УДК 57.086.833:611.018.834:57.085.23
doi:10.22494/cot.v6i1.84

Відтворення токсичної купризонової моделі демієлінізації в системі *in vitro*

Родніченко А. Є.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна
e-mail: arodnichenko@ukr.net

РЕЗЮМЕ

Актуальність використання адекватних експериментальних моделей для дослідження механізмів розвитку розсіяного склерозу та впливу медикаментозних препаратів на ремієлінізацію нервових волокон обумовлена розповсюдженістю цього захворювання, яке уражує переважно людей молодого віку.

***МЕТОЮ РОБОТИ** було відпрацювати токсичну купризонову модель в системі in vitro з підтвердженням процесів демієлінізації нервових волокон.*

***МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Для дослідження особливостей процесів мієлінізації та демієлінізації аксонів нейронів використовували культуру дисоційованих клітин мозочка новонароджених мишей лінії FVB/N віком 7 діб. Для виявлення мієлінових оболонок використовували гістохімічний метод їх фарбування за допомогою судана чорного В. Для ідентифікації олігодендроцитів проводили імуноцитохімічне фарбування культури на маркер Olig2.*

***РЕЗУЛЬТАТИ.** При відпрацюванні токсичної моделі визначена щільність посіву клітинної суспензії мозочка, підібрані умови культивування дисоційованих клітин мозочка, досягнуто виживання дисоційованої культури клітин мозочка до 26-28 доби культивування. За допомогою гістохімічного методу фарбування підтверджено присутність процесів мієлінізації та демієлінізації в умовах in vitro. За допомогою імуноцитохімічного фарбування показано, що нейротоксин купризон призводить до зниження кількості Olig2-позитивних олігодендроцитів за умов його внесення в культуру дисоційованих клітин мозочка на 18-ту добу культивування.*

***ВИСНОВКИ.** Підібрані умови культивування дисоційованих клітин мозочка мишей, підтверджено присутність процесів мієлінізації та демієлінізації в умовах in vitro, показано зниження кількості Olig2-позитивних клітин при внесені в культуру демієлінізуючого фактора на 18-ту добу культивування.*

***КЛЮЧОВІ СЛОВА:** купризон; мозочок; олігодендроцити; демієлінізація*

Демієлінізуючі захворювання – це найбільш поширені захворювання центральної та периферичної нервової системи, у яких основним патоморфологічним проявом є руйнування мієлінової оболонки нервових волокон і, як результат, порушення проведення нервових імпульсів та рухової активності [1-3].

До числа найбільш розповсюджених демієлінізуючих захворювань центральної нервової системи (ЦНС), які уражають переважно людей молодого віку, відноситься розсіяний склероз [4]. Відповідно сучасним уявленням, розсіяний склероз – мультифакторне захворювання, однією із внутрішніх причин якого є наявність певної спадкової (імуногенетичної) схильності, автоімунних і гормональних (особливо стероїдних) порушень [2]. Для дослідження механізмів, які лежать в основі розвитку розсіяного склерозу, та можливості отримання інформації про негативний вплив токсичних агентів або для скринінгу тих чи інших лікарських сполук та розробки ефективних терапевтичних стратегій застосовуються відносно прості моделі як в системі *in vivo*, так і *in vitro*.

Існують запальні, токсичні, вірусні та інші експериментальні моделі розсіяного склерозу. Серед запальних моделей як стандарт для розробки терапевтичних стратегій та тестування лікарських засобів при автоімунних захворюваннях найчастіше використовують модель експериментального алергічного енцефаломієліту. Вірусна модель – мишачий енцефаломієліт Теєлера (TME, Theiler's murine encephalomyelitis), передбачає ін'єкції одноланцюгового РНК-віруса в ЦНС, внаслідок чого індукується імуноопосередкована загибель олігодендроцитів [5]. Серед токсичних моделей відома модель поєднаної ін'єкції токсинів в спинний мозок або білу речовину мозку. За допомогою цієї моделі відтворюють демієлінізацію в заздалегідь визначених ділянках ЦНС шляхом індукування загибелі олігодендроцитів (з використанням бромистого етидію) та солюбілізації мембрани мієліну (з використанням лізолетицину) у місці ін'єкції [5].

