 (16,4–51,5)
		всього*	48	18,1	37,7 (24,9–51,6)
Х	ПС	самці	10	6	60,0 (30,4–84,7)
		самки	9	6	66,7 (34,8–89,6)
		всього*	19	12,0	63,3 (40,9–81,8)

Примітки: ПС – піддавались дії пренатального стресу; СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена.

Таблиця 3.8

Рівень загибелі за умов індукції ЕАЕ у щурів пубертатного віку в залежності від статі та умов пренатального розвитку

Група	Пренатальний розвиток нащадків	Стать нащадків	Кількість нащадків	Загинули	
				<i>n</i>	% (95 % ДІ)
ІХ	СУ	самці	10	2	20,0 (4,4–50,3)
		самки	8	1	12,5 (1,4–45,4)
		всього*	18,1	2,9	16,3 (4,9–38,1)
Х	ПС	самці	6	3	50,0 (16,7–83,3)
		самки	6	1	16,7 (1,9–55,8)
		всього*	12,0	4,0	33,4 (12,5–61,2)

Примітки: ПС – піддавались дії пренатального стресу; СУ – розвиток проходив за стандартних умов; *n* – кількість нащадків; * – дані наведені як середня арифметична зважена.

Аналіз показників перебігу ЕАЕ у тварин, імунізованих у пубертатному віці, залежно від умов пренатального розвитку, показав, що у самців зі стандартними умовами ембріонального розвитку (група ІХ-♂) перші ознаки

хвороби були зафіксовані після $10,5 \pm 2,2$ днів (ЛП). Максимальні значення рівня рухових порушень спостерігалися за $2,5 \pm 1,6$ днів ($T_{п-макс}$), досягаючи $4,10 \pm 1,39$ балів КІ моторної дисфункції на піку захворювання ($KI_{макс}$). Хвороба тривала $8,7 \pm 4,5$ днів ($T_{хв}$) із середнім показником тяжкості перебігу, що дорівнював $2,41 \pm 1,33$ балів КІ ($KI_{ср.хв}$). Кількість днів, коли рівень рухових порушень дорівнював або був більше 2 балів КІ, складала $4,3 \pm 2,0$ днів ($T_{ki \geq 2}$) (Рис. 3.12; Рис. 3.13).

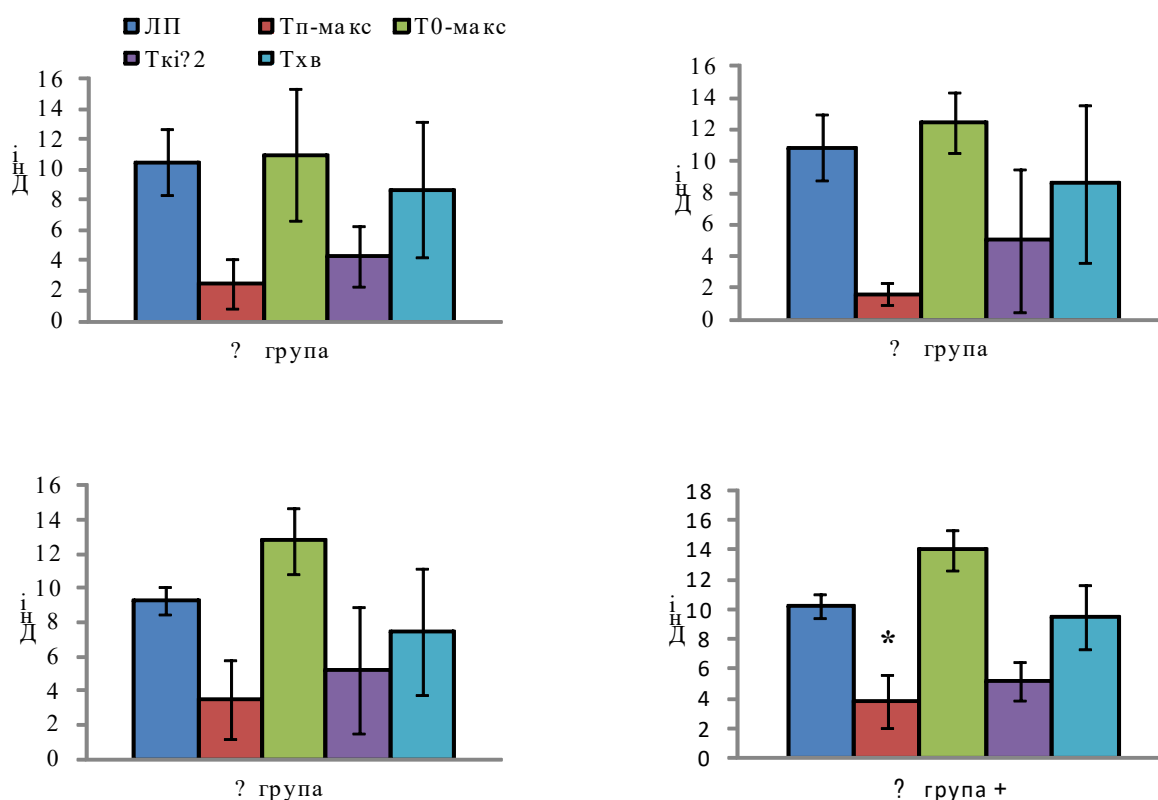


Рис. 3.12 Тривалість етапів перебігу ЕАЕ у тварин, імунізованих у пубертатному віці, з різними умовами пренатального розвитку

Примітки: IX група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; IX група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; X група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; X група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; ЛП – латентний період; $T_{п-макс}$ – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; $T_{0-макс}$ – тривалість періоду наростання рухових порушень від імунізації до дня з максимальним показником моторної дисфункції; $T_{ki \geq 2}$ – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2-х балів КІ; $T_{хв}$ – тривалість захворювання; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із самками IX групи.

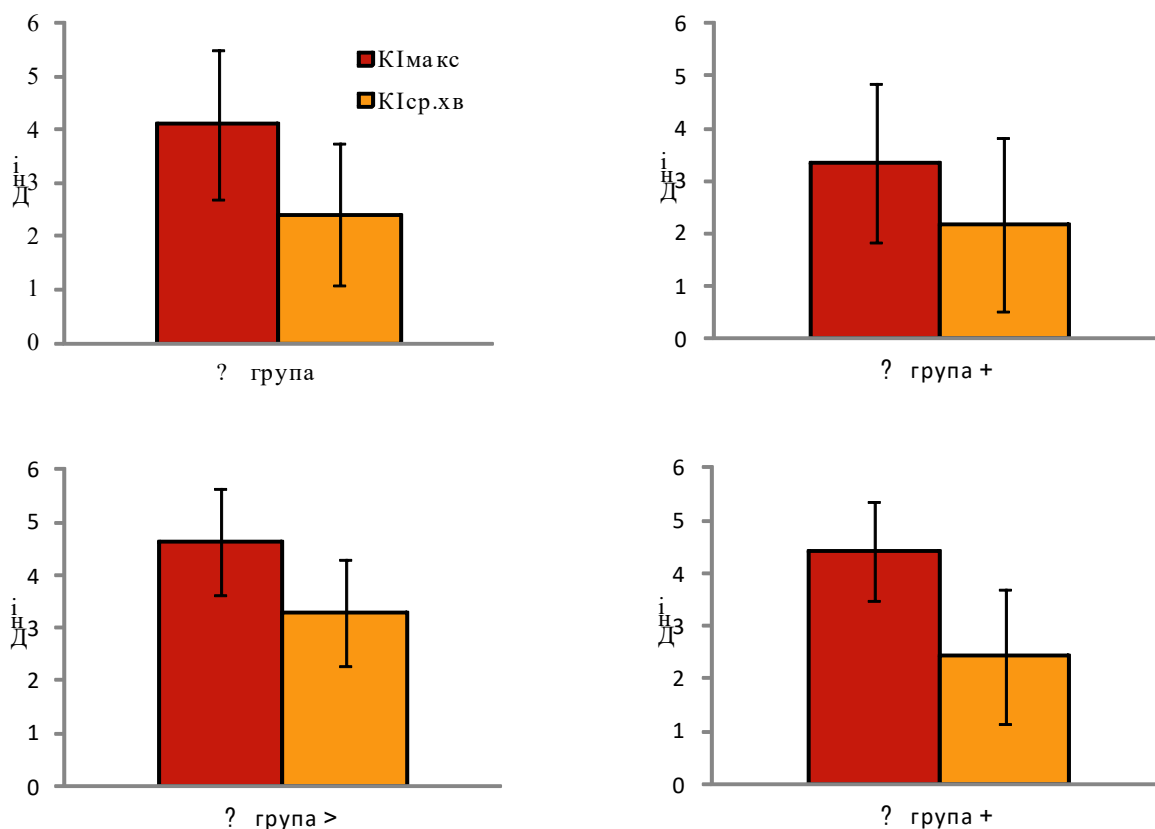


Рис. 3.13 Показники тяжкості перебігу ЕАЕ у імунізованих в пубертатному віці тварин з різними умовами пренатального розвитку

Примітки: IX група ♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; IX група ♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; X група ♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; X група ♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; $KI_{\text{макс}}$ – максимальний рівень рухових порушень; $KI_{\text{ср.хв}}$ – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби.

За показниками часових етапів захворювання і тяжкості моторних порушень перебіг ЕАЕ у самців IX групи суттєво не відрізнявся від динаміки захворювання у пренатально стресованих самців X групи (група X-♂: ЛП = $9,33 \pm 0,8$ днів; $T_{\text{п-макс}}$ = $3,5 \pm 2,3$ днів; $KI_{\text{макс}}$ = $4,63 \pm 1,80$ балів KI; $T_{\text{хв}}$ = $7,5 \pm 3,7$ днів; $KI_{\text{ср.хв}}$ = $3,28 \pm 1,62$ балів KI; $T_{ki \geq 2}$ = $5,2 \pm 3,7$ днів) (Рис. 3.12; Рис. 3.13).

Аналіз перебігу ЕАЕ у самок з різними умовами пренатального розвитку виявив, що у тварин, які зазнали дії пренатального стресу, період від дня перших проявів захворювання до дня з максимальними показниками рухових

порушень тривав $3,8 \pm 1,8$ днів ($T_{\text{п-макс}}$), що було значно вище, ніж у самок IX групи ($T_{\text{п-макс}} = 1,6 \pm 0,7$ днів; $p \leq 0,05$). У пренатально стресованих самок максимальний рівень рухових порушень, був вище, ніж у самок, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов (група X-♀: $KI_{\text{макс}} = 4,42 \pm 0,92$ балів KI; група IX-♀: $KI_{\text{макс}} = 3,34 \pm 1,51$ балів KI; $p = 0,059$). Водночас, такі показники перебігу захворювання, як тривалість латентного періоду, тривалість хвороби і середньодобовий показник рівня рухових порушень, не мали суттєвих відмінностей у самок з різними умовами пренатального розвитку (група X-♀: ЛП = $10,2 \pm 0,7$ днів; $T_{\text{хв}} = 9,5 \pm 2,1$ днів; $KI_{\text{ср.хв}} = 2,43 \pm 1,27$ балів KI; група IX-♀: ЛП = $10,9 \pm 2,1$ днів; $T_{\text{хв}} = 8,6 \pm 5,0$ днів; $KI_{\text{ср.хв}} = 2,18 \pm 1,66$ балів KI) (Рис. 3.12; Рис. 3.13).

Таким чином, було виявлено, що під впливом пренатального стресу у тварин, імунізованих у пубертатному віці, спостерігається тенденція щодо підвищення ризику захворіти на ЕАЕ. У пренатально стресованих самок відзначається пролонгування часу від дня перших проявів захворювання до дня з максимальними показниками рухових порушень, що призводить до тенденції щодо збільшення рівня максимальних рухових порушень.

3.5 Динаміка захворюваності на експериментальний аутоімунний енцефаломієліт у щурів різної статі з різними умовами пренатального розвитку за умов моделювання цього захворювання

Захворюваність на РС має специфічну часову динаміку. Лише до 5,6 % випадків РС починається у віці до 18 років [121]. Настання віку статевої зрілості супроводжується значним підвищенням ризику захворіти на РС, так у 67,7 % хворих перший епізод настав у віці від 20 до 40 років [30]. Перебіг захворювання супроводжується накопичуванням пошкоджень нервової тканини і зрештою призводить до незворотної інвалідизації. Дослідження впливу різноманітних факторів на вік початку захворювання має велике значення для профілактики ранньої захворюваності на РС.

Аналіз вікової динаміки захворюваності тварин в залежності від умов пренатального розвитку проводився з використанням даних про частку хворих серед тварин пубертатного віку (групи IX і X), даних про захворюваність тварин молодого віку, що були розраховані як середня арифметична зважена (групи (I+III) і (II+IV)), і даних про чутливість щодо розвитку ЕАЕ у тварин зрілого віку (групи VII і VIII).

У тварин зі стандартними умовами розвитку найменше хворіли щури пубертатного віку (IX група: 37,7 %, $n=48$) [143, 174]. Ця кількість була значно менше як у порівнянні з кількістю хворих серед тварин, імунізованих у молодому віці (група (I+III): 87,6 %, $n=70$; $p \leq 0,05$), так і з тваринами, яким індукція ЕАЕ проводилася у зрілому віці (VII група: 87,8 %, $n=28$; $p \leq 0,05$) (Рис. 3.14) [174]. Ця динаміка співпадає з епідеміологічними даними, які свідчать про зв'язок ризику розвитку РС і ступеня статевої зрілості людини.

Хронічний неунікний стрес, що впливав на матерів в останній триместр вагітності, призвів до зміни динаміки захворюваності на ЕАЕ у нащадків. Частки хворих серед пренатально стресованих тварин пубертатного, молодого і зрілого віку статистично не відрізнялися (X група: 63,3 %, $n=19$; група (II+IV): 63,7 %, $n=80$; VIII група: 71,8 %, $n=39$). Така динаміка захворюваності у щурів різних вікових груп сформувалася за рахунок більш високої схильності до розвитку захворювання в пубертатному віці [143, 174], істотно меншої чутливості до індукції ЕАЕ у тварин молодого віку і більш низьких показників захворюваності серед щурів зрілого віку на відміну від тварин відповідних вікових груп порівняння (Рис. 3.14).

Таким чином, спостерігається безпосередній вплив пренатального стресу на вікову динаміку захворюваності на ЕАЕ у щурів. У тварин, що зазнали дії пренатального стресу, підвищується ризик захворіти на ЕАЕ за умов індукції цього захворювання у пубертатному віці та зменшується чутливість щодо розвитку ЕАЕ за умов імунізації у віці репродуктивної зрілості до розвитку ЕАЕ за умов імунізації у віці репродуктивної зрілості [174].

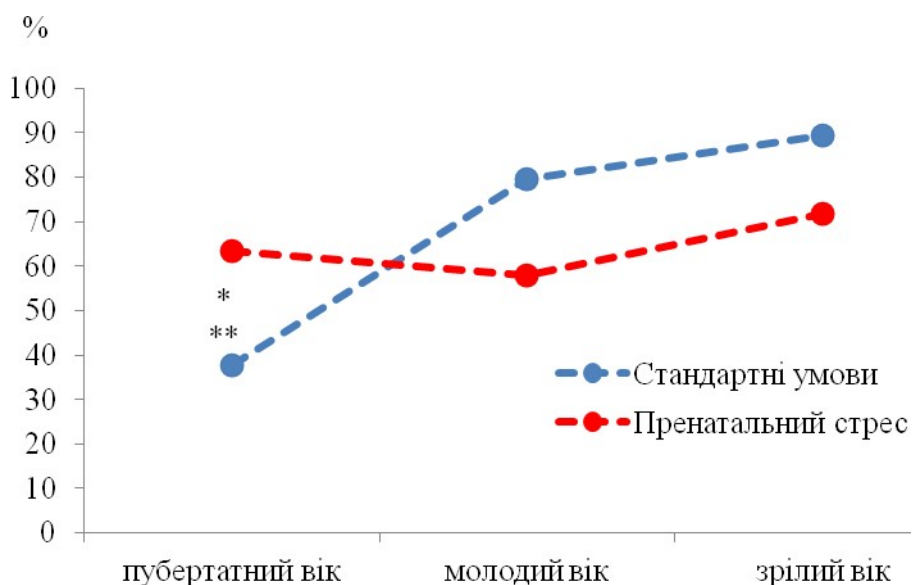


Рис. 3.14 Захворюваність щурів на ЕАЕ в залежності від віку та умов пренатального розвитку

Примітки: Стандартні умови – групи IX (імуновані у пубертатному віці), I+III (імуновані у молодому віці) і VII (імуновані у зрілому віці); Пренатальний стрес – групи X (імуновані у пубертатному віці), II+IV (імуновані у молодому віці) і VIII (імуновані у зрілому віці); * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із тваринами, імунованими у молодому віці (група I+III); ** ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно із тваринами, імунованими у зрілому віці (група VII).

Така динаміка свідчить про нівелювання фактору віку імунізації на показники захворюваності у пренатально стресованих щурів, тоді як низька захворюваність тварин пубертатного віку і значно вищі рівні чутливості до індукції ЕАЕ молодих і зрілих щурів зі стандартними умовами утримання демонструють залежність чутливості щодо розвитку ЕАЕ від віку імунізації.

3.6 Вплив неunikного стресу, що діяв на вагітних самок у третьому триместрі вагітності, на показники систолічного артеріального тиску

Дослідження впливу хронічного неunikного стресу на показники систолічного артеріального тиску (САТ) у вагітних самок виявило, що

утримання тварин за умов цілодобового освітлення та періодичної іммобілізації в боксі призводило до значущого підвищення САТ (144 ± 10 мм. рт. ст.) у порівнянні з рівнем САТ за стандартних умов утримання (120 ± 17 мм. рт. ст., $p \leq 0,05$) (Рис. 3.15).

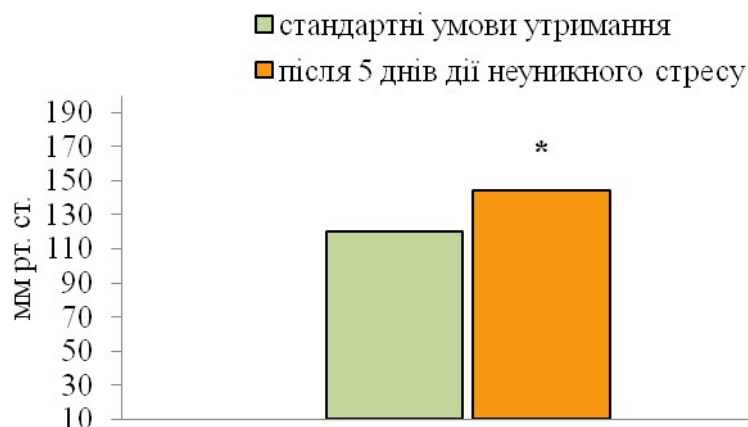


Рис. 3.15 Показники систолічного артеріального тиску у вагітних самок в залежності від умов утримання

Примітка: * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі.

Таким чином, було виявлено, що одним з наслідків впливу хронічного неунікного стресу на вагітних самок було стійке підвищення САТ.

Висновки до розділу 3

1. Створення моделей для вивчення впливу окремих факторів, що діють протягом ембріонального розвитку тварини на формування схильності щодо розвитку і перебігу ЕАЕ, є потужним інструментом вивчення патогенезу цього захворювання.

2. Виявлено, що умови пренатального розвитку безпосередньо впливають на формування схильності щодо розвитку та тяжкості перебігу ЕАЕ у тварин, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ.

3. Показано, що ефект від дії пренатального стресу на формування схильності щодо розвитку і перебігу ЕАЕ залежить від комбінованого впливу

факторів: «перенесений пренатальний стрес»—«вік імунізації тварин»—«стать нащадків»—«чутливість матерів щодо індукції ЕАЕ».

4. Встановлено, що перенесений пренатальний стрес призводить до зміни вікової динаміки захворюваності на ЕАЕ. У тварин, що зазнали дії пренатального стресу, рівні захворюваності за умов індукції ЕАЕ у пубертатному, молодому і зрілому віці практично співпадали. В той же час у тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов, рівень захворюваності залежав від віку імунізації: щури пубертатного віку хворіли на ЕАЕ значуще менше, ніж тварини молодого і зрілого віку. Зміни в динаміці захворюваності сформувалися за рахунок підвищення частки хворих серед пренатально стресованих тварин пубертатного віку, значного зниження кількості хворих серед тварин молодого віку і зниження частки чутливих щодо розвитку ЕАЕ тварин серед щурів зрілого віку у порівнянні з тваринами відповідного віку, чий розвиток проходив за стандартних умов.

5. Виявлено, що перенесений пренатальний стрес у поєднанні з віком імунізації, статтю тварин і чутливістю матерів до індукції ЕАЕ призводить до зміни ризику захворюваності та перебігу ЕАЕ. При індукції ЕАЕ у молодому віці комбінація таких факторів, як: «чутливість матері до індукції ЕАЕ»—«дія пренатального стресу», була умовою виживання та більш легкого перебігу захворювання у нащадків-самців. Найменший ризик смертності серед молодих щурів визначався комбінованим впливом таких факторів, як: «жіноча стать»—«чутливість матері до імунізації»—«пренатальний стрес». При індукції ЕАЕ у зрілому віці найменший ризик захворюваності спостерігався у пренатально стресованих самців з посліду чутливих до імунізації матерів. Спільна дія факторів: «резистентність матері до індукції ЕАЕ»—«пренатальний стрес», призвела у самок до зниження показників тяжкості перебігу ЕАЕ.

Матеріали розділу опубліковані [143, 164, 174, 175, 176].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ НА РІВЕНЬ СТЕРОЇДНИХ ГОРМОНІВ ТА АНЕКСИНУ А-1 У ЩУРІВ ЗРІЛОГО ВІКУ

4.1 Вплив пренатального стресу на рівень статевих гормонів у щурів різної статі, нащадків матерів з різною чутливістю щодо індукції ЕАЕ, за умов моделювання експериментального аутоімунного енцефаломієліту

Стать і рівень статевих гормонів відіграють важливу роль у формуванні ризику захворюваності та впливають на показники перебігу РС. Жінки хворіють на РС приблизно у 3 рази частіше за чоловіків [17, 87, 115, 153]. Причому найбільша кількість нових випадків захворювання зустрічається у 25-35 років, – тобто у віці статевої зрілості [4, 100]. В періоди менопаузи і постменопаузи відзначається зниження кількості нових випадків захворювання серед жінок [89]. Настання вагітності, яке супроводжується значними змінами у рівні статевих гормонів, зменшує ризик розвитку чергового епізоду захворювання, а в перші 3 місяці після пологів частота рецидивів істотно збільшується [29, 52].

