

УДК 599.323.4.089.843.47+616.516.5-031.81].084.1

© **І. В. Кокіна, М. І. Тарапата, Д. Ю. Кустов**

ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ З МОДЕЛЛЮ АТОПІЧНОГО ДЕРМАТИТУ ДО ТА ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

*Донецький національний медичний університет ім. М. Горького
83003, м. Донецьк, пр. Ілліча, 16; e-mail: physiolog@mail.ru*

Кокіна І. В., Тарапата М. І., Кустов Д. Ю. Поведінкові реакції щурів з моделлю atopічного дерматиту до та після трансплантації ембріональних стовбурових клітин. – Статтю присвячено дослідженню змін грумінгу та загальної рухової активності у щурів з експериментальним захворюванням, подібним до atopічного дерматиту людини. На підставі одержаних результатів зроблено висновок про суттєвий вплив моделі atopічного дерматиту на поведінку і можливість корекції виявлених порушень за допомогою трансплантації ембріональних стовбурових клітин, що демонструє доцільність використання цих поведінкових тестів в оцінюванні загальної тяжкості експериментального дерматиту та перспективність подальшого вивчення механізмів дії такого трансплантату з метою оптимізації методик його застосування.

Ключові слова: грумінг, рухова активність, atopічний дерматит, стовбурові клітини.

Вступ

Розвиток хімічного виробництва в Україні за недостатньої ефективності заходів екологічної безпеки призводить до погіршення стану здоров'я не тільки серед робітників хімічних підприємств, але й серед населення промислових зон та екокризових регіонів, зокрема Донбасу. При цьому чільне місце в структурі захворюваності посідають різноманітні алергодерматози, насамперед atopічний дерматит (АД), а також токсикодермії, екземи та алергічні дерматити, спричинені дією техногенних поллютантів, які нерідко є рефрактерними до традиційної комплексної терапії та чинять істотний вплив на стан центральної нервової системи. Тому розробка ефективних методів лікування такої патології залишається актуальною задачею сучасної медичної науки.

Одним з провідних синдромів у патогенезі atopічного дерматиту є синдром нейрогуморальної дизрегуляції [1], що містить у собі й порушення функцій ендокринних структур, які спостерігаються в маніфестній або латентній формі в значної частини хворих. Існуючі дані про напрям і ступінь нейрогуморальної дисфункції у хворих на atopічний дерматит різних форм і стадій, так само, як і про патогенетично обґрунтовані методи її корекції, є дещо фрагментарними і мають суперечливий характер [2-4].

Слід зауважити, що існує atopічний дерматит собак, кішок, мавп, рогатої худоби, гризунів [5], за багатьма ознаками подібний до atopічного дерматиту людини, і подеколи спонтанний atopічний дерматит у тварин розглядається як модель АД людини [6]. Незважаючи на існування безлічі варіантів моделювання atopічного дерматиту та інших алергічних дерматозів на тваринах [7], триває пошук нових способів, відмінних від вже існуючих ще більшою подібністю до алергодерматозів людини за достатньої відтворності й доступності. Складність і велика вартість застосування високих технологій (таких, як створення ліній трансгенних, нокаутних мишей або щурів зі схильністю до спонтанного або індукованого розвитку захворювання, подібного до atopічного дерматиту людини) для ефективного моделювання atopічного дерматиту на тваринах гальмує експериментальне відпрацювання нових методів лікування цієї патології. При цьому експериментальні хронічні алергічні дерматити щурів та мишей, створені із застосуванням типових техногенних поллютантів – галогенізованих похідних бензолу, вважаються багатьма авторами релевантними моделями АД для патофізіологічних та фармакологічних досліджень [7, 8].

У сучасній літературі відсутні дані щодо вивчення змін поведінки на прикладі грумінгових тестів як індикатора загального комфорту й вираженості свербіння в дослідних тварин з моделлю АД до та після застосування ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) для корекції цього стану. Тому створення адекватної експериментальної моделі АД, зіставлення стану окремих ланок системи нейрогуморальної регуляції (поведінкові реакції, імунологічний та ендокринний статус) з морфологічними змінами шкіри до та після трансплантації ЕСК дозволить поглибити уявлення про патогенетичну роль синдрому

нейрогуморальної дизрегуляції при АД, можливі механізми дії ЕСК, а також розробити нові ефективні підходи до тактики і стратегії профілактики та лікування цієї групи захворювань, насамперед АД й хронічного алергічного дерматиту, спричиненого дією шкідливих чинників промислового походження.

