

Т.Ю. Степанова, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: tanya.stepanova@onu.edu.ua

ВПЛИВ ТІЛОРОНУ НА ВМІСТ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ТА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ У МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТОМ

Встановлено, що за експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) у мишей змінюється вміст основних популяцій лімфоцитів та їх розподіл за субпопуляціями. Показано, що тілорон нормалізує вміст та співвідношення В- і Т-лімфоцитів, а також їх субпопуляцій на всіх досліджених строках після індукції захворювання. Встановлена здатність тілорону активувати Т-супресори, що частково пояснює терапевтичний ефект препарату за ЕАЕ.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, тілорон, Т- та В-лімфоцити.

Механізм порушень за розсіяного склерозу та його експериментальною моделлю — експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) — полягає у тому, що антиген у складі головного комплексу гістосумісності розпізнається CD8 клітинами, основною функцією яких є гальмування аутоімунного процесу на початку його проявлення. Внаслідок системної імунологічної дисфункції цей процес порушується, виникає трансформація CD8-індукторів у цитотоксичні CD8-ефектори. Вони, у свою чергу, стимулюють аутореактивні Th1-клітини з подальшим запуском аутоімунного процесу та продукцією прозапальних цитокінів: IFN- γ , TNF- α [1].

Каскад цих перетворювань призводить до порушення гематоенцефалічного бар'єра. Внаслідок цього аутореактивні Т-лімфоцити CD4 до антигена — загального білка мієліна — потрапляють у ЦНС. Вважається, що тригерним механізмом демієлінізації в ЦНС є саме аутореактивні CD4-лімфоцити. В тканині мозку вони реактивуються цитотоксичними Т-лімфоцитами, В-лімфоцитами, гліальними клітинами та макрофагами й запускають каскад імунних реакцій: продукцію аутоантитіл, протеїназ, хемокінів, вільних радикалів, NO.

Терапія за аутоімунної демієлінізації — складний процес, який спрямовано в першу чергу на зниження важкості та виразності загострень та сповільнення інвалідизації. До групи лікувальних засобів, що використовуються для патогенетичної терапії, відносяться імуномодулюючі препарати. Одним з таких препаратів є тілорон («Аміксин»).

Враховуючи важливу роль різних імуноцитів у розвитку ЕАЕ, метою даної роботи було встановлення співвідношення між популяціями і субпопуляціями лімфоцитів у мишей у динаміці захворювання та за впливу тілорону.



Матеріали і методи

В експерименті використовували білих нелінійних мишей-самців масою 18–20 г, які утримувалися в стандартних умовах віварію з постійним доступом до води. ЕАЕ відтворювалася введенням енцефалітогенної емульсії (ЕГЕ) у подушечки задніх лапок мишей підшкірно. ЕГЕ складалася з 50% гомогенату гомологічної тканини мозку у фізіологічному розчині й повного ад'юванта Фрейнда [2].

Тілорон вводили перорально у водному розчині в дозі 50 мг/кг маси тварини одноразово за 30 хвилин до індукції ЕАЕ.

Клітини для визначення основних популяцій і субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) виділялися з пахвових лімфовузлів стандартним методом. Отримані клітини забарвлювалися антиCD-антитілами з використанням наборів Anti-mouse Ready-Set-Go! Kit фірми «eBioscience», США, інкубувалися 30 хв, триразово відмивалися фосфатно-сольовим буфером згідно інструкції. Далі проби аналізувалися на протоковому цитофлуориметрі.

Обробку отриманих результатів здійснювали відповідно до алгоритмів, описаних в посібниках [3]. При порівняльному аналізі результатів використовували параметричний критерій Стьюдента, що розраховувався з використанням програми Exel-2000. Довірчий інтервал розраховувався при рівні значимості $p \leq 0,05$, що гарантує вірогідність результатів з імовірністю 0,95 [4].

Результати та їх обговорення

Оцінка впливу тілорону на чисельність популяцій та субпопуляцій лімфоцитів проводилася на 3, 7 та 14 добу після індукції ЕАЕ. Вибір строків базувався на даних [2] про динаміку розвитку експериментальної моделі розсіяного склерозу у мишей та на власних дослідженнях, що були підтверджені гістологічно, а також за спостереженням за змінами активності деяких імунних процесів.