У чоловіків та жінок перебіг РС має деякі відмінності. Так, у чоловіків частіше спостерігається первинно-прогресивний перебіг, більш виражене пошкодження мозочка та аксонів у спинному мозку. В цілому, якщо захворювання починається у віці близько 30 років, чоловіки мають гірший прогноз перебігу РС у порівнянні з жінками. В той же час на початку захворювання пізніше 50 років прогрес РС у чоловіків та жінок відбувається аналогічно [1].

Нажаль, недостатнє фінансування не дозволило провести всі заплановані визначення рівня статевих гормонів у щурів зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку та в повному обсязі дослідити взаємодію пренатального стресу і чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ на гормональний статус тварин та особливості перебігу даного захворювання. У

тварин, що загинули внаслідок тяжкого перебігу ЕАЕ, кров для визначення рівня гормонів не збирали. Таким чином, аналіз проводився лише у тварин, що вижили. Рівні тестостерону (Test), естрадіолу (Estr) і прогестерону (Prog) визначалися у самців зрілого віку, чий розвиток проходив за стандартних умов (група VII-♂, $n=12$); у пренатально стресованих самців зрілого віку (група VIII-♂, $n=19$) та у пренатально стресованих самок зрілого віку (група VIII-♀, $n=17$).

Раніше було показано, що хоча доля захворілих серед пренатально стресованих самців була нижчою за групу контролю, проте відмінності у захворюваності не досягали прийнятого рівня значущості. Не було виявлено різниці щодо рівня захворюваності серед тварин VII групи в залежності від чутливості матерів до індукції ЕАЕ. Серед пренатально стресованих щурів самці з посліду чутливих матерів хворіли значно менше, ніж нащадки стійких до індукції ЕАЕ самок (Розділ 3.3.2; табл. 3.5).

4.1.1 Рівень статевих гормонів у самців зрілого віку в залежності від умов пренатального розвитку

Дослідження рівня статевих гормонів у самців з різними умовами пренатального розвитку показало, що рівень тестостерону у самців VIII і VII груп практично не відрізнявся (група VIII-♂ ($n=19$): Test = $5,38 \pm 7,03$ нмоль/л, $Me = 3,00$; група VII-♂ ($n=12$): Test = $7,29 \pm 6,38$ нмоль/л, $Me = 4,94$; $p=0,27$), а рівень естрадіолу у самців, що зазнали дії пренатального стресу, був значно нижчим у порівнянні з VII групою (група VIII-♂: Estr = $0,60 \pm 0,29$ нмоль/л, $Me = 0,58$; група VII-♂: $0,86 \pm 0,42$ нмоль/л, $Me = 0,84$; $p \leq 0,05$) [175].

Не було виявлено різниці щодо рівня прогестерону у самців з різними умовами ембріонального розвитку (група VIII-♂: Prog = $72,90 \pm 20,88$ нмоль/л, $Me = 71,60$; група VII-♂: Prog = $67,97 \pm 19,55$ нмоль/л, $Me = 63,97$) (Рис. 4.1) [175].

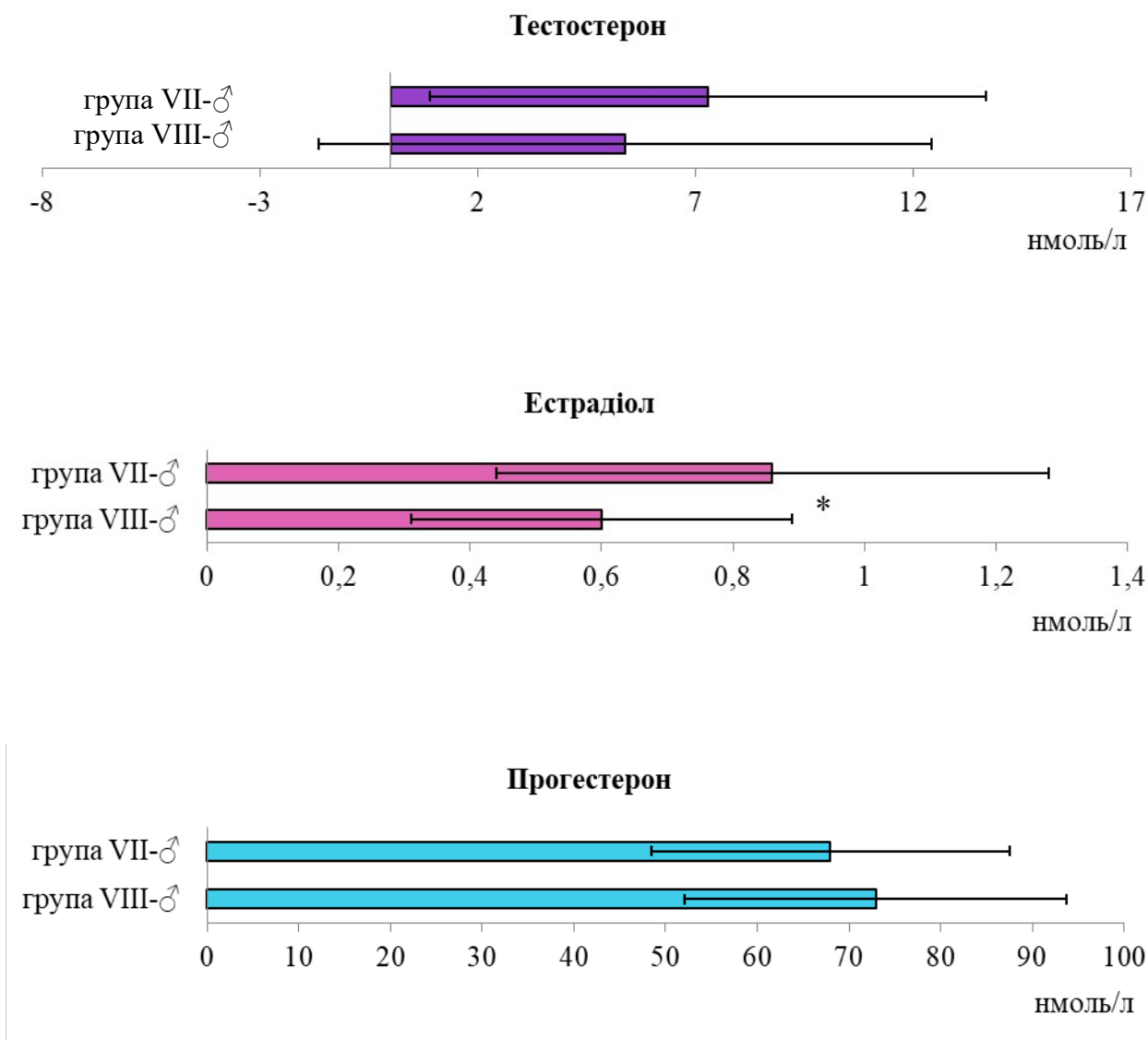


Рис. 4.1 Вміст статевих гормонів у сироватці крові самців зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку

Примітки: група VII-♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем естрадіолу у самців VII групи.

Таким чином, було виявлено, що пренатальний стрес призвів до істотного зниження рівня естрадіолу у самців у порівнянні з тваринами, чий розвиток проходив за стандартних умов утримання. Умови пренатального розвитку не мали суттєвого впливу на рівні тестостерону у самців у зрілому віці.

4.1.2 Рівень статевих гормонів у щурів зрілого віку в залежності від статі, умов пренатального розвитку та їхньої чутливості до індукції ЕАЕ

Аналіз рівня статевих гормонів у залежності від умов пренатального розвитку та реакції самців на індукцію ЕАЕ показав, що рівні тестостерону та естрадіолу у пренатально стресованих самців, що хворіли на ЕАЕ, були дещо нижчими, ніж у чутливих до індукції ЕАЕ тварин групи контролю, але прийнятого рівня значущості ця різниця не досягала (група VIII-♂-чутливі ($n=13$): Test = $4,98 \pm 8,16$ нмоль/л, $Me = 1,66$; Estr = $0,60 \pm 0,32$ нмоль/л, $Me = 0,56$; група VII-♂-чутливі ($n=11$): Test = $6,18 \pm 5,33$ нмоль/л, $Me = 2,38$; Estr = $0,86 \pm 0,44$ нмоль/л, $Me = 0,82$) (Рис. 4.2) [175]. Нажаль, дослідити вплив умов пренатального розвитку на рівень статевих гормонів у резистентних самців не дозволяє мінімальна кількість тварин VII групи ($n=1$), але треба зазначити, що рівень тестостерону у цієї тварини виявився вищим за максимальне значення гормону, що спостерігався у самців з ЕАЕ, а рівень прогестерону – нижчим за мінімальний показник захворілих тварин (група VII-♂-резистентні: Test = 19,53 нмоль/л, Prog = 29,96 нмоль/л; група VII-♂-чутливі: Test = $6,18 \pm 5,33$ нмоль/л, $Me = 2,38$, min = 1,70 нмоль/л, max = 17,73 нмоль/л; Prog = $71,42 \pm 16,21$ нмоль/л, $Me = 63,78$, min = 51,45 нмоль/л, max = 96,11 нмоль/л) (Рис. 4.2). Пренатально стресовані самці, які виявилися резистентними до індукції ЕАЕ, мали істотно вищий рівень тестостерону, ніж самці, що хворіли на ЕАЕ (група VIII-♂-резистентні: Test = $6,23 \pm 4,07$ нмоль/л, $Me = 4,42$; група VIII-♂-чутливі: Test = $2,90 \pm 3,39$ нмоль/л, $Me = 1,66$; $p \leq 0,05$) (Рис. 4.2) [175].

Дослідження можливого зв'язку рівня статевих гормонів і типу відповіді на імунізацію показало, що у пренатально стресованих самок, які хворіли на ЕАЕ, рівень тестостерону був значно меншим, ніж у резистентних щодо розвитку ЕАЕ самок (група VIII-♀-чутливі ($n=12$): Test = $0,98 \pm 0,44$ нмоль/л, $Me = 0,90$; група VIII-♀-резистентні ($n=6$): Test = $2,32 \pm 1,51$ нмоль/л,

$Me = 1,81$; $p \leq 0,05$). Рівень естрадіолу у самок, чутливих до розвитку ЕАЕ, був нижче, ніж у резистентних тварин, але прийнятного рівня значущості ця різниця не набула (група VIII-♀-чутливі: $Estr = 0,55 \pm 0,22$ нмоль/л, $Me = 0,60$; група VIII-♀-резистентні: $Estr = 1,16 \pm 0,80$ нмоль/л, $Me = 0,87$; $p = 0,13$).

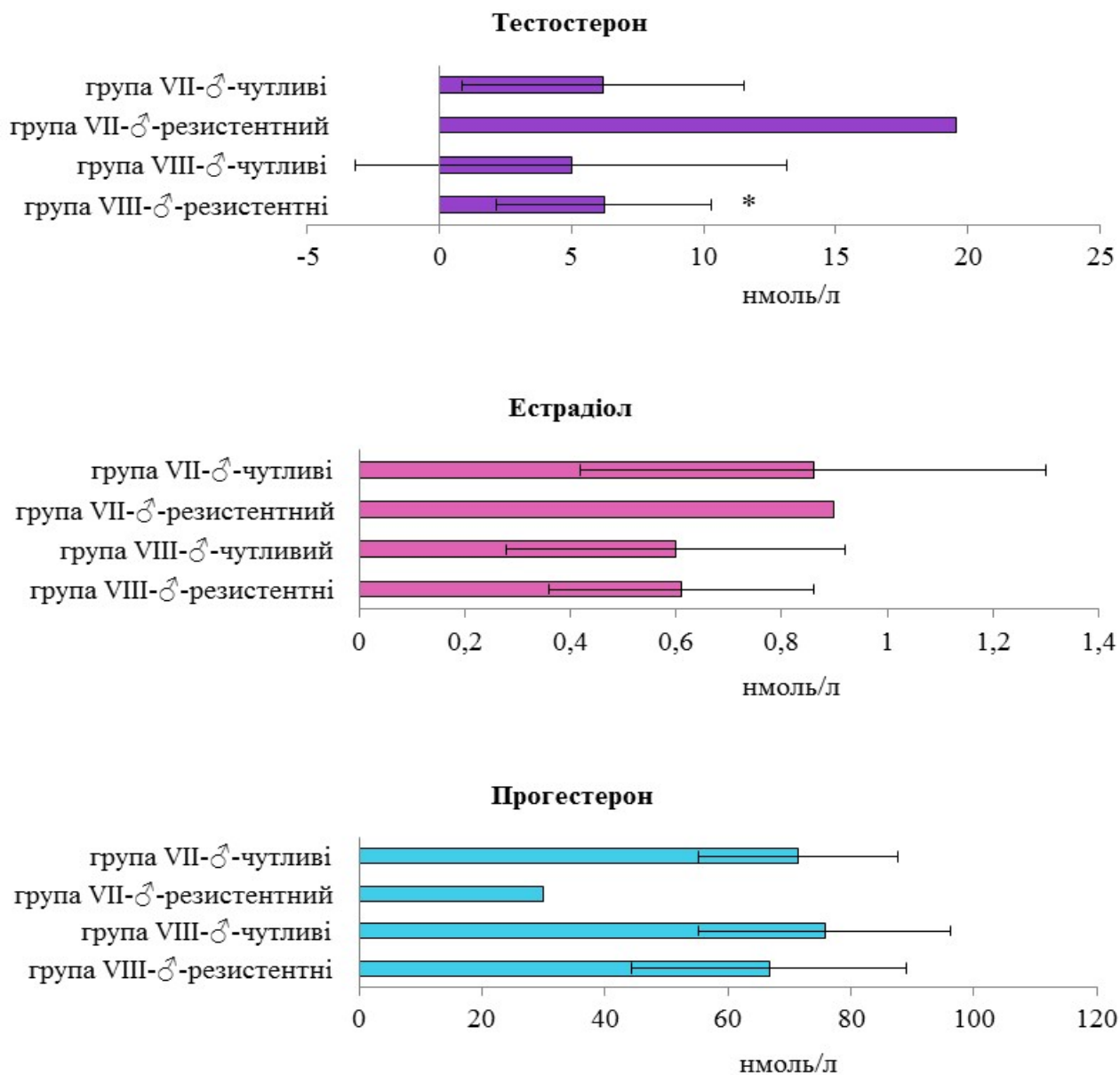


Рис. 4.2 Вміст статевих гормонів у сироватці крові самців зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку та з урахуванням їхньої чутливості щодо індукції ЕАЕ

Примітки: група VII-♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем тестостерону у самців VIII групи, які хворіли на ЕАЕ.

Не було виявлено різниці щодо рівня прогестерону у пренатально стресованих самок в залежності від їхньої чутливості до індукції ЕАЕ (група VIII-♀-чутливі ($n=12$): Prog = $97,09 \pm 21,94$ нмоль/л, $Me = 98,06$; група VIII-♀-резистентні ($n=5$): Prog = $102,53 \pm 12,58$ нмоль/л, $Me = 108,87$) (Рис. 4.3).

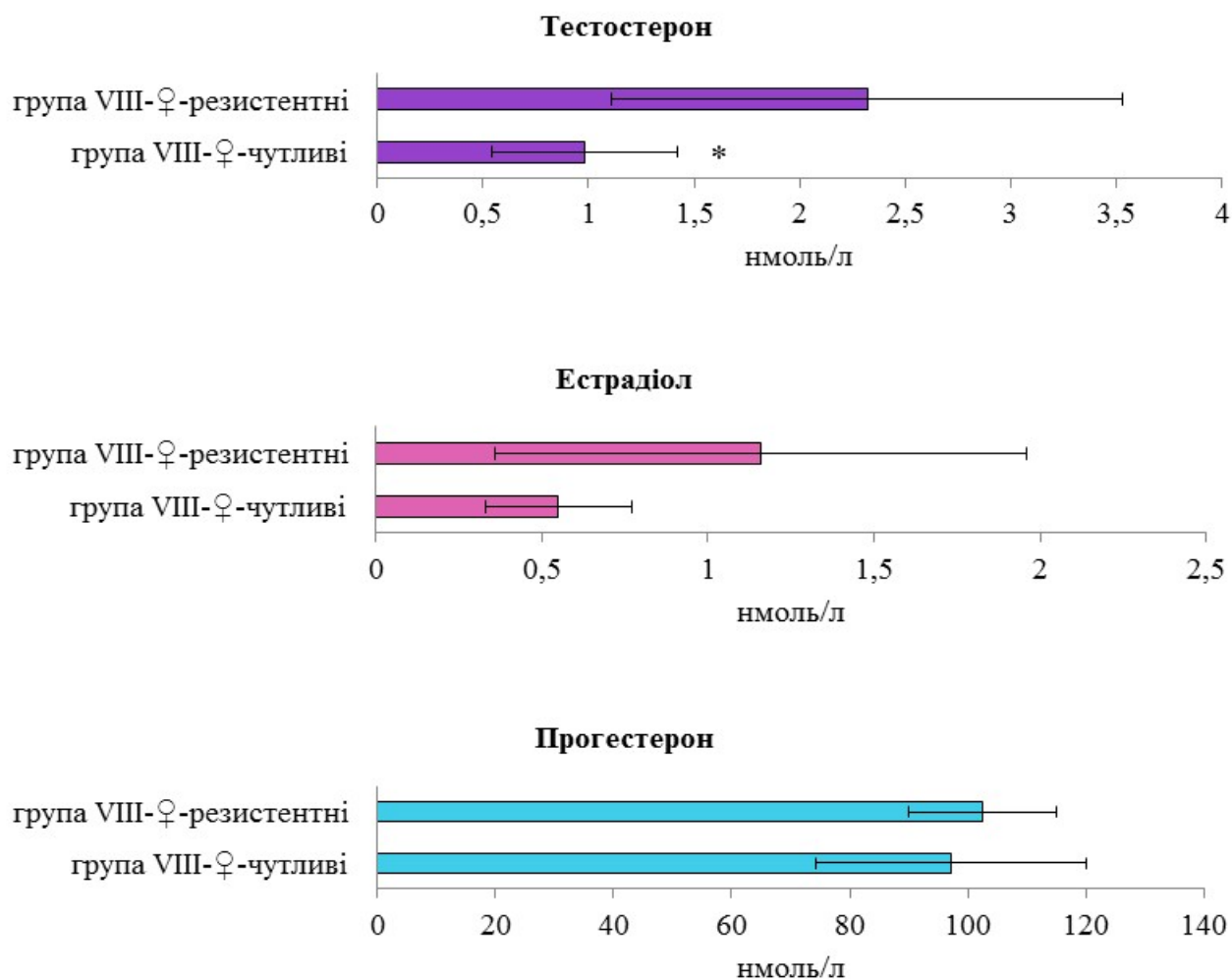


Рис. 4.3 Вміст статевих гормонів у сироватці крові самок зрілого віку з різною чутливістю щодо індукції ЕАЕ

Примітки: група VIII-♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем тестостерону у самок VIII групи, резистентних до ЕАЕ.

Таким чином, у пренатально стресованих тварин обох статей резистентність щодо індукції ЕАЕ корелювала із суттєво вищими

показниками тестостерону. Отже, в ході дослідження було виявлено, що рівень статевих гормонів у самців зрілого віку залежав від впливу умов пренатального розвитку і були пов'язані із чутливістю тварин до індукції ЕАЕ. У пренатально стресованих самок більш високі показники тестостерону асоціювалися із резистентністю до імунізації.

4.2 Вплив пренатального стресу на зміну рівнів кортикостерону та анексину-A1 у щурів зрілого віку, різної статі за умов розвитку ЕАЕ

Гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова ось відіграє важливу роль у підтримці гомеостазу як у нормі, так і при патологічних станах. Глюкокортикоїди, що синтезуються наднирковою залозою, діють практично на клітини всіх типів завдяки експресії в них глюкокортикоїдних рецепторів (ГКР). У більшості випадків ефекти ГКР опосередковуються їх вторинним месенжером анексином-A1 (АнА1). Зокрема, під контролем АнА1 знаходиться процес формування щільних зв'язків між клітинами ендотелію, які забезпечують вибіркову проникність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Брак цього регулятора призводить до порушення цілісності ГЕБ та підвищення міграції молекул та лейкоцитів у ЦНС [33]. Анексин-A1 відіграє важливу роль як у системі вродженого, так і адаптивного імунітету, під його контролем перебувають як про-, так і протизапальні ефекти глюкокортикоїдів [118].

Через недостатнє фінансування дослідження рівнів АнА1 і кортикостерону у сироватці крові було проведене лише у частини щурів VII і VIII груп (Табл. 4.1).

Визначення вмісту кортикостерону та АнА1 проводилося у сироватці крові, забір якої у щурів здійснювали двічі: за 7 днів до індукції ЕАЕ та на 10 день після імунізації. Перший забір сироватки крові для визначення вмісту аналітів відповідав стану здоров'я. Десятий день після індукції ЕАЕ був обраний нами як момент розвитку хвороби, який співпадає з періодом

порушення структурної цілісності ГЕБ [54]. Дані представлені як середня арифметична та стандартне відхилення ($\bar{x} \pm Std.dev.$).

Таблиця 4.1

Кількість проведених досліджень

Група	Матері нащадків	Стать нащадків	Чутливість нащадків	Кількість тварин	Визначень вмісту кортикостерону	Визначень вмісту Ана1
VII	резистентні до ЕАЕ	самці	хворіли	8	5	5
			резистентні	1	—	—
		самки	хворіли	7	5	5
			резистентні	2	—	—
	чутливі до ЕАЕ	самці	хворіли	2	—	—
			резистентні	—	—	—
		самки	хворіли	6	2	2
			резистентні	—	—	—
	інтактні	самці	хворіли	2	2	2
			резистентні	—	—	—
VIII	резистентні до ЕАЕ	самці	хворіли	10	7	7
			резистентні	5	3	3
		самки	хворіли	11	4	4
			резистентні	5	5	5
	чутливі до ЕАЕ	самці	хворіли	1	—	—
			резистентні	3	3	3
		самки	хворіли	2	2	2
			резистентні	—	—	—
	інтактні	самці	хворіли	2	1	1
		самки	резистентні	—	—	—

Примітки: VII група – тварини, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; VIII група – тварини, які піддавалися дії стресу в третьому триместрі ембріонального розвитку.