Особливу увагу серед токсичних моделей привертає купризонова модель демієлінізації. Купризон [біс(циклогексанон)-оксалілдигідразон] – мідний хелатор. При його пероральному

застосуванні спостерігається апоптоз зрілих олігодендроцитів і, як результат, демієлінізація аксонів нейронів, ушкодження мітохондрій олігодендроцитів (шляхом інгібування цитохромоксидази, моноамінооксидази), активація мікроглії головного мозку (за рахунок посилення продукції туморнекротичного фактора-альфа та інтерферону-гамма). При використанні купризону є можливість моделювання гострої та хронічної форм демієлінізації, а також вивчення факторів, які впливають на де- та ремієлінізацію [6-10].

Слід зазначити, що на даний час культивування клітин і тканин є одним із прогресивних дослідницьких методів, які застосовуються в біохімії, клітинній та молекулярній біології. Основними перевагами культури нервової тканини і моделювання її ушкодження *in vitro* є вивчення закономірностей нейрогістогенезу, взаємодії нервових та гліальних клітин, безпосереднє дослідження компонентів культури з використанням мікроскопічних та електрофізіологічних методів дослідження [2]. Немає сумніву у тому, що в системі *in vitro* неможливо відтворити всі процеси, які спостерігаються на моделях *in vivo*. Проте моделі *in vitro* є корисними моделями, які дозволяють оцінювати функції клітин та процеси, які відбуваються на різних етапах їх розвитку, зокрема безпосередній вплив як демієлінізуючих, так і ремієлінізуючих факторів. Крім того, на моделях *in vitro* можливо вивчити механізми, пов'язані зі змінами в мієлінізації та деякими аспектами взаємодії клітин та ефекту цієї взаємодії на розвиток олігодендроцитів і, відповідно, мієлінізацію. Ці моделі також мають вирішальну перевагу, насамперед, з огляду зменшення кількості тварин, що використовуються в експериментах *in vivo*.

На моделях *in vivo* (миші різних ліній, щури породи Вістар) було показано, що після прийому нейротоксину купризону упродовж 4 тижнів відбувається демієлінізація багатьох ділянок мозку: мозолистого тіла, мозочка, гіпокампу, кори, а також білої речовини спинного мозку [8, 11-15]. Слід зазначити, що мозочок має найбільшу кількість волокнистих структур в мозку ссавців, що робить його вигідним та практичним об'єктом для оцінки мієлінізації [16].

Тому **метою цієї роботи** було підтвердити наявність процесів мієлінізації нервових волокон та вивчити пряму дію демієлінизуючого фактора купризону на моделі культури клітин мозочка мишей в системі *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі роботи з експериментальними тваринами виконували з дотриманням законодавства і принципів біоетики: Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.), «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Європейська конвенція, Страсбург, 1986 р.). Для дослідження особливостей процесів мієлінізації та демієлінізації аксонів нейронів використовували культуру дисоційованих клітин мозочка новонароджених мишей лінії FVB/N віком 7 діб (n = 27). Евтаназію новонароджених мишей здійснювали шляхом передозування ефіру медичного для наркозу.

Виділення мозочка проводили в стерильних умовах при +4 °С. Мозочок занурювали до середовища, яке містило 90 % мінімального ростового середовища DMEM, 10 % інактивованої при 56 °С протягом 30 хв сироватки коней, глюкози (6 г/л), 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (все – *Sigma*, США). Дисоційовані клітини отримували шляхом подрібнення ножицями мозочка в 0,25 % розчині трипсину (*Sigma*, США) після попереднього відмивання зразків у розчині фосфатно-сольового буфера (ФСБ) з антибіотиками PenStrep (*Sigma*, США). Отриману суспензію залишали на 5 хв при +37 °С при постійному перемішуванні, після чого проводили механічну дисоціацію за допомогою піпеток різного діаметру. Дисоційовані клітини мозочка підраховували і переносили для культивування в культуральні чашки Петрі діаметром 35 мм, попередньо покриті водним розчином полі-L-лізину, зі щільністю посіву $3 \cdot 10^5$ клітин/см^2 та $2 \cdot 10^6$ клітин/см^2. Культивування клітин проводили у середовищі, яке містило 90 % мінімального ростового середовища DMEM, 10 % сироватки коней, глюкози (6 г/л), 10 мкг/мл інсуліну з бичачої підшлункової залози, 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (все – *Sigma*, США) за стандартних умов в CO_2-інкубаторі при температурі +37 °С та зволоженій атмосфері з концентрацією CO_2 5 %.