В нормі (у інтактних тварин) вміст В-лімфоцитів (CD19) складає 17,6% від загального числа, Т-лімфоцитів (CD3) — 73,8%, натуральних кілерів (CD16) — 8,6%. Співвідношення Т/В лімфоцитів становить $4,19 \pm 0,39$. Розподіл Т-лімфоцитів за субпопуляціями CD4 і CD8 складає 48 і 25,8%, відповідно, а індекс CD4/CD8 — $1,86 \pm 0,17$ (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у інтактних мишей
($M \pm m$, $n=10$, %)

Table 1

Main lymphocyte populations and sub-populations in intact mice

В (CD19)	Т (CD3)	НК (CD16)	Т (CD4)	Т (CD 8)
$17,6 \pm 1,5$	$73,8 \pm 7,2$	$8,6 \pm 0,9$	$48,0 \pm 5,1$	$25,8 \pm 2,4$

Пероральне однократне введення тілорону здоровим мишам призвело до зміни нормальних показників вже через добу. Так, відносний вміст В-лімфоцитів збільшився на 8,1%, а Т-лімфоцитів — знизився на 5,9%. Співвідношення Т/В лімфоцитів при цьому склало 3,65. Більш значні зміни спостерігалися в розподілі Т-лімфоцитів по субпопуляціях. Вміст CD 4-клітин практично не змінився (96,5%), а CD 8-лімфоцитів — збільшився на 30%. При цьому індекс CD4/CD8 недостовірно знизився й склав $1,38 \pm 0,12$ (рис. 1).



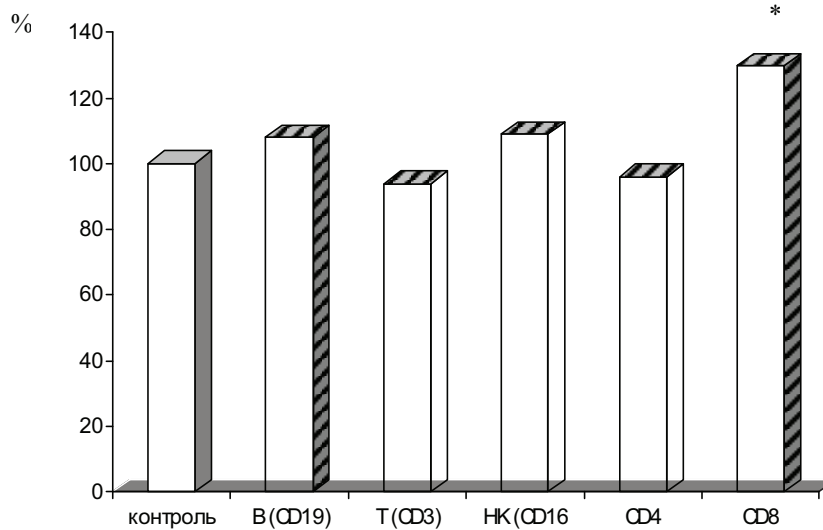


Рис. 1. Вплив тілорону на вміст основних популяцій і субпопуляцій лімфоцитів у здорових мишей (n=10)

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$).

Fig. 1. Tilorone effect on main lymphocyte populations and sub-populations in intact mice (n=10)

Note: * – statistically reliable compared to control

Підвищення рівня Т-лімфоцитів супресорів, що спостерігається, є характерною рисою дії тілорону й пов'язано, імовірно, зі здатністю препарату змінювати деякі властивості імунокомпетентних клітин [9].

На фоні експериментального алергійного енцефаломієліту рядом авторів було відмічено характерні зміни вмісту В- та Т-лімфоцитів [11, 12]. Вивчення динаміки змін при ЕАЕ в зазначені строки дозволило виявити деякі закономірності, що підтверджують існуючі вказівки на клітинну природу імунологічних порушень при досліджуваному захворюванні.