Був проведений аналіз дат, які суттєво відхиляються за своїм значенням від інших. Дати впорядковувалися у відповідності з їхнім зростанням. Перевірка належності занадто малої дати до генеральної сукупності проводилася згідно з формулою:

$$t_{1min} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}, \quad (4.1)$$

де

x_1 – перша дата, можливий артефакт;

x_2 – друга дата;

x_n – остання дата.

Якщо розрахований критерій t дорівнював або був більшим за табличне значення, то приймали рішення про відхилення нульової гіпотези щодо приналежності x_1 до генеральної сукупності [161].

Перевірка належності двох занадто малих дат до генеральної сукупності проводилася згідно з формулою:

$$t_{2min} = \frac{x_3 - x_1}{x_n - x_1}, \quad (4.2)$$

де

x_1 – перша дата, один з можливих артефактів;

x_3 – третя дата;

x_n – остання дата.

Якщо розрахований критерій t дорівнював або був більшим за табличне значення, то приймали рішення про відхилення нульової гіпотези щодо приналежності сумнівних дат до генеральної сукупності [161].

4.2.1 Вплив індукції ЕАЕ на динаміку рівнів кортикостерону та анексину-А1 у щурів зрілого віку в залежності від статі тварин та їхньої чутливості до розвитку захворювання

Вплив умов пренатального розвитку на динаміку рівнів кортикостерону та Ана1 після імунізації досліджувався у щурів різної статі, які відрізнялися типом відповіді щодо індукції ЕАЕ. Визначення рівнів кортикостерону та Ана1 показало, що у чутливих до ЕАЕ самців зі стандартними умовами ембріонального розвитку (група VII-♂, що хворіли на ЕАЕ) вміст кортикостерону у сироватці крові до індукції ЕАЕ складав $12,13 \pm 1,68$

нмоль/л ($n=7$), а АНА1 – $6,64 \pm 0,88$ нмоль/л ($n=5$). На 10 день після індукції ЕАЕ рівень стероїдного гормону практично не змінився – $11,63 \pm 0,59$ нмоль/л ($n=7$), а зниження рівня АНА1 не було значущим – $5,67 \pm 0,88$ нмоль/л ($n=7$) (Рис. 4.4; Рис. 4.5) [144].

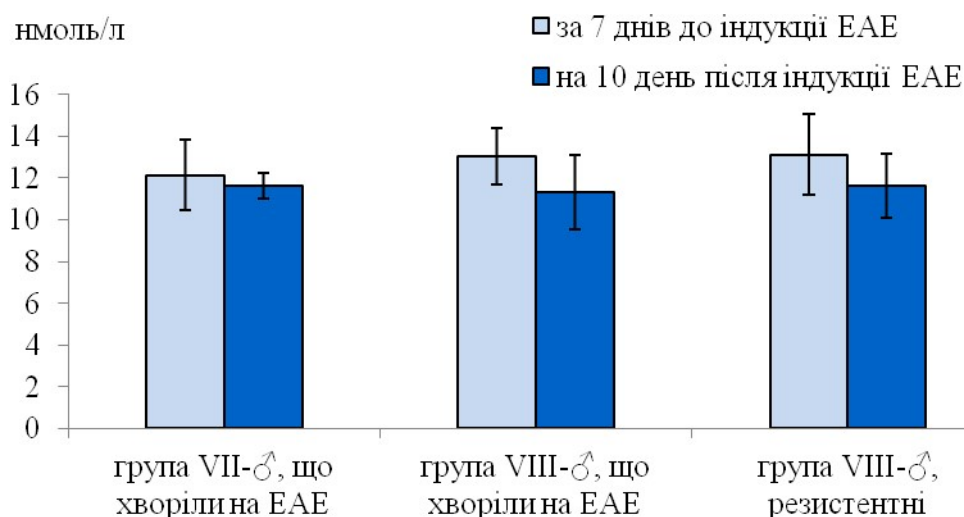


Рис. 4.4 Вміст кортикостерону у сироватці крові самців зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку та з урахуванням їхньої чутливості до індукції ЕАЕ

Примітки: група VII-♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу.

У пренатально стресованих самців, які після імунізації захворіли на ЕАЕ (група VIII-♂, що хворіли на ЕАЕ), вміст кортикостерону за 7 днів до імунізації складав $13,04 \pm 1,36$ нмоль/л ($n=8$), а АНА1 – $6,31 \pm 0,56$ нмоль/л ($n=8$). На 10 день після імунізації у самців відзначалося зниження концентрації кортикостерону до $11,32 \pm 1,79$ нмоль/л ($n=7$), але прийняттого рівня значущості ця різниця не досягла ($p=0,07$). Разом з цим, було зафіксовано значне зниження АНА1 – $5,39 \pm 0,38$ нмоль/л ($n=7$; $p \leq 0,05$) (Рис. 4.4; Рис. 4.5).

Водночас у резистентних до розвитку ЕАЕ самців VIII групи до імунізації рівні кортикостерону та АНА1 складали відповідно

13,13±1,96 нмоль/л ($n=6$) і 5,85±0,67 нмоль/л ($n=6$). Відсутність чутливості до індукції ЕАЕ супроводжувалася відсутністю істотних змін щодо рівня стероїдного гормону та його вторинного месенжеру Ана1 на 10 день після імунізації – 11,61±1,53 нмоль/л ($n=5$) і 5,52±1,02 нмоль/л ($n=5$) відповідно (Рис. 4.4; Рис. 4.5).

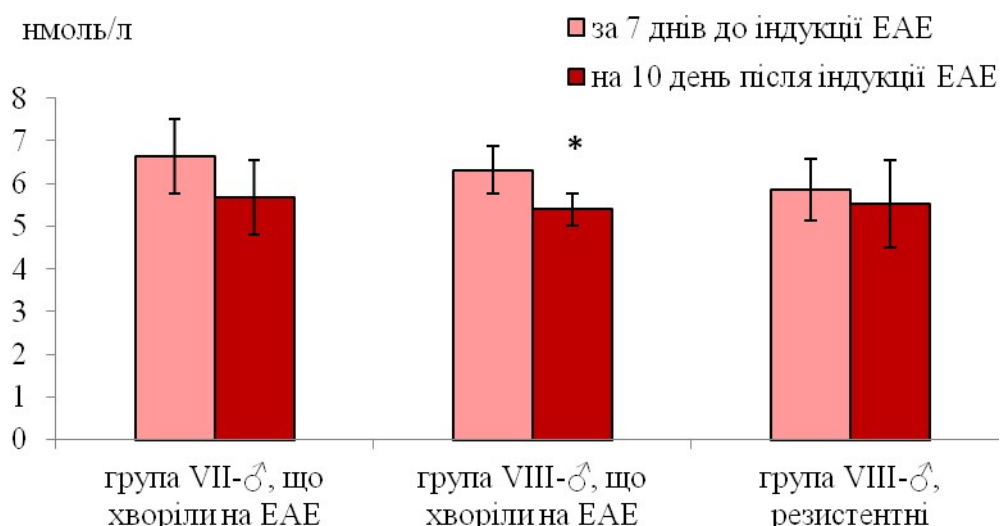


Рис. 4.5 Вміст анексину-А1 у сироватці крові самців зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку та з урахуванням їхньої чутливості до індукції ЕАЕ

Примітки: група VII-♂ – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♂ – самці, що зазнали дії пренатального стресу; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем Ана1 до індукції ЕАЕ у самців VIII групи, чутливих до розвитку ЕАЕ.

Аналіз вмісту кортикостерону та Ана1 залежно від умов пренатального розвитку не виявив суттєвих відмінностей у рівнях кортикостерону та Ана1 у самців VII групи, які хворіли на ЕАЕ, як до індукції ЕАЕ, так і на 10 день після неї. Поєднання перенесеного пренатального стресу та чутливості до індукції ЕАЕ призводить до тенденції до зниження рівня кортикостерону та суттєвого зниження рівня анексину-А1 після імунізації (Рис. 4.4; Рис. 4.5).

Аналіз вмісту кортикостерону та Ана1 до і після індукції ЕАЕ у чутливих самок з різними умовами ембріонального розвитку показав, що у

самок VII групи до індукції вміст стероїдного гормону та його вторинного месенжера складав $12,83 \pm 1,14$ нмоль/л ($n=7$) і $7,13 \pm 1,04$ нмоль/л ($n=6$) відповідно. Не було виявлено суттєвих змін щодо рівня кортикостерону на 10 день після індукції ЕАЕ – $12,17 \pm 0,79$ нмоль/л ($n=7$). В той же час різниця щодо рівня АНА1 майже досягла прийнятного рівня значущості – $6,19 \pm 0,48$ нмоль/л ($n=7$; $p=0,051$) (Рис. 4.6; Рис. 4.7).

У чутливих до розвитку ЕАЕ самок VIII групи за 7 днів до імунізації рівень кортикостерону складав $12,85 \pm 0,53$ нмоль/л ($n=6$), а АНА1 – $6,58 \pm 0,21$ нмоль/л ($n=5$). На 10 день після імунізації у самок знижувалася концентрація кортикостерону – $11,40 \pm 1,39$ нмоль/л ($n=5$), але прийнятного рівня значущості ця різниця не досягла ($p=0,08$). Разом з цим, було зафіксовано істотне зниження рівня АНА1 – $4,51 \pm 0,79$ нмоль/л ($n=6$; $p \leq 0,05$) (Рис. 4.6; Рис. 4.7).

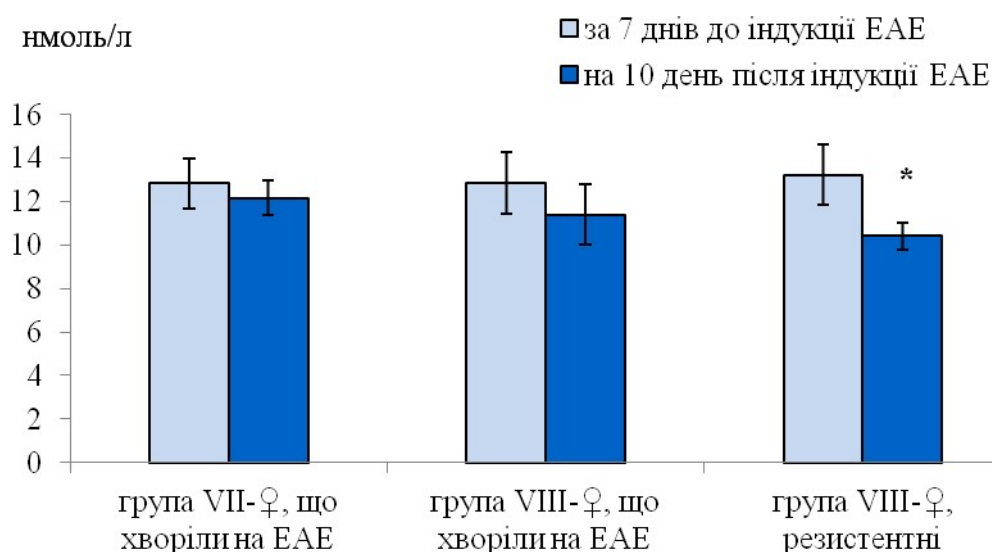


Рис. 4.6 Вміст кортикостерону у сироватці крові самок зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку та з урахуванням їхньої чутливості до індукції ЕАЕ

Примітки: група VII-♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем кортикостерону за 7 днів до індукції ЕАЕ у самок VIII групи, резистентних до розвитку ЕАЕ.

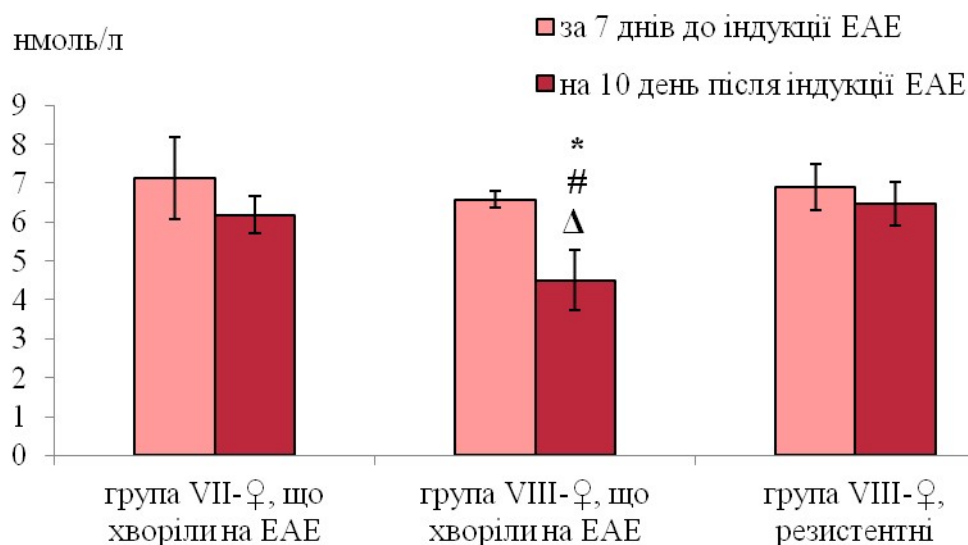


Рис. 4.7 Вміст анексину-А1 у сироватці крові самок зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку та з урахуванням їхньої чутливості до індукції ЕАЕ

Примітки: група VII-♀ – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♀ – самки, що зазнали дії пренатального стресу; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем Ана1 до індукції ЕАЕ у самок VIII групи, чутливих до розвитку ЕАЕ; # ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем Ана1 на 10 день після індукції ЕАЕ у самок VII групи, чутливих до розвитку ЕАЕ; Δ ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем Ана1 на 10 день після індукції ЕАЕ у самок VIII групи, резистентних до розвитку ЕАЕ.

Дослідження динаміки рівнів кортикостерону та Ана1 у резистентних до індукції ЕАЕ самок VIII групи показало, що рівень кортикостерону у стані здоров'я дорівнював $13,23 \pm 1,38$ нмоль/л ($n=4$), а Ана1 – $6,91 \pm 0,60$ нмоль/л ($n=4$). Звертає увагу той факт, що попри відсутність рухових порушень, на 10 день після імунізації відзначалося значуще зниження рівня кортикостерону до $10,40 \pm 0,62$ нмоль/л ($n=5$; $p \leq 0,05$). В той же час суттєвих змін концентрації Ана1, вторинного месенжера кортикостерону, не фіксувалося – $6,47 \pm 0,55$ нмоль/л ($n=5$) (Рис. 4.6; Рис. 4.7).

Був проведений аналіз впливу умов ембріонального розвитку та чутливості до індукції ЕАЕ на вміст кортикостерону та АНА1 у самок у стані здоров'я та після імунізації. У стані здоров'я залежності рівня кортикостерону від дії цих факторів не було виявлено. На 10 день після імунізації найнижчий рівень кортикостерону спостерігався у резистентних самок VIII групи, однак суттєвих відмінностей щодо рівня цього гормону не спостерігалось (Рис. 4.6). У чутливих самок VIII групи рівень АНА1 у стані здоров'я був нижчим, ніж у самок VII групи, але прийнятної різниці значущості ця різниця не набула ($p=0,08$). Особливістю перебігу хвороби у пренатально стресованих самок був істотно нижчий рівень АНА1 як у порівнянні з тваринами, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов (VII група) ($p\leq 0,05$), так і з резистентними щодо розвитку захворювання самками VIII групи ($p\leq 0,05$) (Рис. 4.7).

Таким чином, було виявлено, що динаміка кортикостерону та АНА1, викликана індукцією ЕАЕ, залежала від комбінованого впливу статевої приналежності щурів, умов пренатального розвитку і чутливості тварин до імунізації. Комбінація таких факторів, як перенесений пренатальний стрес і схильність щодо розвитку захворювання, асоціювалась у самців зі зниженням рівнів кортикостерону та АНА1 після індукції ЕАЕ. У самок основним фактором, що визначав зменшення рівня кортикостерону на 10 день після імунізації, виявився перенесений пренатальний стрес, а зниження АНА1 асоціювалося із чутливістю до розвитку хвороби.

4.2.2 Вплив індукції ЕАЕ на динаміку рівнів кортикостерону та анексину-А1 у чутливих до індукції ЕАЕ щурів зрілого віку з посліду матерів, резистентних до розвитку ЕАЕ в залежності від статі та умов пренатального розвитку

На жаль, невелика кількість даних дозволила провести лише частковий аналіз комбінованого впливу чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ, умов

пренатального розвитку і статі дослідних тварин на пов'язану з імунізацією динаміку кортикостерону та АНА1 у сироватці крові (Табл. 4.1).

Дослідження динаміки кортикостерону та АНА1 у нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів показало, що у хворих на ЕАЕ самців VII групи вміст цих сполук до індукції ЕАЕ складав $12,76 \pm 1,55$ нмоль/л ($n=5$) і $6,51 \pm 0,96$ нмоль/л ($n=4$) відповідно. На 10 день після імунізації спостерігалось незначне зниження рівнів цих аналітів: рівень кортикостерону складав $11,70 \pm 0,69$ нмоль/л ($n=5$), а АНА1 – $5,95 \pm 0,90$ нмоль/л ($n=5$). У чутливих до індукції ЕАЕ самців, які зазнали дії пренатального стресу (група VIII-♂-чутливі-МР), у стані здоров'я рівні кортикостерону та АНА1 складали $13,31 \pm 1,21$ нмоль/л ($n=7$) і $6,15 \pm 0,36$ нмоль/л ($n=7$) відповідно. На 10 день після індукції ЕАЕ рівень кортикостерону дещо знизився ($11,60 \pm 1,79$ нмоль/л, $n=6$; $p=0,06$), водночас вміст АНА1 значно зменшився ($5,25 \pm 0,25$ нмоль/л, $n=6$; $p \leq 0,05$). (Рис. 4.8; Рис. 4.9).

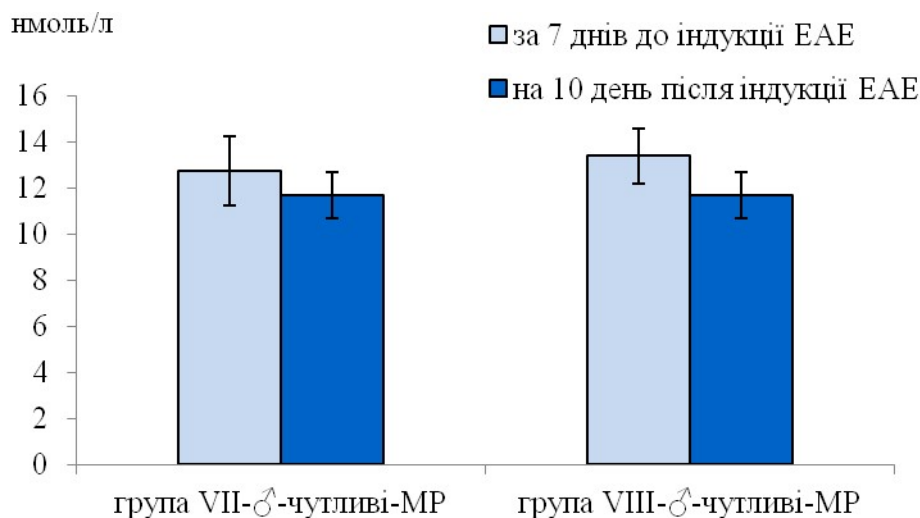


Рис. 4.8 Вміст кортикостерону у сироватці крові чутливих до розвитку ЕАЕ самців зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів

Примітки: група VII-♂-чутливі-МР – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♂-чутливі-МР – самці, що зазнали дії пренатального стресу.

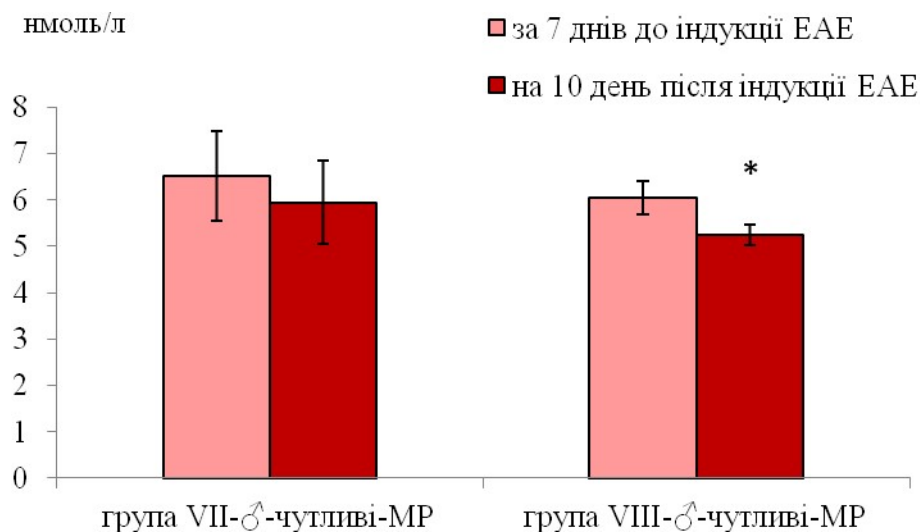


Рис. 4.9 Вміст анексину-A1 у сироватці крові чутливих до розвитку ЕАЕ самців зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів

Примітки: група VII-♂-чутливі-MP – самці, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♂-чутливі-MP – самці, що зазнали дії пренатального стресу, * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем АнА1 до індукції ЕАЕ у самців VIII групи.