На другому етапі дослідження після тижня культивування в культуру мозочка вносили купризон (*Sigma*, США) у дозі 25 μМ та 500 μМ на дві години і проводили заміну середовища. На третьому етапі застосовували меншу дозу купризону (25 μМ) з більшим терміном інкубації (48 год) та для з'ясування впливу нейротоксину на різні етапи розвитку олігодендроцитів купризон додавали на 7-му та 18-ту добу культивування. Культивування проводилося протягом 26-28 діб із заміною ростового середовища двічі на тиждень. Прижиттєвий стан та розвиток культивованих клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа IX71 (*Olympus*, Японія) у режимі фазового контрасту.

Для виявлення мієлінових оболонок використовували гістохімічний метод фарбування за допомогою жиророзчинного барвника судана чорного В. З цією метою 26-28 добові культури клітин мозочка промивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) та фіксували 1 % розчином параформальдегіду (ПФА) на 0,1 М ФСБ протягом однієї години. Потім проводили дегідратацію у водних розчинах етанолу: 25 %, 50 % та 70 % по 5 хвилин у кожному розчині. Фарбували 0,5 % розчином судана чорного В *(Chemapol Nordic*, Чехія) на 70 % етанолі протягом години. Зафарбовані клітини знебарвлювали у 70 % етанолі протягом 30 секунд. Регідратували у 50 % та 25 % водних розчинах етанолу по 5 хвилин. Зафарбовані препарати досліджували за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus IX71 у режимі фазового контрасту (об'єктиви x10 та x20).

Для ідентифікації олігодендроцитів проводили імуноцитохімічне фарбування культури маркером лінії олігодендроцитів Olig2. Клітини 28 доби культивування фіксували 4 % розчином ПФА протягом 30 хвилин. Після відмивання від ПФА культуру клітин блокували у розчині 0.1 М ФСБ (pH 7,4) з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну та 0,3 % Тритон Х-100 (*Sigma*, США). Протягом 48 годин при +4 °С культуру клітин інкубували у розчині первинних моноклональних кролячих антитіл до Olig2 (*Chemicon*, США) в титрі 1:200. Первинні антитіла візуалізували вторинними антитілами проти кроля, кон'югованими з флуорохромом Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*, США) в титрі 1:1000. Ядра клітин контрастували флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (*Invitrogen*, США) в титрі 1:5000. Оптичні дослідження проводили за допомогою інвертованого флуоресцентного мікроскопа Axio Observer A1, обладнаного цифровою камерою AxioCam ERc 5s із програмним забезпеченням ZEN 2012 і AxioVision 4.8, з використанням фільтрів флюоресценції №21 HE для Hoechst та №56 HE для Alexa Fluor 488 (*Zeiss*, Німеччина). Проводили підрахунок клітин у 5 випадкових полях зору культури кожної експериментальної групи.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою методів параметричної (t-критерій Стьюдента) статистики. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1-й етап – підтвердження процесів мієлінізації. Оскільки перевагою культивування нервових та гліальних клітин є можливість дослідження динаміки їх морфологічних і функціональних змін в процесі розвитку [2, 17], на першому етапі роботи для дослідження процесу мієлогенезу *in vitro* з метою подальшого вивчення прямої дії на нього демієлінізуючого фактора ми підбирали умови культивування дисоційованих клітин мозочка новонароджених мишей. Зокрема, визначали щільність посіву клітинної суспензії та підтверджували наявність процесів мієлінізації.

Через те що дисоціація тканини мозочка супроводжується змінами форми клітин, пошкодженням та загибеллю як нервових, так і гліальних клітин, після дисоціації, як видно з **рис. 1**, клітини мали округлу форму без відростків. Прикріплення клітин до субстрату відбувалося в перші 4 години культивування.