Так, при ЕАЕ спостерігається збільшення кількості В-лімфоцитів у динаміці розвитку захворювання. На 3-ю добу кількість CD19-клітин збільшується на 30% і зберігається на цьому рівні і на 7-у добу. До 14 дня після індукції ЕАЕ показник трохи знижується (рис. 2).

Тілорон у дозі 50 мг/кг, введений мишам з ЕАЕ в день індукції захворювання, незначно знижує вміст В-лімфоцитів у лімфовузлах (у середньому на 10%) на усіх строках захворювання. При цьому незначно знижена кількість Т-лімфоцитів не змінюється під дією препарату.

Такі зміни знаходять своє відображення в індексі співвідношення Т- і В-лімфоцитів (табл. 2).

У тварин з ЕАЕ Т/В індекс знижений в усі терміни захворювання. Тілорон підвищує цей показник, а до 14-ої доби доводить його до контрольного рівня. Вивчення розподілу Т-лімфоцитів по субпопуляціях показало, що при ЕАЕ спостерігається підвищення рівня CD4-лімфоцитів, яким за даними літератури належить критична роль у патогенезі РС і ЕАЕ [2].

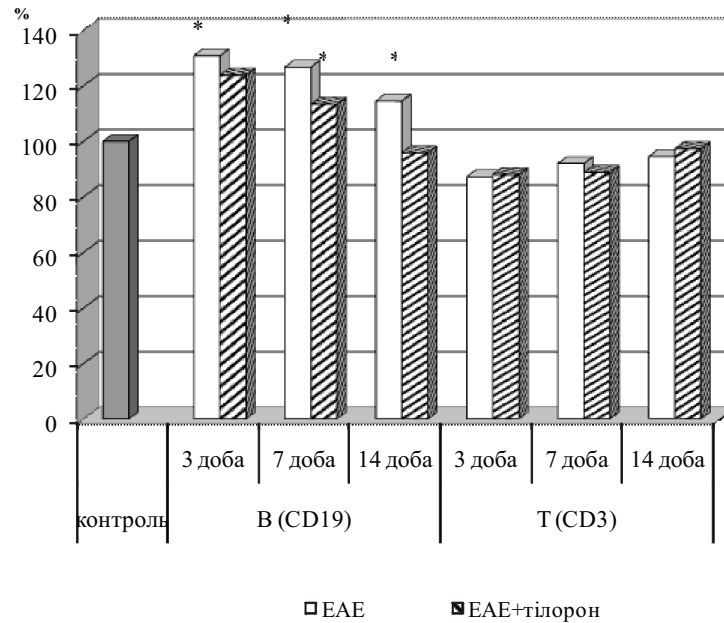


Рис. 2. Вплив тілорону (50 мг/кг) на вміст Т- і В-лімфоцитів у лімфовузлах мишей з ЕАЕ (n=20)

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Fig. 2. Tilorone effect (50 mg/kg) on T- and B- lymphocytes in EAE mice lymphnodes (n=20)

Note: * - statistically reliable compared to control

До 7-ої доби цей показник підвищується в середньому на 40%, а до 14-ої трохи знижується, усе ще перевищуючи контрольні значення. Рівень CD8-клітин при експериментальній патології на 3-ю добу знижений на 23%, що може слугувати свідченням підгострої стадії захворювання.

Таблиця 2

Зміна співвідношення Т- і В-лімфоцитів у лімфовузлах мишей з ЕАЕ під дією тілорону (50 мг/кг), ($M \pm m$, n=20)

Table 2

Effect of tilorone (50 mg/kg) on T/B index in EAE mice lymphnodes, ($M \pm m$, n=20)

Варіант	3 доба	7 доба	14 доба
ЕАЕ	2,92±0,14*	3,17±0,19*	3,61±0,41
ЕАЕ+тілорон	3,11±0,51	3,43±0,31	4,44±0,57
контроль	4,37±0,39		

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Note: * – statistically reliable compared to control

У динаміці розвитку ЕАЕ кількість CD8-лімфоцитів поступово зростає й перевищує контрольні показники (рис. 3).