Порівняння вмісту кортикостерону та АнА1 у самців з різними умовами пренатального розвитку не виявило відмінностей за цими показниками між тваринами як у стані здоров'я, так і за умов розвитку захворювання (Рис. 4.8; Рис. 4.9). Дослідження динаміки кортикостерону та АнА1 у чутливих до розвитку ЕАЕ самок з посліду резистентних матерів показало, що у тварин VII групи до індукції захворювання рівень кортикостерону складав $12,70 \pm 1,12$ нмоль/л ($n=5$), а АнА1 – $7,58 \pm 0,25$ нмоль/л ($n=4$). Аналіз пов'язаних даних виявив зменшення рівня кортикостерону на 10 день після імунізації ($12,10 \pm 0,92$ нмоль/л; $n=5$), однак прийнятного рівня значущості ця зміна не набула ($p=0,08$). Рівень АнА1 складав $6,16 \pm 0,51$ нмоль/л ($n=5$) і був значно нижчим, ніж до імунізації цих тварин ($p \leq 0,05$).

У чутливих до індукції ЕАЕ самок, що зазнали дії пренатального стресу (VIII група), рівні кортикостерону та Ана1 у стані здоров'я складали $12,97 \pm 0,64$ нмоль/л ($n=4$) і $6,50 \pm 0,18$ нмоль/л ($n=3$) відповідно. На 10 день після індукції ЕАЕ рівень кортикостерону дещо знизився і дорівнював $11,24 \pm 1,94$ нмоль/л ($n=3$), також відзначалося зменшення вмісту Ана1 – $4,74 \pm 0,73$ нмоль/л ($n=4$; $p=0,057$) (Рис. 4.10 Рис. 4.11).

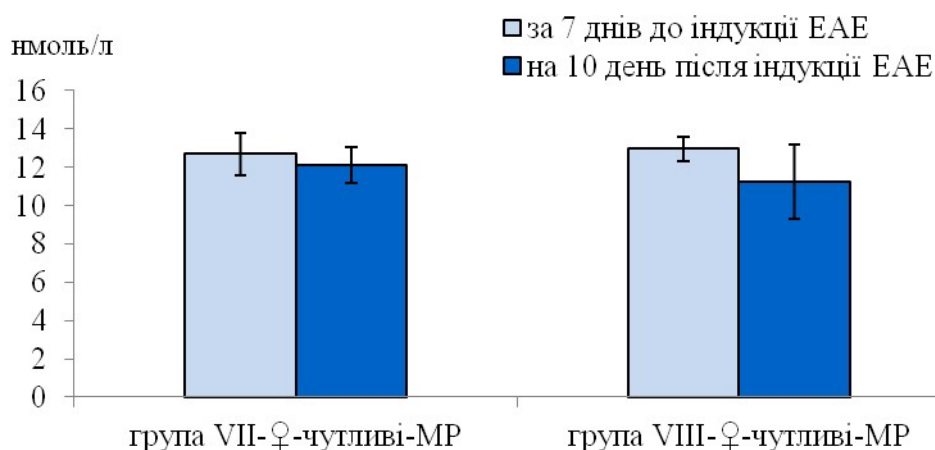


Рис. 4.10 Вміст кортикостерону у сироватці крові чутливих до розвитку ЕАЕ самок зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів

Примітки: група VII-♀-чутливі-МР – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♀-чутливі-МР – самки, що зазнали дії пренатального стресу.

Порівняння вмісту кортикостерону та Ана1 у чутливих до індукції ЕАЕ самок з посліду резистентних матерів виявило, що умови пренатального розвитку не впливали на рівень кортикостерону до індукції ЕАЕ та під час розвитку захворювання. Водночас у пренатально стресованих тварин показники Ана1 були значно меншими як до індукції ($p \leq 0,05$), так і після неї ($p \leq 0,05$) у порівнянні із самками, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов (Рис. 4.10; Рис. 4.11) [144].

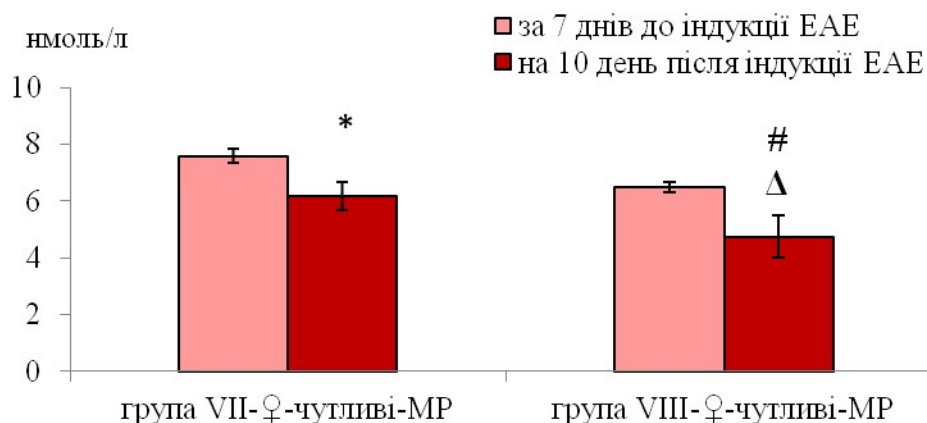


Рис. 4.11 Вміст анексину-А1 у сироватці крові чутливих до розвитку ЕАЕ самок зрілого віку з різними умовами пренатального розвитку, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів

Примітки: група VII-♀-чутливі-МР – самки, чий ембріональний розвиток проходив за стандартних умов; група VIII-♀-чутливі-МР – самки, що зазнали дії пренатального стресу, * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем АНА1 до індукції ЕАЕ у самок VII групи; Δ ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем АНА1 до індукції ЕАЕ у самок VIII групи; # ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем АНА1 на 10 день після індукції ЕАЕ у самок VII групи.

Таким чином, у нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів були виявлені статеві відмінності у динаміці рівнів АНА1 під час розвитку ЕАЕ. У самців зниження АНА1 спостерігалось у тих тварин, які зазнали дії пренатального стресу. У самок перенесений пренатальний стрес призвів до більш низьких показників АНА1 як у стані здоров'я, так і у період розвитку хвороби. В той же час незалежно від умов пренатального розвитку у самок відзначалося виражене зниження АНА1 на 10 день розвитку хвороби.

Висновки до розділу 4

1. Виявлено, що пренатальний стрес призвів до істотного зниження рівня естрогену у самців у порівнянні з тваринами, чий розвиток проходив за стандартних умов утримання.

2. Встановлено, що у пренатально стресованих тварин обох статей резистентність щодо індукції ЕАЕ корелювала із суттєво вищими показниками тестостерону.

3. Встановлено, що рівень статевих гормонів у самців зрілого віку залежав від впливу умов пренатального розвитку і чутливості тварин до індукції ЕАЕ.

4. Показано, що у пренатально стресованих самок більш високі показники тестостерону асоціювалися із резистентністю до індукції ЕАЕ.

5. Встановлено, що динаміка кортикостерону та АНА1, викликана індукцією ЕАЕ, залежала від комбінованого впливу статі щурів, умов пренатального розвитку і чутливості тварин до імунізації. У чутливих до розвитку захворювання самців зниження рівнів кортикостерону та АНА1 було викликано дією пренатального стресу. У самок основним фактором, що призвів до зменшення рівня кортикостерону на 10 день після імунізації, виявився перенесений пренатальний стрес, а зниження АНА1 асоціювалося із чутливістю до розвитку хвороби.

6. Встановлено, що у нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів динаміка АНА1 під час розвитку ЕАЕ у зрілому віці залежала від статі тварин та умов пренатального розвитку. Зниження АНА1, що супроводжувало перебіг ЕАЕ, спостерігалось у тих самців, які зазнали дії пренатального стресу. У самок перенесений пренатальний стрес призвів до більш низьких показників АНА1 як у стані здоров'я, так і у період розвитку хвороби. В той же час, незалежно від умов пренатального розвитку, у самок відзначалося виражене зниження АНА1 на 10 день розвитку хвороби.

Матеріали розділу опубліковані [144, 175].

РОЗДІЛ 5

СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ ЯК ФАКТОРУ, ЩО ВПЛИВАЄ НА ФОРМУВАННЯ СХИЛЬНОСТІ ЩОДО РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Жінки молодого віку складають основну групу ризику розвитку РС. Нові терапевтичні підходи дозволяють хворим на РС жінкам з впевненістю планувати вагітність. Підвищена у 2 рази захворюваність серед дизиготних близнюків, на відміну від сиблінгів, передбачає тимчасову дію екологічного фактору ризику чи потенційно внутрішньоутробний вплив [112]. На наш погляд, в ролі таких факторів впливу можуть виступати рецидив РС, депресія або дія неunikного стресу. Хоча період вагітності і характеризується зниженням ризику розвитку чергового епізоду захворювання, проте цей ризик залишається доволі високим. Так, у дослідженні С. Confavreux та співавторів показано, що рецидив спостерігався у 17,6 % жінок протягом 3 місяців перед вагітністю, в першому триместрі черговий епізод відзначався у 11,9 % вагітних, що хворіли на РС, в другому триместрі рецидив спостерігався у 12,8 % жінок і в третьому триместрі розвиток хвороби відзначався у 4,8 % вагітних з РС [29]. Таким чином, запальний процес у поєднанні з аутоімунними механізмами патогенезу демієлінізуючих порушень, які зумовлені рецидивами хвороби у матері, можуть виступати як фактор внутрішньоутробного впливу на дитинчат. Одним з коморбідних до РС захворювань є депресія. У хворих на РС у віці від 18 до 45 років ризик розвитку депресії протягом року складає 1:4. Цей стан супроводжується підвищенням рівня кортизолу, зниженням об'єму гіпокампу і дисфункцією гіпоталамо-гіпофізарно-адrenalової осі [51]. Такі негативні життєві події, як перебування у зоні ведення бойових дій, втрата родичів або різке погіршення умов існування, формують стан хронічного неunikного стресу. У експериментах на щурах показано, що хронічний стрес призводить до стійкого підвищення кортикостерону у вагітних самок [36].

Дослідження впливу дії негативних факторів у вагітних на формування схильності щодо розвитку РС у нащадків має велике значення для розробки профілактичних заходів, які мають за мету зниження ризику захворювання у людей з родинними формами РС.

Дизайн експерименту для дослідження перебігу ЕАЕ у тварин в залежності від типу негативних умов, що діють в період пренатального розвитку, потребує використання близько 40 самок материнської групи та всіх їхніх нащадків. Кількість тварин в одному посліді, за даними нашого дослідження, дорівнює в середньому 8,9 щурів. Беручи до уваги, що деяка частка вагітностей проходила з ускладненнями, кількість нащадків могла б сягати 300 тварин. Враховуючи високу вартість такого дизайну дослідження та з етичних міркувань, нами було прийнято рішення провести вивчення особливостей перебігу ЕАЕ у нащадків в залежності від умов утримання вагітних матерів (були імунізовані на ЕАЕ або піддавались неunikному стресу) на основі даних, отриманих в окремих експериментах, що були виконані нашою дослідницькою групою. Умови утримання тварин і методи дослідження були ідентичними.

5.1 Дослідження ефектів імунізації на ЕАЕ та неunikного хронічного стресу на стан вагітних щурів і розвиток вагітності

Перший епізод або рецидив розсіяного склерозу у вагітних моделювався шляхом індукції експериментального аутоімунного енцефаломієліту у першому або другому триместрі вагітності у щурів. Порівняння ефектів від впливу хронічного неunikного стресу та імунізації на ЕАЕ вагітних самок виявило, що індукція захворювання вагітним тваринам ($n=25$) призвела до 80 % рівня захворюваності. Рівень загибелі склав 28 % від загальної кількості тварин. (Табл. 5.1) Ступінь тяжкості перебігу визначався за показником «узагальнений КІ» (KI_{uz}), який розраховувався як середня арифметична з $KI_{cp.xb}$ і KI_{max} . Перебіг захворювання визначався як легкий (до 1,5 балів КІ) у

45 % тварин, що захворіли. Середня ступінь тяжкості розвитку хвороби (від 1,6 до 2,5 балів КІ) спостерігалася у 15 % тварин. Решта (40 %) тварин хворіли на тяжку (від 2,6 до 4,0 балів КІ) або дуже тяжку (від 4,1 до 5,5 балів КІ) форму перебігу ЕАЕ. Різноманітні відхилення щодо перебігу вагітності виявлені у восьми з 20-ти захворілих щурів (40 %) (Табл. 5.1) [165].

Таблиця 5.1

Вплив досліджуваних факторів на стан вагітних самок та перебіг вагітності

	Самки, імунізовані на ЕАЕ в період вагітності <i>n</i> (%)	Самки, що піддавались дії неунікного стресу у період вагітності <i>n</i> (%)
Всього тварин	25 (100)	31 (100)
Захворіли на ЕАЕ	20 (80)	—
Загинули	7 (28)	2 (6,5) •
Кількість випадків ускладненої вагітності	8 (32)	2 (6,5) ••

Примітки: • ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем загибелі серед самок, імунізованих на ЕАЕ в період вагітності; •• ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з рівнем ускладнень в перебігу вагітності серед самок, імунізованих на ЕАЕ в період вагітності.

У залежності від терміну гестації, під час якої проводилася індукція ЕАЕ у вагітних самок, групу поділяли на дві підгрупи. Одна частина вагітних самок ($n=12$) була імунізована в першому триместрі вагітності, рівень захворюваності серед цих тварин склав 83,3 % ($n=10$). Легкий перебіг захворювання спостерігався у 60 % самок, середня тяжкість перебігу ЕАЕ була зафіксована у 20 % хворих і 20 % хворіли на тяжку форму ЕАЕ ($n=2$, з яких одна самка загинула). У самок, що захворіли після імунізації у першому триместрі, ускладнення вагітності спостерігалось у 30 % випадків [165].

Інша частина вагітних самок ($n=13$) зазнала імунізації у другому триместрі. Доля хворих серед них склала 76,9 %. Тестування рівня рухових

порушень показало, що легкий перебіг ЕАЕ спостерігався у 20 % хворих самок, в 10% випадків – середньої тяжкості, та 70 % тварин хворіли тяжко або дуже тяжко. Рівень загибелі дорівнював 46,2 % від загальної кількості вагітних самок, імунізованих у другому триместрі ($n=13$), або 60 % від кількості хворих тварин ($n=10$). Індукція ЕАЕ в другому триместрі супроводжувалася патологічними ускладненнями перебігу вагітності у вигляді підвищення частоти непрогресуючої вагітності до 30 %, а також недостатністю, майже до повної відсутності, пологової діяльності у 20 % хворих на ЕАЕ самок. У тварин з тяжким перебігом ЕАЕ в 62,5 % випадків відзначалося раптове переривання вагітності. Крім того, в 20 % випадків мала місце перинатальна загибель дитинчат у зв'язку з тяжким перебігом захворювання матері, який супроводжувався відсутністю лактації, або загибеллю хворої матері безпосередньо після пологів [165].

Дослідження впливу неунікного стресу, що діяв на вагітних самок у третьому триместрі вагітності, на формування схильності щодо розвитку ЕАЕ у їхніх нащадків проводилося з використанням 31 самки з материнської групи. Вплив неунікного стресу на самок в останньому триместрі вагітності супроводжувався підвищенням САТ і спричинив зникнення ознак вагітності в 6,5 % випадків, що було значно нижчим, ніж кількість ускладнень, які виникли в результаті імунізації вагітних самок ($p \leq 0,05$). У 6,5 % випадків спостерігалось вбивство новонароджених щурят їхніми матерями. Загальний рівень загибелі серед вагітних самок, що піддавалися неунічному стресу, склав 6,5 %, що було істотно нижчим, ніж серед самок, імунізованих на ЕАЕ під час вагітності ($p \leq 0,05$) (Табл. 5.1). Одна самка загинула на 20 день вагітності, ще одна – на другий день після пологів. Таким чином, дія неунікного стресу поєднувалась зі значуще меншою кількістю випадків ускладненої вагітності (6,5%) та загибелі самок (6,5%) в порівнянні з імунізацією тварин на ЕАЕ під час вагітності, яка призвела до загибелі 28% самок та порушень у перебігу вагітності в 32% випадків.

5.2 Дослідження особливостей перебігу ЕАЕ за умов індукції захворювання у молодих нащадків матерів, яких імунізували під час вагітності, та нащадків матерів, що піддавалися дії хронічного неunikного стресу в останній триместр вагітності

Нащадків матерів, що були імунізовані в період вагітності, ми визначили як групу XI ($n=38$). Групу порівняння склали нащадки матерів, що зазнали дії пренатального стресу (IV група, $n=47$). Тварини були імунізовані на ЕАЕ у молодому віці (IV група у віці 18-21 тиждень; XI група у віці 22-24 тижня). У ході аналізу впливу неunikного стресу у період вагітності самок на рівень захворюваності їхніх нащадків було виявлено, що загальна кількість хворих склала 57,8 % і була істотно нищою за рівень захворюваності серед тварин з посліду матерів, що зазнали індукції ЕАЕ під час вагітності (86,9 %; $p \leq 0,05$) (Рис. 5.1).

Звертає на себе увагу той факт, що рівень захворюваності серед нащадків резистентних матерів не залежав від типу негативного фактору впливу, що діяв під час вагітності. Так вплив неunikного стресу на вагітних самок, які виявилися резистентними до індукції ЕАЕ, поєднувався з 76,2 % рівнем захворюваності у їхніх нащадків ($n=21$). А серед тварин з посліду матерів, що зазнали імунізації на ЕАЕ у період вагітності, але виявились резистентними, захворіло п'ятнадцять тварин (78,9 %; $n=19$), [176]. В той же час спостерігалась істотна різниця щодо рівня захворюваності серед нащадків чутливих до індукції матерів. Серед пренатально стресованих тварин ($n=26$) рівень захворюваності на ЕАЕ склав 46,2%, що було значно нище, ніж у тих тварин, чий ембріональний розвиток проходив на фоні активного перебігу ЕАЕ у матері (94,7 %; $n=19$; $p \leq 0,05$) [176] (Рис. 5.1).

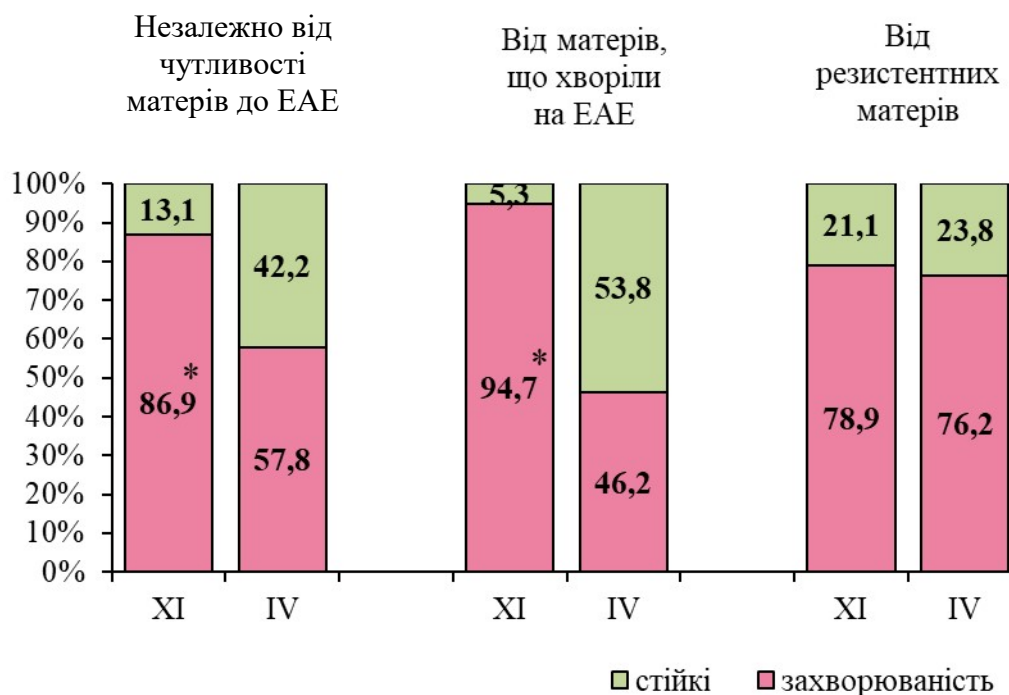


Рис. 5.1 Рівень захворюваності на ЕАЕ нащадків молодого віку незалежно від статі та з урахуванням чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ

Примітка: * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі у порівнянні з рівнем захворюваності серед відповідної групи тварин IV групи.

Аналіз перебігу ЕАЕ у тварин XI і IV груп, який проводився з урахуванням статі тварин і чутливості матерів до індукції ЕАЕ, показав, що у самок, нащадків резистентних матерів, часові характеристики перебігу ЕАЕ не залежали від типу впливу, якого зазнали їх матері у період вагітності (Рис. 5.2). Порівняння показників тяжкості моторної дисфункції, викликаной ЕАЕ, показало, що у пренатально стресованих самок (IV-MP-♀) рівень максимальних порушень досягав $4,25 \pm 0,39$ балів КІ ($KI_{\text{макс}}$) [176], що було значно вище, ніж у самок з посліду імунізованих у період вагітності матерів, які виявилися резистентними щодо розвитку хвороби (XI-MP-♀: $KI_{\text{макс}} = 3,29 \pm 0,97$; $p \leq 0,05$) (Рис. 5.3).