У нашому дослідженні вивчались зміни грумінгу й загальної рухової активності щурів з моделлю АД до та після корекції експериментального захворювання трансплантацією ЕСК.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження проводились у лабораторії клінічної і прикладної нейрофізіології ДонНМУ на 90 самцях безпорідних білих щурів масою від 180 до 300 грамів, випадковим чином розподілених на 3 групи по 30 особин у кожній: інтактну та 2 експериментальні групи з АД, змодельованим за методикою Н. Yamashita et al. [9] у власній модифікації, що передбачає повторне нанесення на шкіру розчину 2,4,6-тринітрохлорбензолу (ТНХБ або пікрилхлориду) – речовини, яка широко використовується в хімічній промисловості при виробництві барвників та вибухівки тощо. Окрім того, тваринам другої експериментальної групи здійснювали корекцію АД на 30 добу розвитку захворювання шляхом одноразової внутрішньовенної трансплантації ЕСК, вилучених з кордової крові.

Спостереження за грумінгом – реакціями самоочищення поверхні тіла – проводили на 40-45 день від початку експеримента в різний час протягом цілої доби. Для реєстрації показників грумінгу щурів поміщали до біоритмокамери. Перші 15 хвилин відводились для адаптації до умов камери, після чого протягом подальших 15 хвилин проводилось візуальне спостереження з підрахунком 4-х різних видів спонтанних рухів очищення шкіри (умивання, лизання, чухання і обтрушування) [10]. Один рух самоочищення приймався за один елементарний грумінговий акт (е.г.а.). Крім того, в якості додаткових показників визначали загальну кількість рухів самоочищення і загальний час, що тварина витрачає на грумінг за період спостереження, обчислювали інтенсивність грумінгу та відсоток часу грумінгу [11].

Фіксувалась також загальна рухова активність (ЗРА), тобто час переміщення по клітці, виражений в процентному відношенні до загального часу спостереження.

Аналіз результатів досліджень проводили у середовищі пакетів статистичного аналізу MedStat і Statistica.

Для обробки даних застосовувались методи описової статистики, обчислювались значення середнього арифметичного (x_{cp}) і довірчого інтервалу (ДІ) за $\alpha=0,05$. Коли розподіл ознак не відрізнявся від нормального, для порівняння середніх використовувався критерій Даннета, якщо ж розподіл відрізнявся від нормального, – критерій Краскела-Уолліса.

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження продемонстрували суттєвий вплив як АД, так і його трансплантаційної корекції на показники грумінгу та ЗРА у щурів (табл. 1).

Таблиця 1

Основні грумінгові показники у щурів різних експериментальних груп

Групи	Показники грумінгу				
	умивання, е.г.а.	лизання, е.г.а.	чухання, е.г.а.	обтрушування, е.г.а.	час, с
Інтактні	11,80±1,28*	7,50±0,93	6,13±0,88*	3,30±0,64	147,83±1,56*
АД-модель	8,20±0,60	6,60±0,52	15,70±1,15	3,20±0,61	197,97±1,58
АД+СК	11,47±0,89*	6,87±0,61	5,50±0,75*	3,27±0,55	142,33±7,26*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ при порівнянні з тваринами зі змодельованим atopічним дерматитом.

Як видно з табл. 1, у тварин з експериментальним дерматитом спостерігається зниження вмивальної активності на тлі значного підвищення кількості е.г.а. чухання та часу грумінгу порівняно з інтактними особинами. Після трансплантації ЕСК ці зміни поведінкових показників зазнавали зворотного розвитку і практично сягали нормального рівня. Загальна кількість грумінгових актів за період спостереження при АД збільшувалась до $(33,70 \pm 1,11)$ е.г.а., тоді як трансплантаційна корекція зменшувала її до $(27,10 \pm 1,59)$ е.г.а., наближаючи до встановленої норми $((28,73 \pm 2,07)$ е.г.а.).

