

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 статеві 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, чії 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 АНА1, що викликана індукцією ЕАЕ у тварин зрілого віку, залежала від комбінованого впливу статевієї приналежності щурів, умов пренатального розвитку і чутливості тварин до імунізації. У самців, що зазнали дії пренатального стресу, одночасне зниження рівнів кортикостерону й АНА1 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 АНА1 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.