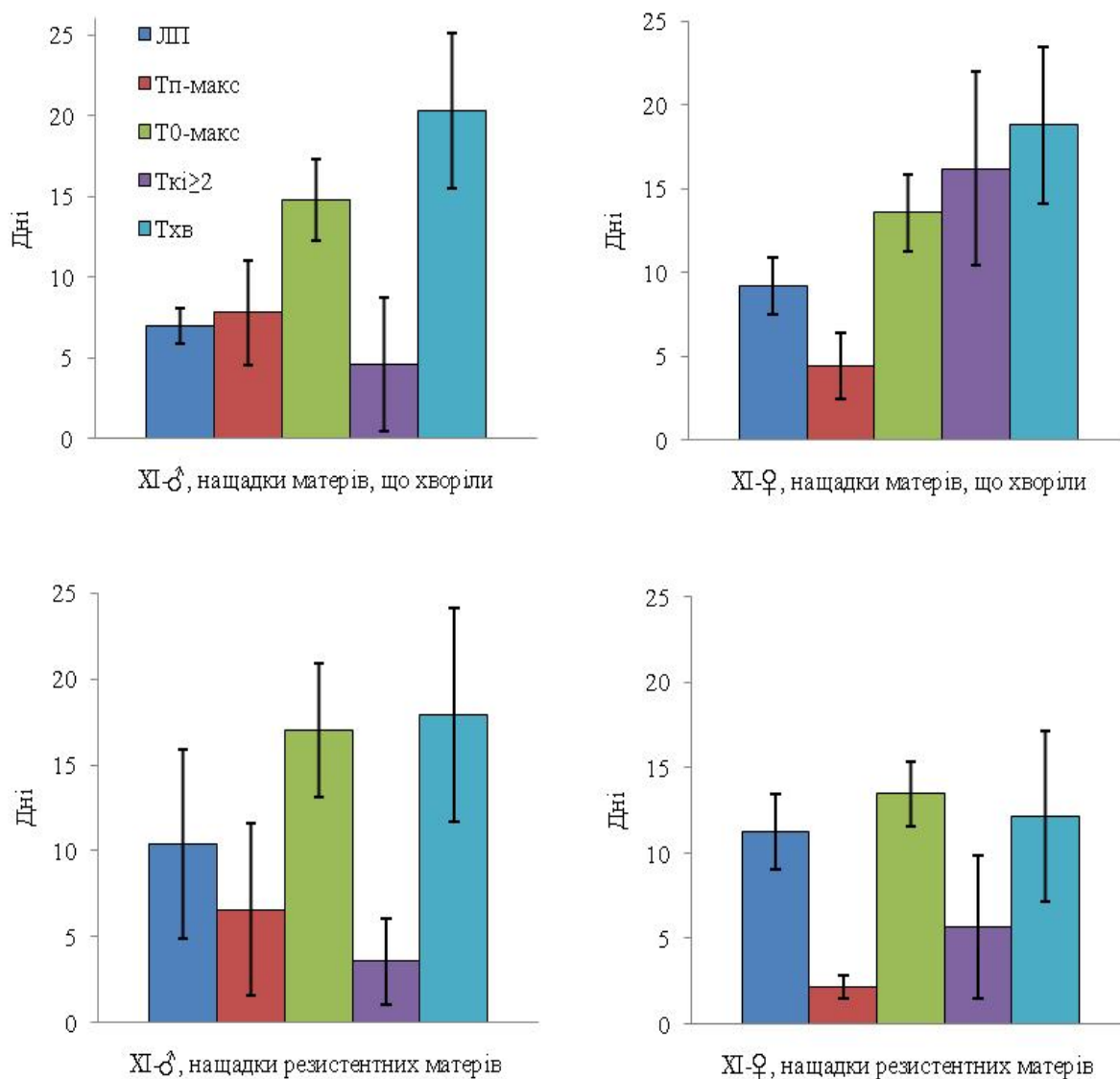


Рис. 5.2 Тривалість етапів перебігу ЕАЕ у молодих тварин, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, які були імунізовані під час вагітності

Примітки: ЛП – латентний період; Т_{п-макс} – тривалість періоду наростання рухових порушень від початку захворювання до дня з максимальним показником моторної дисфункції; Т_{0-макс} – тривалість періоду наростання рухових порушень від імунізації до дня з максимальним показником моторної дисфункції; Т_{ki≥2} – кількість днів хвороби, коли показники рухових порушень дорівнюють або більше 2 балів КІ; Т_{хв} – тривалість захворювання.

Показники етапів перебігу ЕАЕ та ступінь прояву рухової дисфункції у самок XI і IV груп з послідів матерів, що хворіли, не мали суттєвої різниці. Проте звертає на себе увагу динаміка після піку захворювання. Так, у самок,

чий матері були імунізовані і хворіли на ЕАЕ у період вагітності, спостерігалось дуже повільне зниження рівня рухових порушень (Рис. 5.4).

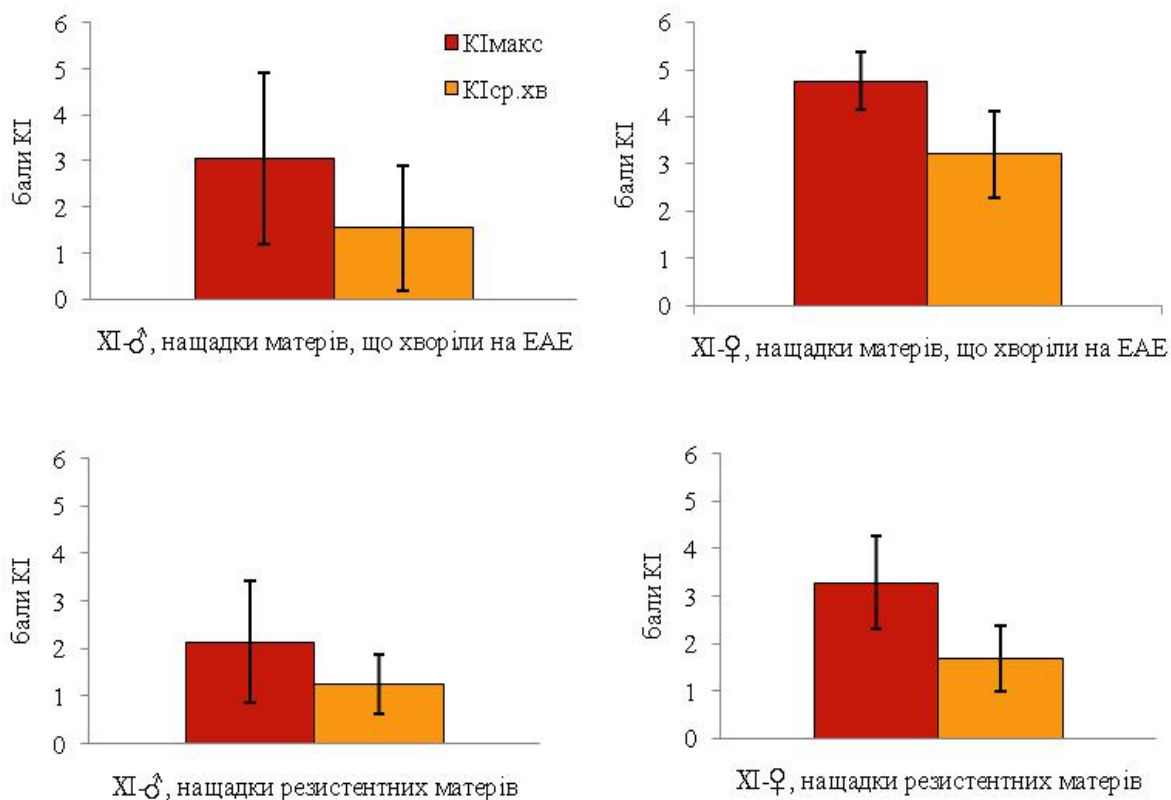


Рис. 5.3 Показники тяжкості перебігу ЕАЕ у молодих тварин, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, які були імунізовані під час вагітності

Примітки: КІ_{макс} – максимальний рівень рухових порушень; КІ_{ср.хв} – середньодобовий показник рухових порушень за період прояву хвороби; * ($p \leq 0,05$) – відмінності статистично значущі порівняно з

Вісім з десяти тварин все ще мали неврологічні порушення на останній день спостереження, а середньодобовий показник рівня рухових порушень на 30 день спостережень складав $2,06 \pm 0,61$ балів КІ. У той же час у пренатально стресованих самок рівень рухових порушень в останній день спостереження дорівнював $0,67 \pm 0,58$ балів КІ (Рис. 5.4).

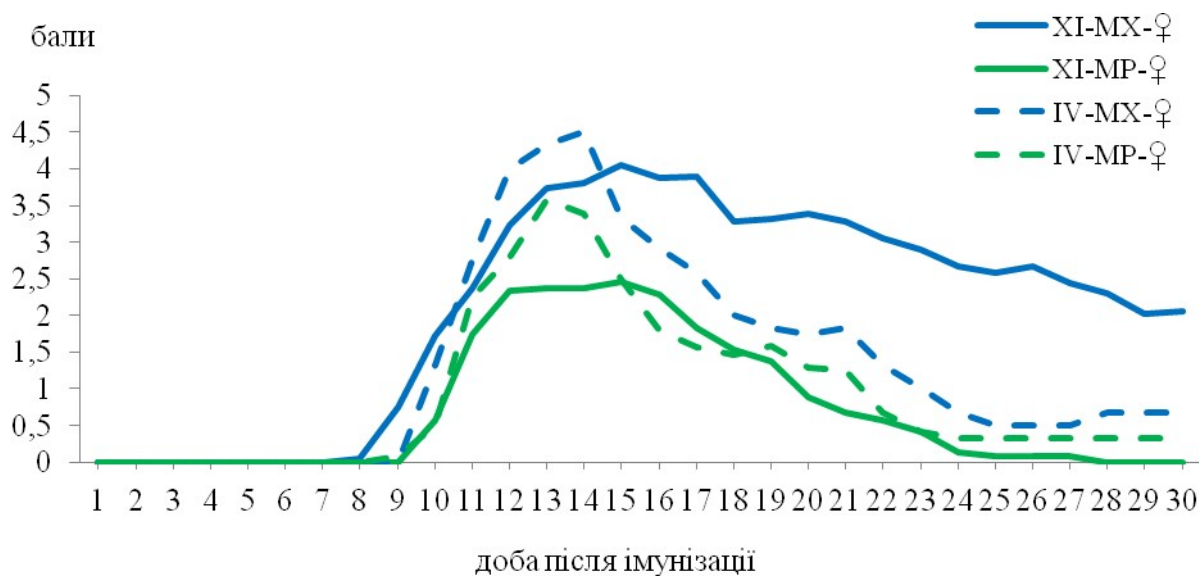


Рис. 5.4 Динаміка перебігу ЕАЕ у самок, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, які піддавались імунізації або неunikному стресу під час вагітності

Примітки: IV-MX-♀ – самки, що піддавались дії пренатального стресу, нащадки чутливих до індукції ЕАЕ матерів; IV-MP-♀ – самки, що піддавались дії пренатального стресу, нащадки резистентних до індукції ЕАЕ матерів XI-MX-♀ – самки, чиї матері були імунізовані на ЕАЕ в період вагітності та мали ознаки захворювання XI-MX-♀ – самки, чиї матері були імунізовані на ЕАЕ в період вагітності та виявились резистентними.

Дослідження перебігу ЕАЕ у самців з посліду чутливих до індукції ЕАЕ матерів показало, що у тварин з IV і XI груп час від імунізації до дня з максимальним показником моторної дисфункції був приблизно однаковим (IV-MX-♂: $T_{0-\text{макс}} = 15,1 \pm 2,8$ днів; XI-MX-♂: $T_{0-\text{макс}} = 14,8 \pm 2,5$ днів). В той же час у самців, матері яких були імунізовані у період вагітності, динаміка захворювання відрізнялася більш коротким латентним періодом (XI-MX-♂: ЛП = $7,0 \pm 1,1$ днів; IV-MX-♂: ЛП = $12,8 \pm 3,0$ днів; $p \leq 0,05$) і значно довшою тривалістю хвороби (XI-MX-♂: $T_{\text{хв}} = 20,3 \pm 4,8$ днів; IV-MX-♂: $T_{\text{хв}} = 8,2 \pm 6,2$ днів; $p \leq 0,05$) (Рис. 5.2). Незважаючи на більш тривалий перебіг захворювання, показники тяжкості неврологічних порушень ($T_{\text{хв}}$, $KI_{\text{макс}}$, $KI_{\text{ср.хв}}$) у самців з посліду імунізованих у період вагітності самок (XI група), що хворіли на ЕАЕ, не мали суттєвих відмінностей з відповідними

показниками пренатально стресованих самців IV групи (Рис. 3.4; Рис. 3.5; Рис. 5.2; Рис. 5.3).

Аналіз перебігу захворювання у самців, нащадків резистентних до індукції ЕАЕ матерів, показав, що у пренатально стресованих тварин такі показники тяжкості захворювання, як: $KI_{\text{макс}}$ і $KI_{\text{ср.хв}}$, були значно вище, ніж у самців з XI групи (IV-MP-♂: $KI_{\text{макс}} = 4,25 \pm 1,91$ балів KI; XI-MP-♂: $KI_{\text{макс}} = 2,14 \pm 1,28$ балів KI; $p \leq 0,05$) (IV-MP-♂: $KI_{\text{ср.хв}} = 3,05 \pm 1,63$ балів KI; XI-MP-♂: $KI_{\text{ср.хв}} = 1,26 \pm 0,61$ балів KI; $p \leq 0,05$). Разом з цим, тривалість ЕАЕ була істотно коротшою за щурів XI групи (IV-MP-♂: $T_{\text{хв}} = 6,9 \pm 4,0$ днів; XI-MP-♂: $T_{\text{хв}} = 17,9 \pm 6,2$ днів; $p \leq 0,05$) (Рис. 3.4; Рис. 3.5, Рис. 5.2; Рис. 5.3).

У самців з XI групи, нащадків резистентних матерів, зменшення рівня неврологічних порушень проходило у дуже повільному темпі. Сім з дев'яти тварин мали ознаки моторної дисфункції на останній день спостереження. За останні 10 днів дослідження рівень неврологічних порушень зменшився з $1,08 \pm 0,76$ до $0,69 \pm 0,60$ балів KI. У всіх пренатально стресованих самців, нащадків резистентних матерів, фіксувалося відновлення рухової функції на 20 день після імунізації. Лише в однієї тварини спостерігався двофазний перебіг ЕАЕ, який супроводжувався різким погіршенням стану до 2-х балів KI на 24 день спостереження і повільним відновленням рухової активності до останнього дня спостереження (Рис. 5.5).

Таким чином, імунізація вагітних самок призвела до більш трагічніших наслідків для розвитку потомства в ембріональному періоді, ніж дія хронічного неunikного стресу у третьому триместрі вагітності. Різноманітні відхилення щодо перебігу вагітності виявлені у 40 % самок, що захворіли після індукції ЕАЕ у період вагітності.

Імунізація матерів у період вагітності та дія неunikного стресу на вагітну самку мали різний вплив на формування схильності до розвитку ЕАЕ у нащадків чутливих до індукції цього захворювання матерів. Хвороба матері в період вагітності поєднувалася зі значно більшим рівнем захворюваності у нащадків, імунізованих у молодому віці, ніж дія неunikного стресу.

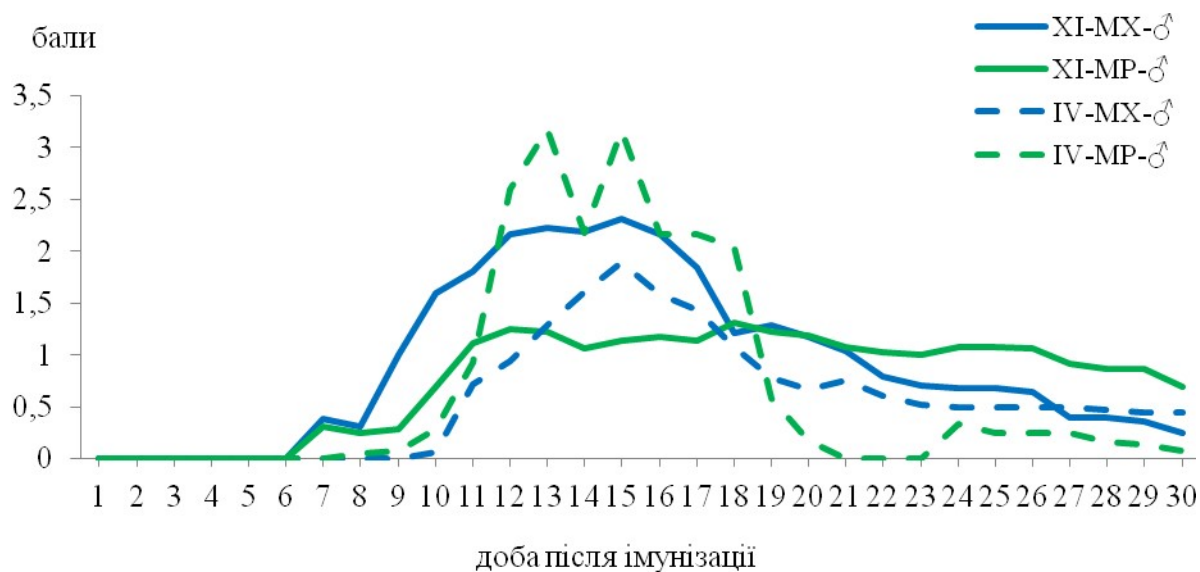


Рис. 5.5 Динаміка перебігу ЕАЕ у самців, нащадків матерів з різною чутливістю до індукції ЕАЕ, які піддавалися імунізації або неunikному стресу під час вагітності

Умови пренатального розвитку особливо вплинули на перебіг захворювання у нащадків чоловічої статі. Причому результат цього впливу залежав від чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ. У пренатально стресованих самців з посліду резистентних матерів імунізація призвела до більш тяжкого перебігу захворювання у порівнянні із самцями, чий матері виявилися резистентними до імунізації в період вагітності. Хвороба матері під час вагітності визначила ранній початок та триваліший перебіг захворювання у нащадків-самців, ніж дія пренатального хронічного стресу.

Висновки до розділу 5

1. Імунізація матерів у період вагітності та дія неunikного стресу на вагітну самку мали різний вплив на формування схильності щодо розвитку ЕАЕ у нащадків матерів з різною чутливістю до імунізації. Хвороба матері в період вагітності поєднувалася з істотно більшим рівнем захворюваності у нащадків, імунізованих у молодому віці, ніж дія неunikного стресу, а також визначила більш ранній початок і тривалий перебіг захворювання у

нащадків-самців, ніж дія пренатального хронічного стресу. У пренатально стресованих самців, нащадків резистентних до ЕАЕ матерів, імунізація призвела до більш тяжкого перебігу захворювання у порівнянні із самцями, чиї матері виявилися резистентними до індукції ЕАЕ в період вагітності.

2. Пренатальний стрес, перенесений в останньому триместрі ембріонального розвитку, є окремим фактором, що впливає на формування схильності щодо розвитку ЕАЕ і визначає особливості перебігу цього захворювання.

Матеріали розділу опубліковані [165, 176]

РОЗДІЛ 6

ОБГОВОРЕННЯ

6.1 Вплив умов пренатального розвитку, віку і статі тварин та чутливості матерів щодо індукції експериментального аутоімунного енцефаломієліту на захворюваність і перебіг ЕАЕ

Ризик розвитку, тип перебігу та різноманітність клінічних проявів РС залежать від поєднання ряду біологічних факторів та факторів середовища. Розсіяний склероз відносять до захворювання з полігенною схильністю. Понад 30 локусів, що знаходяться в головному комплексі гістосумісності, та більш ніж 200 локусів поза цього регіону асоційовані з РС [23]. Разом з цим, велика кількість даних свідчить, що під дією зовнішніх факторів виникають епігенетичні модифікації генів, які підвищують ризик захворюваності на РС. Це підтверджується низьким рівнем конкордантності до РС у монозиготних близнюків (від 14 до 33 %) [67], підвищеною передачею матерями алелей з групи ризику [78], більшу вірогідність розвитку хвороби у іншого дизиготного близнюка у порівнянні з ризиками у сиблінгів [112]. Крім того, виявлено, що пов'язані з РС алелі головного комплексу гістосумісності також асоційовані з іншими аутоімунними захворюваннями. Це, ймовірно, свідчить про більш важливу роль епігенетичних модифікацій конкретних гаплотипів [124].

На сьогодні визнаними факторами впливу на формування схильності щодо РС є недостатня солярність, низький рівень вітаміну D, куріння та ожиріння.

Розсіяний склероз є захворюванням з вираженою віковою динамікою і переважанням жінок серед хворих статевозрілого віку. Приблизно в 1 % хворих розвиток РС почався у віці до 10 років. У 6 % хворих перший епізод РС почався в пубертатному віці [121]. Пік захворюваності на РС спостерігається у людей між 25-35 роками [4]. У цей період співвідношення

жінок до чоловіків серед тих, хто захворів, досягає 5,35:1 [100], тоді як загальне співвідношення за статтю дорівнює (2,1-3,2):1 [17, 87, 115, 153]. Зі збільшенням віку ризик розвитку цього захворювання зменшується [17, 39, 89].

Динаміка перебігу РС у жінок та чоловіків також має відмінності. Так, у хворих на рецидивуючо-ремітуючий РС частота рецидивів у жінок вища за чоловіків [60], проте накоплення рухових порушень до рівня 3-х, 6-ти і 8-ми балів за шкалою EDSS у чоловіків відбувається раніше, ніж у жінок [127]. У МРТ дослідженнях була виявлена більша атрофія сірої речовини у чоловіків у порівнянні з жінками [147].

Нажаль відсутність єдиного реєстру хворих на РС не дозволяє оцінити тенденції щодо захворюваності на РС в Україні [167]. У Північній Америці та деяких країнах північної Європи за останні 30 років спостерігається збільшення на 10 % стандартизованої за віком поширеності захворюваності на РС [50]. Така динаміка змушує шукати нові фактори впливу, що визначають ризики розвитку РС.

Експериментальний аутоімунний енцефаломієліт як модель РС дає змогу вивчати багато аспектів патогенезу цього захворювання, особливо тих, чие вивчення на людях утруднено або зовсім неможливо з етичних причин. Важливим напрямком пошуку нових факторів впливу на патогенез ЕАЕ виявилися дослідження дії різних видів стресу як модифікаторів перебігу ЕАЕ. Columba-Cabezas та співавтори виявили, що щоденне 15-хвилинне відокремлення мишей від матері у період з 2-го і до 14-го дня після народження поєднувалося з більш легким перебігом ЕАЕ у самок, ніж у самців, за умов проведення індукції ЕАЕ у віці 7 тижнів. У той же час у тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов, рівень рухових порушень під час розвитку ЕАЕ не залежав від статі. Важливо зазначити, що стать і умови раннього постнатального розвитку не впливали на рівень захворюваності [27]. Індукція ЕАЕ у віці 8 тижнів щурів, яких у неонатальний період розвитку короткочасно відокремлювали від матерів,

призвела до підвищення кількості хворих і тяжкості перебігу цього захворювання у самців, але не у самок, на відміну від контрольної групи [81]. Дуже чутливим періодом онтогенетичного розвитку до різноманітних впливів є пренатальний період. Важливість цього періоду у формуванні схильності щодо розвитку РС підтверджує той факт, що серед дизиготних близнюків ступінь конкордантності на РС у 2 рази вища, ніж у сиблінгів [112].