На рис. 1 наведено зміни інтегративних показників грумінгу (інтенсивності та відсотку часу грумінгу), а також ЗРА у щурів. Інтенсивність грумінгу, яка складала $(20,07 \pm 1,49)\%$ в інтактних тварин, при розвитку АД знижувалась до $(17,56 \pm 0,91)\%$, а після трансплантації ЕСК відновлювалась до $(19,38 \pm 0,81)\%$. Відсоток часу грумінгу в інтактних особин становив $(16,43 \pm 0,68)\%$; у щурів зі змодельованим АД він збільшувався до $(22,00 \pm 0,69)\%$, а при трансплантаційній корекції зменшувався до $(15,81 \pm 0,81)\%$. ЗРА при експериментальному дерматиті значно підвищувалась у порівнянні з нормою $((3,89 \pm 0,35)\%)$ і дорівнювала $(9,77 \pm 0,91)\%$; трансплантація ЕСК дещо знижувала цей показник – до $(7,41 \pm 0,64)\%$, що все ж таки було вірогідно вище рівня інтактних тварин.

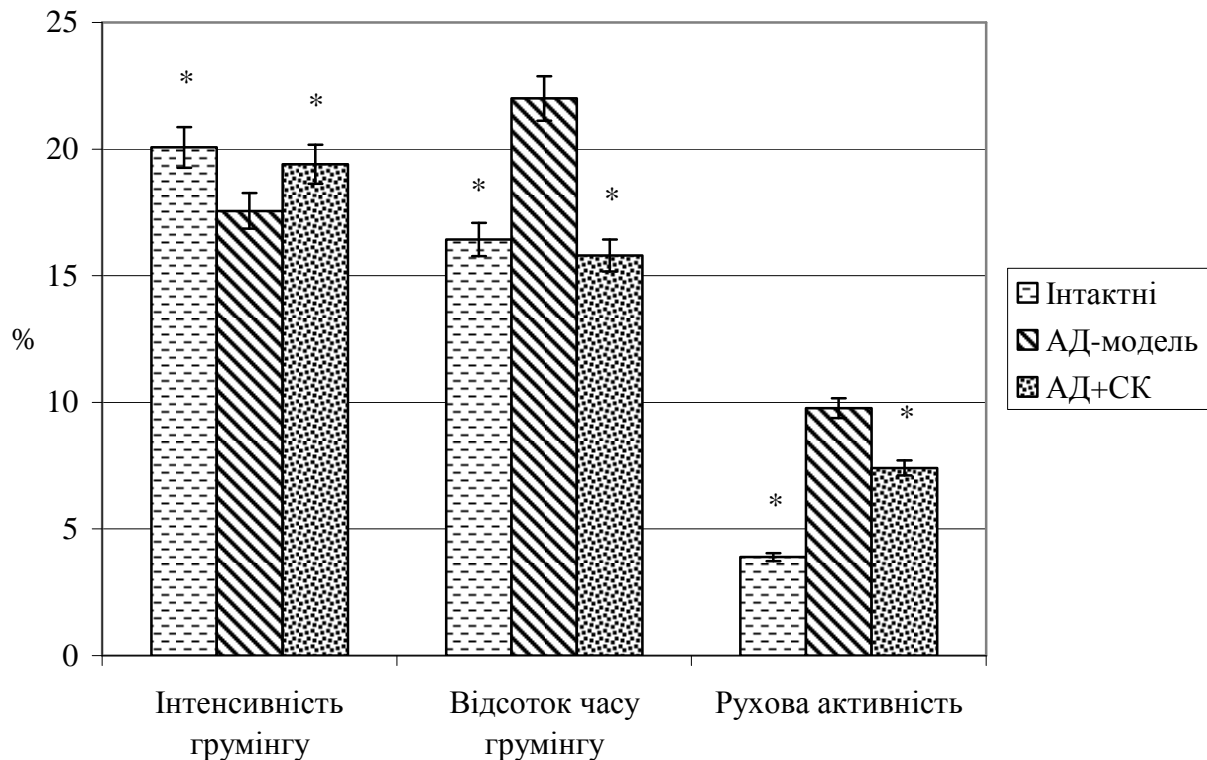


Рис. 1. Зміна інтегративних показників грумінгу (інтенсивності та відсотка часу грумінгу), а також показника загальної рухової активності в інтактних щурів та тварин з моделлю atopічного дерматиту.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ при порівнянні з інтактними щурами.

Із вищенаведених спостережень можна дійти висновку про наявність впливу на поведінку щурів як моделювання АД, так і його трансплантаційної корекції за допомогою ЕСК. Так, притаманні експериментальному дерматиту зміни у вигляді підвищеної загальної грумінгової активності зі значним переважанням чухальних реакцій, а також посилення ЗРА коригувались, зі значним наближенням до фізіологічної норми, трансплантацією ЕСК.