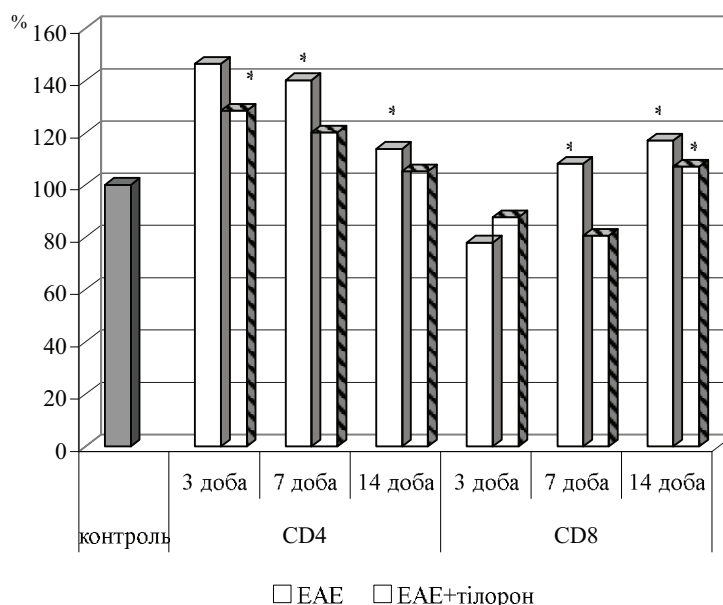


Рис. 3. Вплив тілорону (50 мг/кг) на вміст CD4 і CD8 лімфоцитів у лімфовузлах мишей з ЕАЕ (n=20)

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Fig. 3. Tilorone effect (50 mg/kg) on CD4 and CD8 lymphocytes in eymphnodes of EAE mice (n=20)

Note: * – statistically reliable compared to control.

Введення мишам тілорону в дозі 50 мг/кг викликає достовірне зниження рівня CD4-лімфоцитів (у середньому на 20%). Тілорон знижує підвищений вміст CD4-лімфоцитів на 7-у і 14-у добу, наближаючи його до нормального значення. При цьому спостерігається зворотна залежність у зміні кількості CD4 і CD8 клітин при ЕАЕ, тобто збільшення числа CD4 призводить до пропорційного зниження рівня CD8.

Це впливає на імунорегуляторний індекс, що на третю добу захворювання перевищує контрольне значення у 2 рази, а на сьому – в 1,5 рази (табл. 3).

Таблиця 3
Зміна співвідношення CD4 і CD8 лімфоцитів лімфовузлів мишей з ЕАЕ під дією тілорону в дозі 50 мг/кг (M±m, n=20)

Table 3
Tilorone (50 mg/kg) effect on CD4/CD8 index of eymphnodes lymphocytes in mice with EAE (M±m, n=20)

Варіант	3 доба	7 доба	14 доба
ЕАЕ	3,50±0,23*	2,41±0,22*	1,81±0,19
ЕАЕ+тілорон	2,73±0,27	2,77±0,31	1,83±0,21
контроль	1,86±0,17		

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Note: * – statistically reliable compared to control.



Тілорон знижує ці значення на даних строках захворювання. На 14-у добу спостерігається нормалізація співвідношення CD4/CD8, що корелює з описаною картиною ремісії.

Зазначене в роботі підвищення вмісту В-лімфоцитів може бути пов'язане з роллю цих клітин у розвитку аутоімунної патології. Так, В-клітини сприяють так званому «поширенню репертуару епітопів». Слід зазначити, що В-лімфоцити регулюють лімфоїдний ограногенез, диференціацію Т-ефекторних клітин, антигенпрезентувальну функцію дендритних клітин та цитокиновий профіль у тканинах [11]. Порушення цих функцій може призвести до індукції або розвитку аутоімунного процесу. Таким чином, зазначене збільшення вмісту В-лімфоцитів може бути свідченням порушення регуляції Т-клітинної ланки імунітету. Це є ще одним фактом, який пояснює зростання рівня В-лімфоцитів у перші дні після індукції ЕАЕ. Адже, як відомо, ключова роль у патогенезі РС і ЕАЕ належить Т-лімфоцитам [12]. Дію тілорону на розподіл субпопуляцій Т-лімфоцитів можна класифікувати як протизапальну, що опосередкована зміною рівня про- і протизапальних цитокинів. Зазначена для тілорону здатність активувати Т-супресори, підтверджена дослідженнями ряду авторів [5, 7, 8], повною мірою реалізує очікуваний терапевтичний ефект препарату при патології, пов'язаній з розвитком алергічного аутоімунного ушкодження нервової тканини по типу гіперчутливості уповільненого типу [6, 10].