Наші дослідження були присвячені вивченню впливів на патогенез ЕАЕ хронічного пренатального стресу, який моделювався в останньому триместрі вагітності шляхом періодичної іммобілізації матерів та утримання за умов постійного освітлення. Виявлено, що такі параметри, як: захворюваність, смертність, показники тяжкості перебігу, залежали від комбінованого впливу факторів, а саме: «стать дослідних тварин»—«чутливість матерів до індукції ЕАЕ»—«умови пренатального розвитку»—«вік імунізації дослідних тварин».

У результаті дослідження комбінованого впливу умов пренатального розвитку та віку імунізації виявлено зміну динаміки захворюваності на ЕАЕ. Стандартні умови пренатального розвитку визначали значне збільшення чутливості до індукції ЕАЕ у щурів, що досягли віку статевої зрілості, у порівнянні з тваринами, імунізованими у пубертатному віці. Перенесений пренатальний стрес нівелює зв'язок між ступенем статевого розвитку і чутливістю тварин до імунізації. Рівень захворюваності на ЕАЕ серед щурів досліджуваних вікових груп у пренатально стресованих тварин не мав суттєвих відмінностей [143, 174]. Причому перенесений пренатальний стрес асоціювався з підвищенням кількості хворих серед тварин пубертатного віку та зниженням захворюваності серед тварин молодого і зрілого віку у порівнянні з тваринами, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов.

Індукція ЕАЕ щурам у пубертатному віці виявила певне підвищення рівня захворюваності серед тварин, що піддавалися дії пренатального стресу ($0,05 < p < 0,1$) [143, 174]. Показники перебігу хвороби у тварин різної статі з

одного посліду практично співпадали. Проте аналіз динаміки ЕАЕ в залежності від статі та умов пренатального розвитку показав, що у самок перенесений пренатальний стрес асоціювався з пролонгуванням часу від дня перших проявів захворювання до дня з максимальним показником рухових порушень, що призводило до більш високих показників рівня максимальних рухових порушень ($0,05 < p < 0,1$) [143]. У той же час у самців не було виявлено залежності перебігу ЕАЕ від умов пренатального розвитку.

Індукція ЕАЕ у тварин молодого віку виявила залежність рівня захворюваності та показників ЕАЕ від умов пренатального розвитку. Стандартні умови утримання вагітних самок щурів формували у нащадків дуже високу чутливість до імунізації у віці репродуктивної зрілості. Стать нащадків і чутливість матерів до індукції ЕАЕ не впливали на ризик розвитку захворювання. Перенесений пренатальний стрес асоціювався зі зниженням чутливості тварин до індукції ЕАЕ. Найменший ризик захворіти мали щури з посліду чутливих до ЕАЕ матерів. Серед тварин цього посліду найнижчий ризик захворюваності та смертності визначався комбінованим впливом факторів: «жіноча стать»—«матір, чутлива до індукції ЕАЕ»—«пренатальний стрес». Комбінація таких факторів, як: «чоловіча стать»—«матір, чутлива до індукції ЕАЕ»—«пренатальний стрес» була умовою виживання та більш легкого перебігу захворювання [176].

За умов імунізації щурів зрілого віку також були виявлені статеві відмінності щодо чутливості тварин до індукції ЕАЕ і динаміки захворювання в залежності від умов пренатального розвитку. Найвищий ризик захворіти на ЕАЕ після імунізації мали тварини обох статей з посліду матерів, чия вагітність проходила за стандартних умов утримання. У тварин, які піддавалися дії пренатального стресу, результат імунізації залежав від статі тварини. У самців спостерігалася тенденція щодо зниження захворюваності на відміну від контрольної групи. Найнижчий ризик захворюваності серед самців визначався комбінованим впливом таких факторів, як: «матір, чутлива до індукції ЕАЕ»—«пренатальний стрес», однак

на перебіг хвороби досліджувані фактори не впливали [176]. У той же час у самок досліджувані фактори не визначали ризик захворіти, проте стресові умови пренатального розвитку визначали особливості перебігу захворювання, а саме: більш низькі показники тяжкості моторних порушень [176]. Велике значення для дослідження захворювань, що мають вікову динаміку захворюваності, відіграє вузьке визначення вікового періоду для аналізу впливу перенесеного пренатального стресу на показники захворюваності та перебігу ЕАЕ. Наше дослідження перебігу ЕАЕ, що базувалося на порівнянні показників пренатально стресованих тварин 6,5 місячного віку (відповідає 30 рокам людини[166]) та тварин контрольної групи віком 5 місяців (відповідає 23 рокам людини[166]) призвело до помилкових висновків щодо більшої захворюваності та більш важкого перебігу ЕАЕ у щурів, які піддавались дії пренатального стресу. [173].

Наша робота є першим дослідженням і свідченням комбінованого впливу таких факторів, як: «стать»—«умови пренатального розвитку»—«чутливість матері до індукції ЕАЕ»—«вік імунізації», на захворюваність і динаміку ЕАЕ у щурів. Отримані дані свідчать про складну взаємодію цих факторів у формуванні схильності щодо розвитку ЕАЕ у щурів і нелінійну динаміку чутливості до індукції ЕАЕ впродовж проміжку часу від пубертатного періоду до віку зрілості щурів.

6.2 Роль статевих гормонів у формуванні схильності щодо розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту

Статеві гормони відіграють важливу роль у формуванні схильності щодо розвитку РС. Серед хворих частка жінок приблизно у 3 рази більша за чоловіків [17, 87, 115, 153]. У період вагітності, яка характеризується значною зміною рівня естрадіолу та прогестерону, у хворих на РС жінок спостерігається зниження частоти рецидивів, особливо в третьому триместрі [29, 52]. Визначення рівня тестостерону у чоловіків з діагностованим РС

виявило у них більш низькі показники цього гормону, ніж у здорових осіб. Також більш низьким було співвідношення рівнів тестостерону та естрадіолу [26]. В клініці лікування тестостероновим гелем чоловіків протягом року призвело до затримки атрофії мозку та покращення когнітивних функцій [132]. Одним з механізмів, який визначає протективну дію андрогенів, є участь в регуляції процесу клональної делеції Т-клітин, здатних розпізнавати аутоантигени, що відбувається у тимусі [159].

У експерименті введення тестостерону мишам знижувало тяжкість перебігу ЕАЕ [116]. Дослідження впливів та механізмів дії статевих гормонів на захворюваність і перебіг РС та ЕАЕ показало, що введення імунізованим мишам тестостерону запобігало атрофії регіонів СА1 і СА3 гіпокампу [157]. Введення мишам естрадіолу за умов розвитку ЕАЕ зменшувало клінічні прояви захворювання та запобігало атрофії сірої речовини [95]. Зв'язування естрадіолу з рецепторами до естрадіолу- α призводить до зниження рівня запалення в ЦНС завдяки значному зниженню рівня прозапальних цитокінів TNF- α , IFN- α , IL-6 та підвищенню протизапального цитокіну IL-5. Активація рецепторів до естрадіолу- β призводить до підтримки пізньої нейропротекції – знижує демієлінізацію, зменшує втрату аксонів [141]. Є дані про погіршення симптомів захворювання у жінок з рецидивуючо-ремітуючим РС перед або на початку менструації [129, 160]. Відсутність таких змін спостерігалася у жінок, які приймали оральні контрацептиви [160].

За нашими даними, у тварин, що вижили, під дією пренатального стресу відзначалася тенденція щодо зниження рівня тестостерону та значне зниження рівня естрадіолу у сироватці крові самців на відміну від тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов [175]. Це узгоджується з даними досліджень, в яких було показано зниження рівня тестостерону у дорослих самців шурів, що зазнали дії стресу в останньому триместрі пренатального розвитку [58]. Серед пренатально стресованих тварин обох статей резистентність щодо індукції ЕАЕ корелювала з істотно вищими показниками тестостерону і тенденцією щодо збільшення рівня естрадіолу

порівняно з тваринами, що хворіли на ЕАЕ. Це підтверджує протективну роль андрогенного гормону та значення естрадіолу як одного з регуляторів запалення. Приймаючи до уваги дещо нижчий рівень захворюваності серед пренатально стресованих тварин (71,8 %), у порівнянні з групою контролю (89,5 %; $p=0,08$), ми вважаємо, що зниження рівня статевих гормонів у щурів зрілого віку, які зазнали дії пренатального стресу, являлося одним з предикторів, що визначав розвиток захворювання. Отримані дані співпадають з даними, які свідчать про більш низькі рівні тестостерону у хворих на РС обох статей у порівнянні зі здоровими людьми відповідного віку [68].

6.3 Роль кортикостерону та анексину-A1 на формування схильності до розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту

У щурів чутливість до індукції ЕАЕ залежить, зокрема, від активності ГГА осі. Резистентні лінії щурів PVG і BN мають високі рівні циркулюючих глюкокортикоїдів, тоді як у чутливих щодо розвитку захворювання щурів лінії Levis базальний рівень кортикостерону набагато нижчий [15]. Видалення надниркової залози у щурів лінії Levis призводить до загибелі тварин з індукованим ЕАЕ [96]. Домогтися розвитку хвороби у резистентних ліній допомагали або введення антагоніста глюкокортикоїдів [120], або адреналектомія [98]. Глюкокортикоїди є регуляторами активності великої кількості генів. У експериментальному дослідженні після додавання дексаметазону у клітини печінки щурів обох статей спостерігалися однакові зміни в експресії 189 генів, пов'язані з процесами запалення. Додатково чутливими щодо дії синтетичного глюкокортикоїду у самок виявилися 11 генів, у самців – 84. Вважається вірогідним, що саме відмінності у протизапальних ефектах глюкокортикоїдів визначають підвищений ризик розвитку деяких аутоімунних захворювань у самок [44]. Частина своїх ефектів глюкокортикоїди опосередковують через вторинний месенджер АnА1,

зокрема, процес диференціювання Т-клітин. За відсутності АnА1 спостерігається підвищення фенотипу Th2 [35]. Показано, що анексин-А1^{-/-} та анексин-А1^{+/+} миші не відрізнялися динамікою ЕАЕ, але мали відмінності щодо тяжкості перебігу цього захворювання. У анексин-А1^{-/-} мишей спостерігалось зниження смертності, рівня максимальних неврологічних порушень на відміну від мишей нормального типу [118].

Нами було виявлено, що самці з різними умовами пренатального розвитку не мали суттєвих відмінностей щодо рівнів кортикостерону та АnА1 ані у стані здоров'я, ані під час розвитку хвороби. Однак у тварин з різними умовами пренатального розвитку спостерігалися відмінності у динаміці гормону та його вторинного месенжеру, які були викликані індукцією ЕАЕ. У пренатально стресованих самців під час розвитку хвороби відзначалося зменшення рівня кортикостерону та значне зниження АnА1, тоді як у самців, чий розвиток проходив за стандартних умов, рівні кортикостерону та АnА1 практично не змінювалися.

Самки, що відрізнялися умовами пренатального розвитку, мали практично однаковий рівень кортикостерону перед індукцією ЕАЕ. Імунізація тварин призвела до більш вираженого зниження рівня кортикостерону через десять днів у самок, що зазнали дії пренатального стресу. Перед індукцією захворювання у самок, що згодом виявилися чутливими до індукції ЕАЕ, спостерігалися відмінності щодо рівня АnА1. У самок перенесений пренатальний стрес визначив більш низький рівень цього пептиду, ніж у тих тварин, чий розвиток проходив за стандартних умов. Незалежно від факторів, що діяли у пренатальний період, розвиток хвороби у самок супроводжувався зниженням рівня АnА1, проте чутливість до ЕАЕ у поєднанні з перенесеним пренатальним стресом призвели до найбільш вираженого зниження АnА1 [144]. Беручи до уваги, що захворюваність на ЕАЕ у пренатально стресованих тварин зрілого віку була дещо нижчою, ніж у тварин зі стандартними умовами пренатального розвитку, ми вважаємо, що у формуванні чутливості організмів до розвитку ЕАЕ активність ГГА осі

відіграє значну роль, однак сама активність ГГА осі не визначається лише умовами пренатального розвитку.

Вплив чутливості матерів щодо індукції ЕАЕ на формування активності ГГА осі у їхніх нащадків потребує подальшого дослідження.

6.4 Пренатальний стрес як специфічний фактор впливу на схильність до розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту

Важливим завданням нашого дослідження було визначити, наскільки пренатальний стрес виступає як специфічний фактор впливу. Був проведений аналіз впливів неunikного стресу і розвитку ЕАЕ у вагітних самок на захворюваність і перебіг ЕАЕ у нащадків. Хоча ризик рецидиву у хворих на РС жінок зменшується в період вагітності, однак він залишається доволі великим: в першому триместрі рецидив відзначався у 11,9 % жінок, в другому триместрі черговий епізод спостерігався у 12,8 % жінок і в третьому триместрі – у 4,8 % вагітних з РС спостерігався рецидив [29]. Порівняння ефектів неunikного стресу, який діяв на матерів в останній триместр вагітності, та ЕАЕ, який індукували вагітним самкам, показало, що ці фактори мали різний вплив на перебіг вагітності. Індукція самкам ЕАЕ в період вагітності призвела до відхилень у перебігу в 40 % випадків [165]. Наслідки дії хронічного неunikного стресу були менш трагічними і призвели до зникнення ознак вагітності лише в 6,5 % випадків. Також спостерігалася різниця щодо рівня захворюваності серед нащадків. Так, кількість хворих з посліду самок, що були імунізовані в період вагітності та хворіли, була значуще вищою, ніж серед тварин, чиї чутливі до ЕАЕ матері під час вагітності утримувалися за умов неunikного стресу. Динаміка розвитку ЕАЕ у нащадків також була асоційована з подіями, що супроводжували ембріональний розвиток. Самки з посліду матерів, які були імунізовані і хворіли на ЕАЕ у період вагітності, мали дуже повільне зниження рівня

рухових порушень. Вісім з десяти тварин все ще мали неврологічні порушення на 30 день спостереження, а середньодобовий показник рівня рухових порушень складав $2,06 \pm 0,61$ балів КІ. У той же час в останній день спостереження у пренатально стресованих самок рівень рухових порушень дорівнював $0,67 \pm 0,58$ балів КІ.

Розвиток хвороби і дія хронічного стресу, що діяли на матерів в період вагітності, мали різний вплив на динаміку ЕАЕ у самців з послідів чутливих до індукції ЕАЕ матерів. Хвороба матері під час вагітності визначила ранній початок та триваліший перебіг захворювання у нащадків-самців, ніж дія пренатального хронічного стресу. Однак різниці в показниках перебігу не спостерігалось. У пренатально стресованих самців з посліду резистентних до індукції ЕАЕ матерів імунізація призвела до більш тяжкого перебігу захворювання у порівнянні із самцями, чиї матері були імунізовані під час вагітності і виявилися резистентними до розвитку хвороби. Також була виявлена різниця в динаміці захворювання. Більш пролонгований перебіг спостерігався у самців, чиї матері були імунізовані під час вагітності, але не хворіли.

Таким чином, ми вважаємо, що пренатальний стрес виступає як специфічний фактор впливу, що приймає участь у формуванні чутливості до розвитку ЕАЕ та визначає особливості перебігу цього захворювання в залежності від статі нащадків і типу відповіді матерів до індукції ЕАЕ.

Висновки до розділу 6

1. Захворюваність та динаміка ЕАЕ залежать від комбінованого впливу таких факторів, як: «стать»—«умови пренатального розвитку»—«чутливість матері до індукції ЕАЕ»—«вік імунізації». Отримані дані свідчать про складну взаємодію цих факторів у формуванні схильності до розвитку ЕАЕ у щурів і нелінійну динаміку чутливості до індукції ЕАЕ впродовж проміжку часу від пубертатного періоду до віку зрілості щурів.

2. У щурів зрілого віку, які зазнали дії пренатального стресу, одним з предикторів, що визначає розвиток захворювання, був низький рівень статевих гормонів.

3. Значну роль у формуванні чутливості організмів до розвитку ЕАЕ відіграє активність ГГА осі, проте сама активність ГГА осі не визначається лише умовами пренатального розвитку. Питання впливу чутливості матерів до індукції ЕАЕ на формування активності ГГА осі у їхніх нащадків залишається відкритим.

4. Пренатальний стрес виступає як специфічний фактор впливу, що приймає участь у формуванні чутливості до розвитку ЕАЕ та визначає особливості перебігу цього захворювання в залежності від статі нащадків і чутливості матерів до розвитку захворювання.

Практичне значення: Результати роботи є важливими для розробки нових методів профілактики захворюваності на РС, прогнозуванні ризику розвитку захворювання у нащадків хворих на РС матерів, прогнозуванні перебігу захворювання в окремих категорій пацієнтів та визначення нових терапевтичних підходів при лікуванні РС.

Матеріали розділу опубліковані [143, 144, 173, 176].

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена дослідженню комбінованого впливу умов пренатального розвитку і спадковості на захворюваність та динаміку експериментального аутоімунного енцефаломієліту в щурів різної статі та віку. Крім того, вивчали рівень статевих гормонів і динаміку кортикостерону та його вторинного месенжера анексину-A1, що була викликана індукцією ЕАЕ у тварин зрілого віку.

На основі отриманих результатів зроблено наступні висновки.

1. Пренатальний стрес, перенесений в останньому триместрі ембріонального розвитку, веде до нівелювання вікової динаміки захворюваності на ЕАЕ. Формування майже однакової чутливості до імунізації на ЕАЕ у щурів пубертатного, молодого і зрілого віку відбулося завдяки значному підвищенню ризику розвитку хвороби у тварин пубертатного віку (63,4%), суттєвого його зменшення у тварин молодого віку (57,8%) та зниження чутливості до імунізації тварин зрілого віку (71,8%) в порівнянні з тваринами відповідного віку, чий пренатальний розвиток проходив за стандартних умов (37,7, 79,6 та 89,5%).

2. Комбінований вплив пренатального стресу та біологічних факторів (тип чутливості матері до індукції ЕАЕ, стать щурів) сприяє вік-залежному ризику розвитку ЕАЕ та його перебігу.

Частка хворих на ЕАЕ серед щурів пубертатного віку, що зазнали дії пренатального стресу, дещо вище ніж серед тварин, чий пренатальний розвиток проходив у стандартних умовах (Х група: 63,4%; ІХ група: 37,8%; $p=0,061$). Особливості перебігу ЕАЕ у пубертатному віці визначалися статтю тварин: у пренатально стресованих самок показники часу наростання моторної дисфункції (Х-♀: $T_{\text{п-макс}} = 3,8 \pm 1,8$ днів) і рівня максимальних рухових порушень (Х-♀: $KI_{\text{макс}} = 4,42 \pm 0,92$ балів KI) були вищими за відповідні показники у самок з групи контролю (ІХ-♀: $T_{\text{п-макс}} = 1,6 \pm 0,7$ днів, $p \leq 0,05$; $KI_{\text{макс}} = 3,34 \pm 1,51$ балів KI, $p=0,059$). У самців умови пренатального

розвитку не впливали на динаміку захворювання та показники рухових порушень.

У молодому віці кількість тварин з ознаками захворювання серед пренатально стресованих нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів дорівнювала 46,2%, що було нижче частки хворих як серед тварин з групи контролю (III-MX: 82,4%; $p \leq 0,05$), так і пренатально стресованих щурів з посліду резистентних матерів (IV-MP: 76,2%; $p \leq 0,05$). Найнижчий показник захворюваності (30,0%) спостерігався серед самок (IV-♀-MX). Хворі самці з посліду чутливих до індукції ЕАЕ матерів, що піддавались дії неunikного стресу, мали найнижчі показники важкості перебігу ЕАЕ (IV-♂-MX: $KI_{\text{макс}} = 2,42 \pm 1,48$ балів KI; $KI_{\text{ср}} = 1,76 \pm 1,00$ балів KI) та нульовий рівень смертності, що було значуще нижче ніж як у пренатально стресованих самців з посліду резистентних матерів (IV-♂-MP: 40%; $p \leq 0,05$), так і частки самців, що загинули серед нащадків чутливих до індукції ЕАЕ, чия вагітність проходила у стандартних умовах (III-♂-MX: 42,9%; $p \leq 0,05$).

У зрілому віці найменший рівень захворюваності на ЕАЕ спостерігався серед пренатально стресованих самців, нащадків чутливих до індукції ЕАЕ матерів (VIII-♂-MX: 25,0%). Така захворюваність була нижче ніж у пренатально стресованих самців з посліду резистентних матерів (VIII-♂-MP: 80,0%; $p \leq 0,05$). У самок, що зазнали дії пренатального стресу, показники тяжкості моторної дисфункції серед нащадків резистентних до імунізації на ЕАЕ матерів (VIII-♀-MP: $T_{KI \geq 2} = 2,5 \pm 2,7$ днів; $KI_{\text{макс}} = 2,80 \pm 1,52$ балів KI; $KI_{\text{ср.хв}} = 1,77 \pm 1,22$ балів KI) були значно нижче ніж у самок, чий розвиток проходив за стандартних умов (VII-♀-MP: $T_{KI \geq 2} = 8,1 \pm 2,5$ днів, $p \leq 0,05$; $KI_{\text{макс}} = 4,2 \pm 0,7$ балів KI, $p \leq 0,05$; $KI_{\text{ср.хв}} = 2,80 \pm 0,81$ днів, $p \leq 0,05$). .