Через 20 годин культивування та впродовж наступної доби спостерігали початок формування відростків **(рис. 2)**.

Як видно з **рис. 3**, протягом 4-6-ї доби культивування з моменту посіву відростки клітин формували сітку. Така картина зберігалася впродовж усього терміну культивування дисоційованих клітин мозочка **(рис. 4)**.

Для мієлінізації нервових відростків необхідна присутність зрілих диференційованих олігодендроцитів. Олігодендроцити – периневральні клітини ЦНС, які мієлінізують аксони та підсилюють трансдукцію імпульсів [18]. Вони відіграють важливу роль у збереженні життєздатності та функціонуванні аксонів. Треба зазначити, що один олігодендроцит може мієлінізувати до 50 різних аксонів. Мієлінуючі олігодендроцити виробляють до 5-50•10^3 мкм мембрани на добу. Підтримка мієлінової мембрани складається з постійного утворення мієліну, корельованого з високим рівнем експресії відповідних генів [19]. Окрім того, лише аксони діаметром більше 0,2 мкм мають мієлінові оболонки [20].

На даному етапі роботи ідентифікацію олігодендроцитів проводили за морфологічними ознаками за допомогою фазово-контрастного мікроскопа. Олігодендроцити мають сферичну або полігональну сому та багаточисельні тонкі відростки, які розгалужуються [17]. У 1968 році Bat та ін. за морфологічними ознаками та розмірами олігодендроцитів або за товщиною мієлінової оболонки, які вони утворюють, виділили 4 типи цих мієлін-синтезуючих клітин [21]. I тип – малі за розмірами клітини, які формують тонкі мієлінові оболонки та покривають від 15 до 30 аксонів, малих за діаметром. II та III – проміжні типи та IV тип – великі клітини, які утворюють довгі та товсті мієлінові оболонки та покривають від 1 до 3 великих за діаметром аксонів. Mory та Leblond (1970 р.) за допомогою фарбування мікроглії карбонатом срібла розрізняли 3 типи олігодендроцитів: світлі, помірні (проміжні) та темні [22]. Темні олігодендроцити мають найбільш щільну цитоплазму при електронномікроскопічному дослідженні. Автори припускають, що світлі олігодендроцити активно діляться та темніють, коли стають зрілими [23].

Слід зазначити, що при проведенні первинної ідентифікації олігодендроцитів в культурі клітин мозочка на 6-ту добу культивування (незалежно від щільності посіву клітин) нами були виявлені клітини, які за морфологічними ознаками, ймовірно, є незрілими олігодендроцитами **(рис. 5, див. с. 89)**.

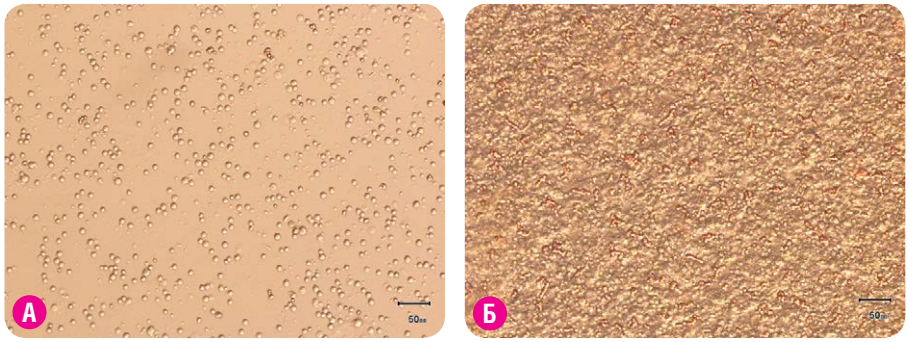

Рис. 1. Мікрофотографії дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 4 години культивування; фазовий контраст. Щільність посіву клітинної суспензії 3•10^5 клітин/см^2 (А) та 2•10^6 клітин/см^2 (Б).