ЛІТЕРАТУРА

1. Виничук С.М. Рассеянный склероз: спорные и нерешенные вопросы этиологии и патогенеза // Здоров'я України. — 2003. — № 4 (65). — С. 3.
2. Заргарова Т.А., Фаворова О.О. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит — модель рассеянного склероза // Иммунология. — 1999. — № 2. — С. 5–9.
3. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 408 с.
4. Методы обработки медицинской информации: учеб. пособие / О.П. Минцев, Б.Н. Угаров, В.В. Власов — К.: Вища школа, 1991. — 271 с.
5. Отчет об изучении действия препарата Амиксин на лимфоциты человека. Институт биоорганической химии РАН, Институт биологии гена РАН. Москва — 2001. — 45 с.
6. Павлова Н.А. Рассеянный склероз, диагностика и лечение с позиций доказательной медицины // Иммунология. — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 65–73.
7. Результаты клинического изучения амиксина / Шмельков Ю.А., Григорян С.С., Чижов Н.П. и др. // II Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство» (Москва, 10–15 апр. 1995 г.). — М., 1995. — С. 193–194.
8. Селькова Е.П., Семенов Т.А., Носик Н.Н. Влияния амиксина — отечественного аналога тилорона — на показатели интерферонового и иммунного статуса человека // Журнал медицинской микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2001. — Т. 1, № 2. — С. 31–36.
9. Филиппова Т.О., Головенко Н.Я. Тилорон: профиль биологической активности. I. Фармакологические свойства // Интегративна антропология. — 2006. — № 1. — С. 18–23.
10. Carton H., Laos R., Pacolet J. Utilisation and cost of professional care and assistance according to disability of patients with multiple sclerosis in Flanders (Belgium) // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 1998. — V. 64, № 4. — P. 444–500.
11. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response / Matsushita T., Fujimoto M., Hasegawa M. et al // Am. J. Path. — 2006. — V. 168, № 3. — P. 812–821.
12. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis / Tischner D., Weishaupt A., van den Brandt J. et al. // Brain. — 2006. — V. 129, № 10. — P. 2635–2647.



Т.Ю. Степанова, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: tanya.stepanova@onu.edu.ua

**ВЛИЯНИЕ ТИЛОРОНА НА СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ
ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У МЫШЕЙ
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ
ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ**

Реферат

Установлено, что экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) у мышей сопровождается изменением содержания основных популяций лимфоцитов и их распределения по субпопуляциям. Показано, что тилорон нормализует содержание и соотношение В- и Т-лимфоцитов, а также их субпопуляций на все сроки после индукции заболевания. Установленная способность тилорона активировать Т-супрессоры частично объясняет терапевтический эффект препарата при ЭАЭ.

К л ю ч е в ы е с л о в а : экспериментальный аллергический энцефаломиелит, тилорон, Т- и В-лимфоциты.

T.Yu. Stepanova, T.O. Filipova, B.M. Galkin

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: tanya.stepanova@onu.edu.ua

**EFFECT OF TILORONE ON MAIN LYMPHOCYTE POPULATIONS
AND SUB-POPULATIONS IN MICE WITH EXPERIMENTAL
ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS**

Summary

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice is characterized with changes in main lymphocyte populations and sub-populations. It was shown that tilorone normalizes the level of T- and B-lymphocytes, T/B ratio, and distribution into sub-populations at all studied terms of the disease. The activation of T-suppressors with tilorone fully implements an expected therapeutic effect of this medicine at EAE.

Key words : experimental allergic encephalomyelitis, tilorone, T- and B-lymphocytes.