3. Резистентність до індукції ЕАЕ у пренатально стресованих самців і самок зрілого віку поєднувалася з вищим рівнем тестостерону, ніж у тварин, що хворіли на ЕАЕ (VIII-♂-резистентні: $[Test] = 6,23 \pm 4,07$ нмоль/л; VIII-♂-чутливі: $[Test] = 2,90 \pm 3,39$ нмоль/л; $p \leq 0,05$) (VIII-♀-резистентні: $[Test] = 2,32 \pm 1,51$ нмоль/л; VIII-♀-і: $[Test] = 0,98 \pm 0,44$ нмоль/л; $p \leq 0,05$)

4. Динаміка кортикостерону та АnA1 у тварин зрілого віку після індукції ЕАЕ залежала від комбінованої дії факторів «стать щурів», «умови пренатального розвитку», «чутливість тварин до імунізації». У пренатально стресованих самців розвиток захворювання супроводжувався зниженням рівня кортикостерону (VIII-♂-чутливі: $Cort_0=13,04\pm1,36$ нмоль/л, $Cort_{10}=11,32\pm1,79$ нмоль/л; $p=0,07$) та АnA1 (VIII-♂-чутливі: $AnA1_0=6,31\pm0,56$ нмоль/л, $AnA1_{10}=5,39\pm0,38$ нмоль/л; $p\leq0,05$), тоді як у хворих самців з групи порівняння та резистентних самців, що зазнали дії пренатального стресу, зміни у рівні кортикостерону і анексину-а1 не були значущими (VII-♂-чутливі: $Cort_0=12,13\pm1,68$ нмоль/л, $Cort_{10}=11,63\pm0,59$ нмоль/л; $AnA1_0=6,64\pm0,88$ нмоль/л, $AnA1_{10}=5,67\pm0,88$ нмоль/л; VIII-♂-резистентні: $Cort_0=13,13\pm1,96$ нмоль/л, $Cort_{10}=11,61\pm1,53$ нмоль/л; $AnA1_0=5,85\pm0,67$ нмоль/л, $AnA1_{10}=5,52\pm1,02$ нмоль/л). У самок, що зазнали дії пренатального стресу, зниження рівня кортикостерону після імунізації на ЕАЕ спостерігалось як у чутливих до розвитку хвороби (VIII-♀-чутливі: $Cort_0=12,85\pm0,53$ нмоль/л, $Cort_{10}=11,40\pm1,39$ нмоль/л; $p=0,08$) так і у резистентних до індукції ЕАЕ тварин (VIII-♀-резистентні: $Cort_0=13,23\pm1,38$ нмоль/л, $Cort_{10}=10,40\pm0,62$ нмоль/л; $p\leq0,05$). Самки, що мали різні умови пренатального розвитку, але виявились чутливими до індукції ЕАЕ мали нижчі показники анексину-А1 на десятий день розвитку хвороби, ніж до індукції ЕАЕ (VII-♀-чутливі: $AnA1_0=7,13\pm1,04$ нмоль/л, $AnA1_{10}=6,19\pm0,48$ нмоль/л; $p=0,051$; VIII-♀-чутливі: $AnA1_0=6,58\pm0,21$ нмоль/л, $AnA1_{10}=4,51\pm0,79$ нмоль/л; $p\leq0,05$). У резистентних до розвитку хвороби пренатально стресованих самок суттєвих змін рівня анексину-А1 після імунізації не спостерігалось.

5. Імунізація матерів у період вагітності та дія неunikного стресу на вагітну самку мали різний вплив на формування схильності щодо розвитку ЕАЕ у нащадків матерів з різною чутливістю до імунізації на ЕАЕ. Хвороба матері в період вагітності поєднувалася з істотно більшим рівнем

захворюваності у імунізованих у молодому віці нащадків (94,7%), ніж дія неunikного стресу (46,2 %; $p \leq 0,05$). У самців – нащадків матерів, що хворіли на ЕАЕ під час вагітності, спостерігався більш ранній початок (XI-MX-♂: ЛП=7,0±1,1 днів) і триваліший перебіг захворювання (XI-MX-♂: $T_{хв}$ =20,3±4,8 днів), ніж у пренатально стресованих тварин з посліду чутливих до індукції ЕАЕ матерів (IV-MX-♂: ЛП=12,8±3,0 днів; $p \leq 0,05$; $T_{хв}$ = 8,2±6,2 днів; $p \leq 0,05$). У пренатально стресованих самців з посліду резистентних до ЕАЕ матерів, показники перебігу захворювання були вище, ніж у самців, чий матері виявилися резистентними до індукції ЕАЕ в період вагітності (IV-MP-♂: $KI_{\max}$ =4,25±1,91 балів KI; XI-MP-♂: $KI_{\max}$ = 2,14±1,28 балів KI; $p \leq 0,05$) (XI-MP-♂: $KI_{\text{ср.хв}}$ =3,05±1,63 балів KI; XI-MP-♂: $KI_{\text{ср.хв}}$ =1,26±0,61 балів KI; $p \leq 0,05$), проте тривалість хвороби була істотно коротшою (IV-MP-♂: $T_{хв}$ =6,9±4,0 днів; XI-MP-♂: $T_{хв}$ =17,9±6,2 днів; $p \leq 0,05$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Airas, L. (2015). Hormonal and gender-related immune changes in multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*, 132 (199), 62–70. <https://doi.org/10.1111/ane.12433>
2. Alexander, J. S., Minagar, A., Harper, M., Robinson-Jackson, S., Jennings, M., & Smith, S. J. (2007). Proteomic Analysis of Human Cerebral Endothelial Cells Activated by Multiple Sclerosis Serum and IFN β -1b. *Journal of Molecular Neuroscience*, 32, 169–178. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0018-3>
3. Amor, S., Peferoen, L. A., Vogel, D. Y., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., & van Noort, J. M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases -an update. *Immunology*, 142 (2), 151–166. <https://doi.org/10.1111/imm.12233>
4. Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of neurology*, 61 (6), 504–513. <https://doi.org/10.1002/ana.21141>
5. Ascherio, A., & Munger, K. L. (2010). 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clinical and experimental immunology*, 160 (1), 120–124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04121.x>
6. Barbazanges, A., Piazza, P. V., Le Moal, M., & Maccari, S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16 (12), 3943–3949. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-12-03943.1996>
7. Baxter A. G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews. Immunology*, 7 (11), 904–912. <https://doi.org/10.1038/nri2190>
8. Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Wolf, S., Beyer, M., Nitsch, R., & Zipp, F. (2002). Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *Journal of neuroimmunology*, 132 (1-2), 60–65. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00311-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00311-9)

9. Becklund, B. R., Severson, K. S., Vang, S. V., & DeLuca, H. F. (2010). UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (14), 6418–6423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001119107>
10. Bellavance, M. A., & Rivest, S. (2014). The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Frontiers in immunology*, 5, 136. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00136>
11. Bellinger, D. L., Lubahn, C., & Lorton, D. (2008). Maternal and early life stress effects on immune function: relevance to immunotoxicology. *Journal of immunotoxicology*, 5 (4), 419–444. <https://doi.org/10.1080/15476910802483415> (Retraction published Cohen M, Roulleau J. J Immunotoxicol. 2011 Oct-Dec; 8 (4):399).
12. Belman, A. L., Krupp, L. B., Olsen, C. S., Rose, J. W., Aaen, G., Benson, L., Chitnis, T., Gorman, M., Graves, J., Harris, Y., Lotze, T., Ness, J., Rodriguez, M., Tillema, J. M., Waubant, E., Weinstock-Guttman, B., Casper, T. C., & US Network of Pediatric MS Centers (2016). Characteristics of Children and Adolescents With Multiple Sclerosis. *Pediatrics*, 138 (1), e20160120. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0120>
13. Bennett, J., Basivireddy, J., Kollar, A., Biron, K. E., Reickmann, P., Jefferies, W. A., & McQuaid, S. (2010). Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. *Journal of neuroimmunology*, 229 (1-2), 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.011>
14. Blair, T. C., Manoharan, M., Rawlings-Rhea, S. D., Tagge, I., Kohama, S. G., Hollister-Smith, J., Ferguson, B., Woltjer, R. L., Frederick, M. C., Pollaro, J., Rooney, W. D., Sherman, L. S., Bourdette, D. N., & Wong, S. W. (2016). Immunopathology of Japanese macaque encephalomyelitis is similar to multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 291, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.11.026>

15. Bolton, C., O'Neill, J. K., Allen, S. J., & Baker, D. (1997) Regulation of Chronic Relapsing Experimental Allergic Encephalomyelitis by Endogenous and Exogenous Glucocorticoids. *Int Arch Allergy Immunol* 114, 74-80. DOI: 10.1159/000237646
16. Born, J., Ditschuneit, I., Schreiber, M., Dodt, C., & Fehm, H. L. (1995). Effects of age and gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans. *European journal of endocrinology*, 132(6), 705–711. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1320705>
17. Bove, R. M., Healy, B., Augustine, A., Musallam, A., Gholipour, T., & Chitnis, T. (2012). Effect of gender on late-onset multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 18 (10), 1472–1479. <https://doi.org/10.1177/1352458512438236>
18. Brown, D. A., & Sawchenko, P. E. (2007) Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Comparative Neurology* 502 (2), 236-260. DOI: 10.1002/cne.21307.
19. Brunton, P. J., Donadio, M. V., Yao, S. T., Greenwood, M., Seckl, J. R., Murphy, D., & Russell, J. A. (2015). 5 α -Reduced neurosteroids sex-dependently reverse central prenatal programming of neuroendocrine stress responses in rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35 (2), 666–677. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5104-13.2015>
20. Bsibsi, M., Peferoen, L. A., Holtman, I. R., Nacken, P. J., Gerritsen, W. H., Witte, M. E., van Horssen, J., Eggen, B. J., van der Valk, P., Amor, S., & van Noort, J. M. (2014). Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN- γ and alpha B-crystallin. *Acta neuropathologica*, 128 (2), 215–229. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1317-8>
21. Buckingham, J. C., John, C. D., Solito, E., Tierney, T., Flower, R.J., Christian, H. & Morris, J. (2006), Annexin 1, Glucocorticoids, and the

Neuroendocrine–Immune Interface. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088, 396–409. doi:10.1196/annals.1366.002

22. Burrows, D. J., McGown, A., Jain, S. A., De Felice, M., Ramesh, T. M., Sharrack, B., & Majid, A. (2019). Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 25 (3), 306–324. <https://doi.org/10.1177/1352458518805246>

23. Canto, E., & Oksenberg, J. R. (2018). Multiple sclerosis genetics. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24 (1), 75–79. <https://doi.org/10.1177/1352458517737371>

24. Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., & Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews*, 213, 48–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x>

25. Chen Cardenas, S. M., Mayer, N., Romanini, M. C., Rolando, A. N., Liaudat, A. C., Brun N., Vivas, A., Gauna, H. F., & Rodríguez, N. (2013). Reproductive response in offspring male rats exposed to prenatal stress and to early postnatal stimulation. *Int. J. Morphol.* 31 (2), 754–764. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000200065>.

26. Chitnis T. (2018). The role of testosterone in MS risk and course. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24 (1), 36–41. <https://doi.org/10.1177/1352458517737395>

27. Columba-Cabezas, S., Iaffaldano, G., Chiarotti, F., Alleva, E., & Cirulli, F. (2009). Early handling increases susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 male mice. *Journal of neuroimmunology*, 212 (1-2), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.05.007>

28. Compston A. (1999). The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354 (1390), 1623–1634. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0507>

29. Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovis-Tourniaire, P., & Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis.

Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *The New England journal of medicine*, 339 (5), 285–291. <https://doi.org/10.1056/NEJM199807303390501>

30. Confavreux, C., & Vukusic, S. (2006). Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 129 (Pt 3), 595–605. <https://doi.org/10.1093/brain/awh714>

31. Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*, 164 (4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>

32. Cravens, P. D., Kieseier, B. C., Hussain, R., Herndon, E., Arellano, B., Ben, L. H., Timmons, B. C., Castro-Rojas, C., Hartung, H. P., Hemmer, B., Weber, M. S., Zamvil, S. S., & Stüve, O. (2013). The neonatal CNS is not conducive for encephalitogenic Th1 T cells and B cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*, 10, 67. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-67>

33. Cristante, E., McArthur, S., Mauro, C., Maggioli, E., Romero, I. A., Wylezinska-Arridge, M., Couraud, P. O., Lopez-Tremoleda, J., Christian, H. C., Weksler, B. B., Malaspina, A., & Solito, E. (2013). Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (3), 832–841. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209362110>

34. Croxford, A. L., Kurschus, F. C., Waisman, A. (2011) Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812 (2), 177-183. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.06.010.

35. D'Acquisto, F., Paschalidis, N., Sampaio, A. L., Merghani, A., Flower, R. J., & Perretti, M. (2007). Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells. *European journal of immunology*, 37 (11), 3131–3142. <https://doi.org/10.1002/eji.200636792>.

36. Darnaudéry, M., & Maccari, S. (2008). Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain research reviews*, 57 (2), 571–585. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.11.004>
37. Damotte, V., Guillot-Noel, L., Patsopoulos, N. A., Madireddy, L., El Behi, M., International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, De Jager, P. L., Baranzini, S. E., Cournu-Rebeix, I., & Fontaine, B. (2014). A gene pathway analysis highlights the role of cellular adhesion molecules in multiple sclerosis susceptibility. *Genes and immunity*, 15 (2), 126–132. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.70>
38. de Boer, A.G., Gaillard, P.J. (2006). Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *Journal of Neural Transmission* 113 (4), 455-462. DOI: 10.1007/s00702-005-0375-4.
39. Delalande, S., De Seze, J., Ferriby, D., Stojkovic, T., & Vermersch, P. (2002). Sclérose en plaques de début tardif [Late onset multiple sclerosis]. *Revue neurologique*, 158 (11), 1082–1087. doi : RN-01-2002-1-1-1111-101019-ART4
40. Denic, A., Johnson, A. J., Bieber, A. J., Warrington, A. E., Rodriguez, M., & Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology*, 18 (1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2010.04.004>
41. Dietrich J. B. (2002). The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *Journal of neuroimmunology*, 128 (1-2), 58–68. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00114-5](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00114-5)
42. DiSano, K. D., Linzey, M. R., Royce, D. B., Pachner, A. R., & Gilli, F. (2019). Differential neuro-immune patterns in two clinically relevant murine models of multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 16 (1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1501-9>
43. Djikić, J., Nack-Aleksić, M., Pilipović, I., Bufan, B., Kosec, D., Dimitrijević, M., Leposavić, G. (2014) Age-associated changes in rat immune system: lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Experimental Gerontology*, 58, 179-197. doi: 10.1016/j.exger.2014.08.005

44. Duma, D., Collins, J. B., Chou, J. W., & Cidlowski, J. A. (2010). Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence. *Science signaling*, 3 (143), ra74. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001077>
45. Edwards, H. E., & Burnham, W. M. (2001). The impact of corticosteroids on the developing animal. *Pediatric research*, 50 (4), 433–440. <https://doi.org/10.1203/00006450-200110000-00003>
46. Engelhardt B. (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 113 (4), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0409-y>
47. Engelhardt, B., Laschinger, M., Schulz, M., Samulowitz, U., Vestweber, D., & Hoch, G. (1998). The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *The Journal of clinical investigation*, 102 (12), 2096–2105. <https://doi.org/10.1172/JCI4271>
48. Engler, J. B., Kursawe, N., Solano, M. E., Patas, K., Wehrmann, S., Heckmann, N., Lühder, F., Reichardt, H. M., Arck, P. C., Gold, S. M., & Friese, M. A. (2017). Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (2), E181–E190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617115114>
49. Epitools (2020) *Calculate confidence limits for a sample proportion*. Retrieved from <https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>
50. Eurostat (2021) *Population on 1 January by age and sex*. Retrieved from https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=demo_pjan&lang=en
51. Feinstein A. (2011). Multiple sclerosis and depression. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17 (11), 1276–1281. <https://doi.org/10.1177/1352458511417835>
52. Finkelsztejn, A., Brooks, J. B., Paschoal, F. M., Jr, & Fragoso, Y. D. (2011). What can we really tell women with multiple sclerosis regarding

pregnancy? A systematic review and meta-analysis of the literature. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 118 (7), 790–797. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.02931.x>

53. Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., & Mills, K. H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology*, 162 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x>

54. Floris, S., Blezer, E. L., Schreibelt, G., Döpp, E., van der Pol, S. M., Schadee-Eestermans, I. L., Nicolay, K., Dijkstra, C. D., & de Vries, H. E. (2004). Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain: a journal of neurology*, 127 (Pt 3), 616–627. <https://doi.org/10.1093/brain/awh068>

55. Flügel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., Ellwart, J. W., Willem, M., Lassmann, H., & Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 14 (5), 547–560. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00143-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00143-1)

56. Franchimont D. (2004). Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, 124–137. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.009>

57. Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P. S., & Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain: a journal of neurology*, 132 (Pt 5), 1175–1189. <https://doi.org/10.1093/brain/awp070>

58. Gerardin, D. C., Pereira, O. C., Kempinas, W. G., Florio, J. C., Moreira, E. G., & Bernardi, M. M. (2005). Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiology & behavior*, 84 (1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.10.014>

59. Go, K. G., Ter Haar, J. G., de Ley, L., Zuiderveen, F., Parente, L., Solito, E., & Molenaar, W. M. (1994). The effect of steroid treatment on lipocortin immunoreactivity of rat brain. *Mediators of inflammation*, 3 (3), 177–180. <https://doi.org/10.1155/S0962935194000232>
60. Gold, R., Linington, C., & Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain: a journal of neurology*, 129 (Pt 8), 1953–1971. <https://doi.org/10.1093/brain/awl075>
61. Gold, S. M., Sasidhar, M. V., Lagishetty, V., Spence, R. D., Umeda, E., Ziehn, M. O., Krieger, T., Schulz, K. H., Heesen, C., Hewison, M., & Voskuhl, R. R. (2012). Dynamic development of glucocorticoid resistance during autoimmune neuroinflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97 (8), E1402–E1410. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1294>
62. Gold, S. M., Willing, A., Leypoldt, F., Paul, F., & Friese, M. A. (2019). Sex differences in autoimmune disorders of the central nervous system. *Seminars in immunopathology*, 41 (2), 177–188. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0723-8>
63. Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L. P., Hood, L., & Zaller, D. M. (1993). Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, 72 (4), 551–560. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90074-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90074-z)
64. Graesser, D., Solowiej, A., Bruckner, M., Osterweil, E., Juedes, A., Davis, S., Ruddle, N. H., Engelhardt, B., & Madri, J. A. (2002). Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 109 (3), 383–392. <https://doi.org/10.1172/JCI13595>
65. Graves, M. C., Benton, M., Lea, R. A., Boyle, M., Tajouri, L., Macartney-Coxson, D., Scott, R. J., & Lechner-Scott, J. (2014). Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4⁺ T-Cells are associated with multiple sclerosis. *Multiple*

sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England), 20 (8), 1033–1041.
<https://doi.org/10.1177/1352458513516529>

66. Greenstein J. I. (2007). Current concepts of the cellular and molecular pathophysiology of multiple sclerosis. *Developmental neurobiology*, 67 (9), 1248–1265. <https://doi.org/10.1002/dneu.20387>

67. Greer, J. M., McCombe, P. A. (2012) The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics*. 6, 307-327
<https://doi.org/10.2147/BTT.S24067>

68. Gubbels Bupp, M. R., & Jorgensen, T. N. (2018). Androgen-Induced Immunosuppression. *Frontiers in immunology*, 9, 794.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00794>

69. Handel, A. E., Giovannoni, G., Ebers, G. C., & Ramagopalan, S. V. (2010). Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 6(3), 156–166. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.1>

70. Hart B. A. (2019). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset: a translationally relevant model for the cause and course of multiple sclerosis. *Primate biology*, 6 (1), 17–58. <https://doi.org/10.5194/pb-6-17-2019>

71. Hendriks, J. J., Teunissen, C. E., de Vries, H. E., & Dijkstra, C. D. (2005). Macrophages and neurodegeneration. *Brain research. Brain research reviews*, 48 (2), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.008>

72. Herrera, B. M., Ramagopalan, S. V., Lincoln, M. R., Orton, S. M., Chao, M. J., Sadovnick, A. D., & Ebers, G. C. (2008). Parent-of-origin effects in MS: observations from avuncular pairs. *Neurology*, 71 (11), 799–803.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000312377.50395.00>

73. Hooke laboratories (2020) *EAE induction by active immunization in Lewis Rats*. Retrieved from https://hookelabs.com/protocols/eaeAI_LewisRats.html

74. Hoppenbrouwers, I. A., Liu, F., Aulchenko, Y. S., Ebers, G. C., Oostra, B. A., van Duijn, C. M., & Hintzen, R. Q. (2008). Maternal transmission of multiple

sclerosis in a dutch population. *Archives of neurology*, 65 (3), 345–348.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.63>

75. Hughes, R. A., & Stedronska, J. (1973). The susceptibility of rat strains to experimental allergic encephalomyelitis. *Immunology*, 24 (5), 879–884.