Виявлена нами здатність ЕСК наближати показники грумінгу та ЗРА у тварин з моделлю АД до фізіологічної норми, що відображає повернення до стану комфорту, може мати декілька механізмів. Нещодавно було повідомлено про можливу роль мікроглії

кістковомозкового походження не тільки в здійсненні імунологічного нагляду у ЦНС, але й в модуляції нейрональної активності. Так, показано, що в нормі мігруючі мікрогліюцити, які експресують типовий «кістковомозковий» ген *Nohb8*, у головному мозку затримуються в безпосередній близькості лише до активних синапсів, тоді як неактивні синапси не викликають такої «зацікавленості». За умов як генетично зумовленої, так і набутої дисфункції саме імунної системи, мікроглія може не впоратись із цією функцією, і нейрональна активність набуває патологічних рис. Подібний механізм розвитку психічних відхилень різного рівня зараз отримує все більше підтверджень у наукових дослідженнях: простежується зв'язок депресії, аутизму, хвороби Альцгеймера, obsесивно-компульсивних розладів, шизофренії з імунодефіцитами й генами, залученими до функції імунної системи. З еволюційної точки зору, логічним з'являється припущення про прямий зв'язок такого різновиду поведінки, як грумінг, метою якого є зменшення кількості можливих патогенів на поверхні тіла, з реакціями природженого та набутого імунітету, спрямованими на елімінацію патогенів [12].

Постійно накопичуються дані про виникнення аберантних форм поведінки, в тому числі – патологічного грумінгу, у тварин з певними генетичними особливостями, наприклад, у мишей з мутацією гена *Nohb8*, схильних до надзвичайно високої чухальної активності, яка призводить до утворення вогнищ облісіння внаслідок розчухування шкіри, що дуже нагадує патерни поведінки людей з розладами obsесивно-компульсивного спектру, характерними для АД на стадії нейродерміту. Означені зміни поведінки у *Nohb8*-мутантних або нокаутних мишей повністю зникають після трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) від мишей дикого типу, що дає підстави для висновку про ключову роль певних генів, що зазвичай експресуються у ГСК, також у регуляції імунних реакцій та нейрональної активності [13].

Виявлені в експериментах на тваринах тенденції знаходять підтвердження в медичній практиці: у 2005 році Н. Koharazawa зі співавт. [14] повідомили про неочікуваний ефект трансплантації алогенних гемопоетичних СК чоловікові, хворому на лейкоз: усі клінічні прояви і типові лабораторні ознаки тяжкого резистентного АД після трансплантації спонтанно зникли і протягом тривалого часу спостереження не поновлювались.

Таким чином, подальші розробки в галузі трансплантації ЕСК для корекції АД, особливо в поєднанні з іншими фізіологічно обґрунтованими засобами, слід визнати перспективними. Також доцільними виявляються й поглиблені дослідження, спрямовані на роз'яснення всієї сукупності можливих механізмів впливу трансплантованих ЕСК як на організм реципієнта в цілому, так і на окремі фізіологічні системи.

Висновки

1. У щурів з моделлю atopічного дерматиту спостерігаються виражені зміни грумінгової та загальної рухової активності, які відповідають порушенню стану комфорту та відновлюються після трансплантації ембріональних стовбурових клітин.

2. Поведінкові тести з урахуванням змін структури патернів грумінгу є релевантним комплексним критерієм оцінки перебігу змодельованого atopічного дерматиту та ефективності його корекції.

3. Трансплантація ембріональних стовбурових клітин є перспективним напрямом корекції atopічного дерматиту, тому потребує подальшого вивчення і розробки протоколів її застосування.

Список літератури

1. Зяблицев С. В.. Синдромы atopической болезни / С. В. Зяблицев, Е. А. Бочарова. – Донецьк: Новый мир, 2008. – 260 с.
2. Fitzpatrick L. A. The hypocalcemic states. Disorders of Bone and Mineral Metabolism / L. A. Fitzpatrick. – Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2002. – 722 p.