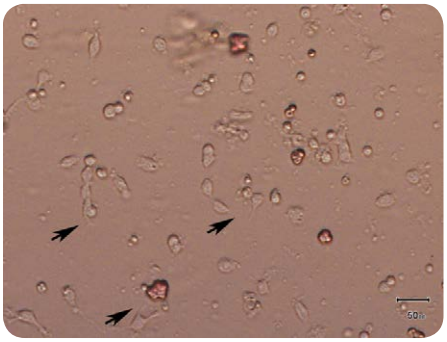

Рис. 2. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 20 годин культивування, фазовий контраст. Стрілками показано формування відростків

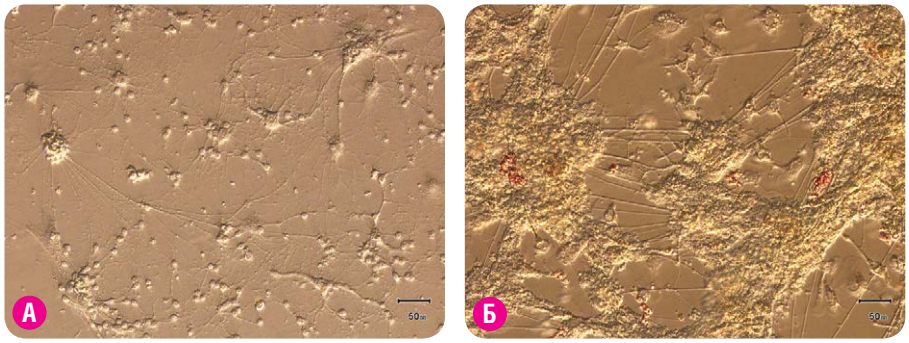

Рис. 3. Мікрофотографії дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 6-а доба культивування, фазовий контраст: А – щільність посіву клітинної суспензії 3•10^5/см^2, Б – щільність посіву клітинної суспензії 2•10^6/см^2.

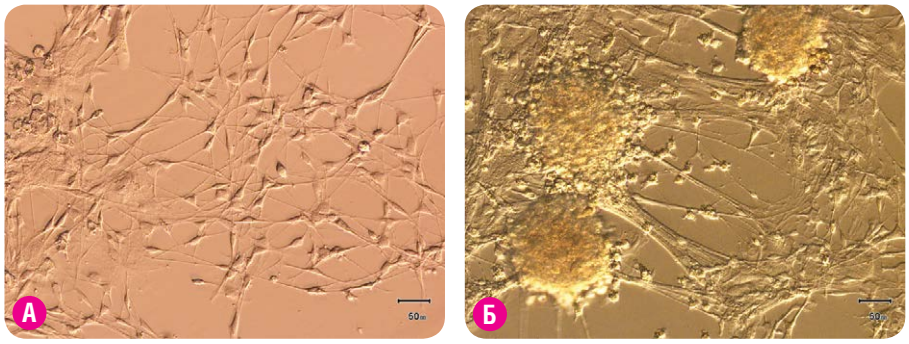

Рис. 4. Мікрофотографії дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 15-а доба культивування, фазовий контраст: А – щільність посіву клітинної суспензії 3•10^5/см^2, Б – щільність посіву клітинної суспензії 2•10^6/см^2.

Оскільки головною функцією олігодендроцитів є формування мієлінової оболонки навколо аксонів, для візуалізації мієлінових оболонок ми провели фарбування цих структур суданом чорним В. Як видно з **рис. 6**, у 26-добовій культурі дисоційованих клітин мозочка нами були виявлені мієлінізовані волокна. Оскільки процеси мієлінізації неможливі без зрілих олігодендроцитів, ми можемо стверджувати, що виявлення мієлінових оболонок аксонів свідчить про присутність зрілих олігодендроцитів у 26-добовій культурі дисоційованих клітин мозочка. Не дивлячись на те, що ми спостерігали процеси мієлінізації аксонів нейронів при різній щільності посіву клітинної суспензії, в той же час при використанні $2 \cdot 10^6$ клітин/см^2 ми спостерігали в полі зору більше мієлінізованих аксонів нейронів.

Таким чином, на даному етапі досліджень можна вважати, що в досліджуваній культурі дисоційованих клітин мозочка відбувається процес мієлінізації, який неможливий без зрілих олігодендроцитів.