76. Huitinga, I., Bauer, J., Strijbos, P. J., Rothwell, N. J., Dijkstra, C. D., & Tilders, F. J. (1998). Effect of annexin-1 on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the rat. *Clinical and experimental immunology*, 111 (1), 198–204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00490.x>

77. Klaren, R. E., Stasula, U., Steelman, A. J., Hernandez, J., Pence, B. D., Woods, J. A., & Motl, R. W. (2016). Effects of exercise in a relapsing-remitting model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, 94 (10), 907–914. <https://doi.org/10.1002/jnr.23783>

78. Koch, M. W., Metz, L. M., & Kovalchuk, O. (2013). Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 9 (1), 35–43. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.226>

79. Korn T. (2008). Pathophysiology of multiple sclerosis. *Journal of neurology*, 255 Suppl 6, 2–6. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-6001-2>

80. Kumagai, C., Kalman, B., Middleton, F. A., Vyshkina, T., & Massa, P. T. (2012). Increased promoter methylation of the immune regulatory gene SHP-1 in leukocytes of multiple sclerosis subjects. *Journal of neuroimmunology*, 246 (1-2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.03.003>

81. Laban, O., Dimitrijević, M., von Hoersten, S., Marković, B. M., Janković, B. D. (1995) Experimental allergic encephalomyelitis in adult DA rats subjected to neonatal handling or gentling. *Brain Research*, 676 (1), 133-140. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00106-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00106-Z)

82. Lassmann H. (2019). Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology*, 9, 3116. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03116>

83. Lassmann, H., & Ransohoff, R. M. (2004). The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends in immunology*, 5 (3), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.01.007>
84. Lassmann, H., van Horssen, J., & Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature reviews. Neurology*, 8 (11), 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168>
85. Lavi E., Constantinescu C. S. (Ed.). (2005). *Experimental Models of Multiple Sclerosis* (pp.73-84). Springer Science & Business Media, 902 p.
86. Lee, Y., Zhu, B., Pulicicchio, C., McMonagle-Strucko, K., Wettstein, J. G., & Cosmatos, D. (2003). Statistical method for analysis of the disease curve in animals with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of biopharmaceutical statistics*, 13 (1), 141–158. <https://doi.org/10.1081/BIP-120017731>
87. Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., & Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue neurologique*, 172 (1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.006>
88. Linthicum, D. S., Munoz, J. J., & Blaskett, A. (1982). Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cellular immunology*, 73 (2), 299–310. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(82\)90457-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(82)90457-9)
89. Lotti, C., Oliveira, A., Bichuetti, D. B., Castro, I., & Oliveira, E. (2017). Late onset multiple sclerosis: concerns in aging patients. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 75 (7), 451–456. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20170070>
90. Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46 (4), 907–911. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>
91. Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., ... Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple

sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83 (3), 278–286.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>

92. Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology*, 47 (6), 707–717.
[https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q)

93. Lukic, M. L., Mensah-Brown, E., Galadari, S., & Shahin, A. (2001). Lack of apoptosis of infiltrating cells as the mechanism of high susceptibility to EAE in DA rats. *Developmental immunology*, 8 (3-4), 193–200.
<https://doi.org/10.1155/2001/32636>

94. Machado-Santos, J., Saji, E., Tröscher, A. R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., ... Lassmann, H. (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain: a journal of neurology*, 141 (7), 2066–2082.
<https://doi.org/10.1093/brain/awy151>

95. MacKenzie-Graham, A. J., Rinek, G. A., Avedisian, A., Morales, L. B., Umeda, E., Boulat, B., ... Voskuhl, R. R. (2012). Estrogen treatment prevents gray matter atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, 90 (7), 1310–1323. <https://doi.org/10.1002/jnr.23019>

96. MacPhee, I. A., Antoni, F. A., & Mason, D. W. (1989). Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. *The Journal of experimental medicine*, 169 (2), 431–445.
<https://doi.org/10.1084/jem.169.2.431>

97. Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Bréant, B., Hahn, T., Darnaudéry, M., ... Viltart, O. (2007). Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292 (6), E1526–E1533. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00574.2006>

98. Mason, D., MacPhee, I., & Antoni, F. (1990). The role of the neuroendocrine system in determining genetic susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Immunology*, 70 (1), 1–5.
99. Matysiak, M., Makosa, B., Walczak, A., & Selmaj, K. (2008). Patients with multiple sclerosis resisted to glucocorticoid therapy: abnormal expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid receptor complex. *Multiple Sclerosis Journal*, 14 (7), 919–926. <https://doi.org/10.1177/1352458508090666>
100. Mayr, W. T., Pittock, S. J., McClelland, R. L., Jorgensen, N. W., Noseworthy, J. H., & Rodriguez, M. (2003). Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. *Neurology*, 61 (10), 1373–1377. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000094316.90240.eb>
101. McCarthy, D. P., Richards, M. H., & Miller, S. D. (2012). Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods in molecular biology (Clifton, N. J.)*, 900, 381–401. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-720-4_19
102. McClain, M. A., Gatson, N. N., Powell, N. D., Papenfuss, T. L., Gienapp, I. E., Song, F., ... Whitacre, C. C. (2007). Pregnancy suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through immunoregulatory cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 179 (12), 8146–8152. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8146>
103. McQuaid, S., Cunnea, P., McMahon, J., & Fitzgerald, U. (2009). The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. *Biochemical Society transactions*, 37 (Pt 1), 329–331. <https://doi.org/10.1042/BST0370329>
104. MedCalc (2020) *Free statistical calculator*. Retrieved from https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php
105. Miljković, D., & Spasojević, I. (2013). Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 19 (18), 2286–2334. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5068>

106. Miller, D. H., Khan, O. A., Sheremata, W. A., Blumhardt, L. D., Rice, G. P., Libonati, M. A., ... International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 348 (1), 15–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020696>
107. Milo, R., & Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews*, 9 (5), A387–A394. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.010>
108. Minagar, A., Alexander, J. S., Kelley, R. E., Harper, M., & Jennings, M. H. (2009). Proteomic analysis of human cerebral endothelial cells activated by glutamate/MK-801: significance in ischemic stroke injury. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 38 (2), 182–192. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9149-4>
109. Muñoz-Culla, M., Irizar, H., & Otaegui, D. (2013). The genetics of multiple sclerosis: review of current and emerging candidates. *The application of clinical genetics*, 6, 63–73. <https://doi.org/10.2147/TACG.S29107>
110. Nacka-Aleksić, M., Djikić, J., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., ... Leposavić, G. (2015). Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level. *Brain, behavior, and immunity*, 49, 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.017>
111. Namer, I. J., Steibel, J., Poulet, P., Mauss, Y., Mohr, M., & Chambron, J. (1994). The role of Mycobacterium tuberculosis in experimental allergic encephalomyelitis. *European neurology*, 34 (4), 224–227. <https://doi.org/10.1159/000117043>
112. O'Gorman, C., Lin, R., Stankovich, J., & Broadley, S. A. (2013). Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*, 40 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1159/000341902>
113. O'Gorman, C., Lucas, R., & Taylor, B. (2012). Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms.

International journal of molecular sciences, 13 (9), 11718–11752.
<https://doi.org/10.3390/ijms130911718>

114. Oksenberg, J. R., Sherritt, M., Begovich, A. B., Erlich, H. A., Bernard, C. C., Cavalli-Sforza, L. L., & Steinman, L. (1989). T-cell receptor V alpha and C alpha alleles associated with multiple and myasthenia gravis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (3), 988–992.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.3.988>

115. Orton, S.-M., Herrera, B. M., Yee, I. M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V., Sadovnic, D., Ebers, G. C. (2006) Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurology*, 11, 932–936. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70581-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70581-6)

116. Palaszynski, K. M., Loo, K. K., Ashouri, J. F., Liu, H., Voskuhl, R. R. (2004) Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 146 (1–2), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.11.004>.

117. Papenfuss, T. L., Rogers, C. J., Gienapp, I., Yurrita, M., McClain, M., Damico, N., ... Whitacre, C. C. (2004). Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *Journal of neuroimmunology*, 150 (1-2), 59–69.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.01.018>

118. Paschalidis, N., Iqbal, A. J., Maione, F., Wood, E. G., Perretti, M., Flower, R. J., & D'Acquisto, F. (2009). Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by endogenous annexin A1. *Journal of neuroinflammation*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-33>

119. Patsopoulos, N. A., Bayer Pharma MS Genetics Working Group, Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1b and a CCR1-Antagonist, ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Esposito, F., Reischl, J., Lehr, S., Bauer, D., Heubach, J., Sandbrink, R., Pohl, C., Edan, G., Kappos, L., Miller, D., Montalbán, J., Polman, C. H., Freedman, M. S., Hartung, H. P., de Bakker, P. I. (2011). Genome-wide meta-

analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Annals of neurology*, 70 (6), 897–912. <https://doi.org/10.1002/ana.22609>

120. Peers, S. H., Duncan, G. S., Flower, R. J., & Bolton, C. (1995). Endogenous corticosteroids modulate lymphoproliferation and susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in the Brown Norway rat. *International archives of allergy and immunology*, 106 (1), 20–24. <https://doi.org/10.1159/000236885>

121. Pena, J. A., & Lotze, T. E. (2013). Pediatric multiple sclerosis: current concepts and consensus definitions. *Autoimmune diseases*, 673947. <https://doi.org/10.1155/2013/673947>

122. Pender, M. P. (1995) ‘Experimental Autoimmune Encephalomyelitis’, in Pender, M. P. and McCombe, P. A. (eds), *Autoimmune Neurological Disease* (pp. 26- 88). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

123. Perretti, M., & D'Acquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 9 (1), 62–70. <https://doi.org/10.1038/nri2470>

124. Ramagopalan, S. V., & Ebers, G. C. (2009). Multiple sclerosis: major histocompatibility complexity and antigen presentation. *Genome medicine*, 1 (11), 105. <https://doi.org/10.1186/gm105>

125. Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*, 378 (2), 169–180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>

126. Reul, J. M., Stec, I., Wiegers, G. J., Labeur, M. S., Linthorst, A. C., Arzt, E., & Holsboer, F. (1994). Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. *The Journal of clinical investigation*, 93 (6), 2600–2607. <https://doi.org/10.1172/JCI117272>

127. Ribbons, K. A., McElduff, P., Boz, C., Trojano, M., Izquierdo, G., Duquette, P., ... Lechner-Scott, J. (2015). Male Sex Is Independently Associated with Faster Disability Accumulation in Relapse-Onset MS but Not in Primary

Progressive MS. *PloS one*, 10 (6), e0122686.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122686>

128. Richert, N. D., Ostuni, J. L., Bash, C. N., Leist, T. P., McFarland, H. F., & Frank, J. A. (2001). Interferon beta-1b and intravenous methylprednisolone promote lesion recovery in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 7 (1), 49–58.
<https://doi.org/10.1177/135245850100700109>

129. Sandyk R. (1995). Premenstrual exacerbation of symptoms in multiple sclerosis is attenuated by treatment with weak electromagnetic fields. *The International journal of neuroscience*, 83 (3-4), 187–198.
<https://doi.org/10.3109/00207459508986338>

130. Schilling, S., Goelz, S., Linker, R., Luehder, F., & Gold, R. (2006). Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clinical and experimental immunology*, 145 (1), 101–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03094.x>

131. Seo, J. E., Hasan, M., Han, J. S., Kang, M. J., Jung, B. H., Kwok, S. K., ... Kwon, O. S. (2015). Experimental autoimmune encephalomyelitis and age-related correlations of NADPH oxidase, MMP-9, and cell adhesion molecules: The increased disease severity and blood-brain barrier permeability in middle-aged mice. *Journal of neuroimmunology*, 287, 43–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.08.005>

132. Sicotte, N. L., Giesser, B. S., Tandon, V., Klutch, R., Steiner, B., Drain, A. E., ... Voskuhl, R. R. (2007). Testosterone treatment in multiple sclerosis: a pilot study. *Archives of neurology*, 64 (5), 683–688.
<https://doi.org/10.1001/archneur.64.5.683>

133. Simmons, S. B., Pierson, E. R., Lee, S. Y., & Goverman, J. M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends in immunology*, 34 (8), 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.006>

134. Simon, K. C., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2011). XVI European Charcot Foundation lecture: nutrition and environment: can MS be prevented?

Journal of the neurological sciences, 311 (1-2), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.09.009>

135. Smith-Bouvier, D. L., Divekar, A. A., Sasidhar, M., Du, S., Tiwari-Woodruff, S. K., King, J. K., ... Voskuhl, R. R. (2008). A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*, 205 (5), 1099–1108.
<https://doi.org/10.1084/jem.20070850>

136. Sospedra M. (2018). B cells in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 31 (3), 256–262. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000563>

137. Stosic-Grujicic, S., Ramic, Z., Bumbasirevic, V., Harhaji, L., & Mostarica-Stojkovic, M. (2004). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant. *Clinical and experimental immunology*, 136 (1), 49–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02418.x>

138. Swanborg R. H. (2001). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunological reviews*, 184, 129–135. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1840112.x>

139. Tenenbaum S. (2011). Multiple sclerosis in childhood and adolescence. *Journal of the neurological sciences*, 311 Suppl 1, S53–S57.
[https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(11\)70010-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(11)70010-7)

140. Terry, R. L., Ifergan, I., & Miller, S. D. (2016). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1304, 145–160. https://doi.org/10.1007/7651_2014_88

141. Tiwari-Woodruff, S., Morales, L. B., Lee, R., & Voskuhl, R. R. (2007). Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta ligand treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (37), 14813–14818.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703783104>

142. Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., ... Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens

junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *The Journal of cell biology*, 208 (6), 821–838. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404140>

143. Utevska, S. V., Geyko, V. V., & Berchenko, O. G. (2017). Effect of prenatal stress on the risk of the development and the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. In G. Bakalkin, O. Berezovska (Chairmen), *Cellular and molecular mechanisms of brain dysfunctions VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, Kyiv, Ukraine. Retrieved from http://usn.org.ua/data/uploads/USN_Congress_2017.pdf

144. Utevska, S., Geyko, V., & Berchenko, O. (2019). Prenatal stress-induced sex differences in the incidence and the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in adult rats, the offspring of mothers with different sensitivity to EAE (Poster Session 2). *Acta Neurobiologiae Experimentalis (14th International Congress of the Polish Neuroscience Society)*, 79, P.LXXIX. https://ptbun.org.pl/wp-content/uploads/2021/08/Acta-Neurobiol-Exp-2019_79_supplement.pdf

145. Vandenbroeck, K., Alvarez, J., Swaminathan, B., Alloza, I., Matesanz, F., Urcelay, E., ... Aransay, A. (2012). A cytokine gene screen uncovers SOCS1 as genetic risk factor for multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 13 (1), 21–28. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.44>

146. Viltart, O., & Vanbesien-Mailliot, C. C. (2007). Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *The Scientific World Journal*, 7, 1493–1537. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.204>

147. Voskuhl, R. R., Patel, K., Paul, F., Gold, S. M., Scheel, M., Kuchling, J., ... MacKenzie-Graham, A. (2020). Sex differences in brain atrophy in multiple sclerosis. *Biology of sex differences*, 11 (1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00326-3>

148. Voskuhl, R. R., Sawalha, A. H., & Itoh, Y. (2018). Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 24 (1), 22–31. <https://doi.org/10.1177/1352458517737394>

149. Voskuhl, R. R., Wang, H., Wu, T C J., Sicotte, N. L., Nakamura, K., Kurth, F., ... Elashoff, R. (2016) Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, 15 (1), 35-46. DOI 10.1016/s1474-4422(15)00322-1
150. Wallin, M. T., Culpepper, W. J., Nochols, E., Bhutta, Z. A., Gebrehiwot, T. T., Hay, S. I., ... Murray, C. J. L. (2019) Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016” *The Lancet Neurology*, 18 (3), 269–285. Doi:10.1016/S1474-4422(18)30443-5
151. Weissert R. (2013). The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8 (4), 857–866. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9467-3>
152. Wellek, A., Korsukewitz, C., Bach, J. P., Schock, S., Eienbröcker, C., Seitz, F., ... Tackenberg, B. (2011). Sibling disability risk at onset and during disease progression in familial multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17 (9), 1060-6. <https://doi.org/10.1177/1352458511405088>
153. Westerlind, H., Boström, I., Stawiarz, L., Landtblom, A.-M., Almqvist, C., & Hillert, J. (2014). New data identify an increasing sex ratio of multiple sclerosis in Sweden. *Multiple Sclerosis Journal*, 20 (12), 1578–1583. <https://doi.org/10.1177/1352458514530021>
154. Wüst, S., van den Brandt, J., Tischner, D., Kleiman, A., Tuckermann, J. P., Gold, R., Lühder, F., & Reichardt, H. M. (2008). Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180 (12), 8434–8443. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8434>
155. Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., & Karin, N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis

by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356 (6364), 63–66.
<https://doi.org/10.1038/356063a0>

156. Ysraelit, M. C., Gaitán, M. I., Lopez, A. S., & Correale, J. (2008). Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 71 (24), 1948–1954.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000336918.32695.6b>

157. Ziehn, M. O., Avedisian, A. A., Dervin, S. M., Umeda, E. A., O'Dell, T. J., & Voskuhl, R. R. (2012). Therapeutic testosterone administration preserves excitatory synaptic transmission in the hippocampus during autoimmune demyelinating disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32 (36), 12312–12324.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2796-12.2012>

158. Zipp, F., Martin, R., Lichtenfels, R., Roth, W., Dichgans, J., Krammer, P. H., & Weller, M. (1997). Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by soluble recombinant CD95 ligand. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159 (5), 2108–2115.

159. Zhu, M. L., Bakhru, P., Conley, B., Nelson, J. S., Free, M., Martin, A., ... Su, M. A. (2016). Sex bias in CNS autoimmune disease mediated by androgen control of autoimmune regulator. *Nature communications*, 7, 11350.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11350>

160. Zorgdrager, A., & De Keyser, J. (1997). Menstrually related worsening of symptoms in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 149 (1), 95–97. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)05396-3](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)05396-3)

161. Атраментова Л. А., & Утевская О. М. (2008) Статистические методы в биологии. Горлівка: ПП «Видавництво Ліхтар».

162. Гейко, В. В. (2015). 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*. 23 (1), 29–31. <https://uvnnpn.com.ua/arkhiv-nomeriv/2015/tom-23-vipusk-1-82>

163. Гейко, В. В. (2016). Экспериментальное исследование половых аспектов «семейного» рассеянного склероза в зависимости от типа и степени наследственной отягощенности. *Український вісник психоневрології*. 24 (4), 19–23. <https://uvnnpn.com.ua/arkhiv-nomeriv/2016/tom-24-vipusk-4-89>

164. Гейко, В. В., Берченко, О. Г., & Утевська С. В. (2019) Формування експериментального аутоімунного енцефаломієліту у потомства чутливих і стійких до його індукції щурів як моделі «сімейних» форм розсіяного склерозу. *Журнал національної академії медичних наук України*. 25 (1), 21–24. ISSN 2413–7944. <http://journal.amnu.gov.ua/images/pdf/2019-25-1/5.pdf>

165. Гейко, В. В., & Утевская, С. В. (2014) Беременность и индуцированный на разных сроках гестационного периода экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит. *Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова. Спецвыпуски*, 114 (10), 25-32 PMID:25591531 <https://www.mediasphera.ru/issues/zhurnal-nevrologii-i-psikhiatrii-im-s-s-korsakova-2/2014/10/031997-729820141031>

166. Гелашвили О. А. (2008) Вариант периодизации биологически сходных стадий человека и крысы. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 22 (4), 125-126. https://ssmj.ru/system/files/2008_04_125_126.pdf

167. Експертна рада Модератор: Негрич Т. І. (2020) Розсіяний склероз в Україні: персоналізована стратегія лікування. *НейроNews: психоневрологія та нейропсихіатрія*, 5 (116), 54–57, ISSN 2312-2064

168. Закон України № 3447-IV (2006) Про захист тварин від жорстокого поводження (<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>)

169. Кабак Я. М. (1968) Практикум по эндокринологии. Основные методы в экспериментально-эндокринологических исследованиях. Москва: Издательство МГУ.

170. Про деякі питання застосування Україномовного варіанту Міжнародної класифікації первинної медичної допомоги (ICPC-2-E). Наказ

МОЗ України № 13 від 04.01.2018 (<https://moz.gov.ua/article/ministry-mandates/nakaz-moz-ukraini-vid-04012018--13>)

171. Пинелис В. Г., Вакулин Т. П., Козлова А. В., & Марков Х. М. (1982) Состояние резистентности крыс с наследственно обусловленной гипертензией. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 94 (10), 31-36.

172. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Наказ Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249 від 01.03.2012. (<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>)

173. Утевська, С. В. (2016, жовтень) *Вплив пренатального стресу на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель розсіяного склерозу) у щурів репродуктивного віку*. Матеріали VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» с. 237. Харків, Україна. Retrieved from <https://pat.nuph.edu.ua/pdf/tezi.pdf>

174. Утевська, С. В. (2017, березень) *Особливості розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель розсіяного склерозу) у пренатально стресованих щурів в залежності від віку*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокрінології (Шістнадцяті Данилевські читання)» с. 108-109. м. Харків, Україна.

175. Утевська С. В. (2019) Перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) у пренатально-стресованих самців щурів, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 24. 244-248. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1109> ISSN 2415–3826

176. Утевская С. В., & Гейко В. В. (2018) Половые особенности заболеваемости и течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита у крыс под влиянием пренатального стресса. *Фактори*

експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. 23. 238-243.

DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1021>

ДОДАТОК А

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації – Публікації в виданнях, включених до переліку фахових видань України

1. Утевская, С. В., & Гейко, В. В. (2018) Половые особенности заболеваемости и течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита у крыс под влиянием пренатального стресса. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 23. 238–243. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v23.1021> URL: http://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/issue/view/Factory_V23_2018
2. Утевська, С. В. (2019) Перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) у пренатально-стресованих самців щурів, нащадків матерів з різною чутливістю до ЕАЕ. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 24, 244–248. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v24.1109> URL: http://www.utgis.org.ua/journals/index.php/Factory/issue/view/FEEO_V24_2019

– Публікації в наукових виданнях інших держав, що індексуються у міжнародних наукометричних базах:

3. Гейко, В. В., & Утевская, С. В. (2014) Беременность и индуцированный на разных сроках гестационного периода экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. Спецвыпуски*, 114 (10–2), 25–32. URL: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85100123286&origin=resultslist> (Scopus, Росія).

– Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

4. Гейко, В. В., Берченко, О. Г., & Утевська, С. В., (2019) Формування експериментального аутоімунного енцефаломієліту у потомства чутливих і

стійких до його індукції щурів як моделі «сімейних» форм розсіяного склерозу. *Журнал національної академії медичних наук України*, 25 (1), 21-24.
URL: <http://journal.amnu.gov.ua/images/pdf/2019-25-1/5.pdf>

– Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Утевська, С. В. (2016) Вплив пренатального стресу на перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель розсіяного склерозу) у щурів репродуктивного віку. *Матеріали VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції»* 237. <https://pat.nuph.edu.ua/pdf/tezi.pdf>

6. Утевська, С. В. (2017, березень) Особливості розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту (модель розсіяного склерозу) у пренатально стресованих щурів в залежності від віку. *Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології Шістнадцяті Данилевські читаннях»* с. 108–109. Харків, Україна.

7. Utevska, S. V., Geyko, V. V., & Berchenko, O. G. (2017, June) Effect of prenatal stress on the risk of the development and the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. In G. Bakalkin, O. Berezovska (Chairmen), *Cellular and molecular mechanisms of brain dysfunctions VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, Kyiv, Ukraine. Retrieved from http://usn.org.ua/data/uploads/USN_Congress_2017.pdf

8. Utevska, S., Geyko, V., & Berchenko, O. (2019, August) Prenatal stress-induced sex differences in the incidence and the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in adult rats, the offspring of mothers with different sensitivity to EAE. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 79, LXXIX. Retrieved from https://ptbun.org.pl/wp-content/uploads/2021/08/Acta-Neurobiol-Exp-2019_79_supplement.pdf