3. Guidelines of care for atopic dermatitis / [J. M. Hanifin, K. D. Cooper, V. C. Ho, S. Kang, B. R. Krafchik, D. J. Margolis, L. A. Schachner, R. Sidbury, S. E. Whitmore, C. K. Sieck, A. S. Van Voorhees] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2004. – Vol. 50 (3). – P. 391–404.
4. Болотная Л. А. Современные патогенетические аспекты атопического дерматита / Л. А. Болотная, Ю. В. Королько // *Дерматология. Косметология. Сексопатология.* – 2004. – № 3–4 (7). – С. 187–191.
5. Медведєв К. С. Атопический дерматит у собак: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.05 / К. С. Медведєв. – Біла Церква, 2000. – 18 с.
6. Hillier A. Spontaneous canine model of atopic dermatitis / A. Hillier, T. Olivry // In: Chan L. S., ed. *Animal models of human inflammatory skin diseases.* – Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. – P. 353–369.
7. Repeated Topical Challenge with Chemical Antigen Elicits Sustained Dermatitis in NC/Nga Mice in Specific-Pathogen-Free Condition / [Y. Tomimori, Y. Tanaka, M. Goto, Y. Fukuda] // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2005. – Vol. 124. – P. 119–124.
8. Characterization of a 2,4-Dinitrochlorobenzene-Induced Chronic Dermatitis Model in Rats / [Y. Fujii, H. Takeuchi, S. Sakuma, T. Sengoku, S. Takakura] // *Skin Pharmacol. Physiol.* – 2009. – № 22. – P. 240–247.
9. Pharmacological characterization of a chronic pruritus model induced by multiple application of 2,4,6-trinitrochlorobenzene in NC mice / [H. Yamashita, T. Makino, H. Mizukami, M. Nose] // *European Journal of Pharmacology.* – 2007. – Vol. 563, Iss. 1–3. – P. 233–239.
10. Свицерская Г. Е. Развитие груминга в онтогенезе крыс и мышей / Г. Е. Свицерская, Л. Е. Дмитриева // *Журн. эвол. биохимии и физиологии.* – 1993. – Т. 29, №4. – С. 36–39.
11. Патент № 16150, UA. МКВ: А61В5/00. Спосіб оцінки стану організму тварини. Кустов Д. Ю., Ракша-Слюсарєва О. А., Слюсарєв О. А., Друпп Ю. Г. Заява № u200602422 від 06.03.2006. Друк. 17.07.2006. Бюл. № 7.
12. Hematopoietic Origin of Pathological Grooming in Hoxb8 Mutant Mice / [Shau-Kwaun Chen, P. Tvrdik, E. Peden, S. Cho, Sen Wu, G. Spangrude, M. R. Capecchi] // *Cell.* – 2010. – Vol. 141, Iss. 5. – P. 775–785.
13. Hyman Steven E. A Bone to Pick with Compulsive Behavior / Steven E. Hyman // *Cell.* – 2010. – Vol. 141, Iss. 5. – P. 752–754.
14. Resolution of atopic dermatitis following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia / [H. Koharazawa, H. Kanamori, M. Takabayashi, S. Yamaji, J. Taguchi, K. Fujimaki, Y. Ishigatsumo] // *Bone Marrow Transplantation.* – 2005. – № 35. – P. 1223–1224.

Кокина И. В., Тарапата Н. И., Кустов Д. Ю. Поведенческие реакции крыс с моделью атопического дерматита до и после трансплантации эмбриональных стволовых клеток. – Статья посвящена изучению изменений груминга и общей двигательной активности у крыс с экспериментальным заболеванием, подобным атопическому дерматиту человека. На основании полученных результатов сделан вывод о существенном влиянии модели атопического дерматита на поведение и возможности коррекции выявленных нарушений с помощью трансплантации эмбриональных стволовых клеток, что демонстрирует целесообразность применения этих поведенческих тестов в оценке общей тяжести экспериментального дерматита и перспективность дальнейшего изучения механизмов действия такого трансплантата с целью оптимизации методик его использования.

Ключевые слова: груминг, двигательная активность, атопический дерматит, стволовые клетки.

Kokina I. V., Tarapata M. I., Kustov D. Yu. Behavioral reactions in rats with atopic dermatitis model prior to and after embryonic stem cell transplantation. – The article describes grooming and general motor activity changes in rats with an experimental disease similar to human atopic dermatitis. The results obtained let us draw the conclusion of significant influence of atopic dermatitis model on behavior and the possibility of its correction by embryonic stem cell transplantation. Thus, the relevance of these behavioral tests for experimental dermatitis general severity estimation is demonstrated as well as the expedience of further investigation of the transplant action mechanisms in order to optimize its using techniques.

Key words: grooming, motor activity, atopic dermatitis, stem cells.