На **2-му етапі** наших досліджень для вивчення процесів демієлінізації *in vitro* ми застосовували демієлінізуючий фактор купризон. На першому етапі наших досліджень вже на шосту добу культивування при проведенні первинної ідентифікації клітин в дисоційованій культурі мозочка нами були виявлені клітини, які за морфологічними ознаками, ймовірно, є олігодендроцитами. Для вивчення прямої дії демієлінізуючої речовини в культуру мозочка на 7-му добу культивування вносили купризон у дозах 25 μМ та 500 μМ. Як видно з **рис. 7,** при застосуванні дози купризону 25 μМ спостерігалася часткова демієлінізація нервових волокон, тобто в полі зору були виявлені як мієлінізовані, так і демієлінізовані нервові волокна. З даних літератури відомо, що застосування купризонової моделі призводить до загибелі олігодендроцитів з подальшою демієлінізацією нервових волокон. Було показано, що обробка клітин різною концентрацією купризону не впливає на проліферацію та виживання попередників олігодендроцитів, в той же час купризон виявляє значний вплив на зрілі олігодендроцити з морфологічними змінами мітохондрій (збільшення у розмірі або розбухання) [24] та зниженням мітохондріального потенціалу [25]. Токсичний вплив спостерігався вже при дозі 25 μМ. Тобто основною мішенню для нейротоксину купризону є зрілі олігодендроцити, тоді як інші гліальні клітини, включаючи попередники олігодендроцитів, не змінюються або змінюються незначно. При збільшенні дози купризону до 500 μМ відбувалася повна демієлінізація нервових волокон 26 добової культури дисоційованих клітин мозочка мишей **(рис. 8)**.

Таким чином, результати цитохімічного дослідження підтвердили присутність процесів демієлінізації під впливом купризону в умовах *in vitro*. Встановлено дозозалежний демієлінізуючий вплив купризону на аксони нейронів у дисоційованій культурі клітин мозочка

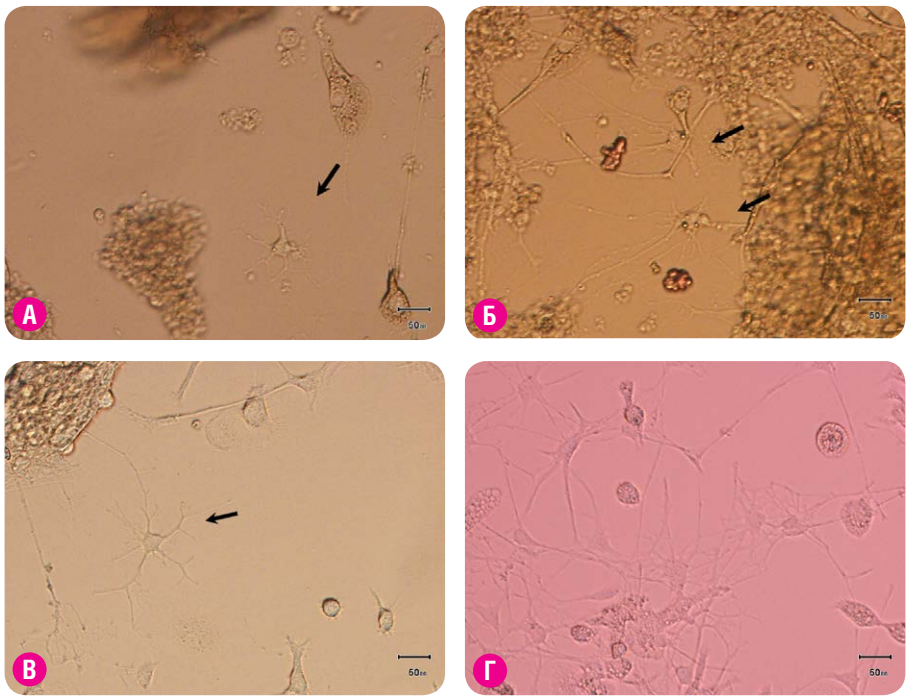

Рис. 5. Мікрофотографії дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 6-та доба культивування, фазовий контраст: А, В – щільність посіву клітинної суспензії $3 \cdot 10^5$/см^2; Б, Г – щільність посіву клітинної суспензії $2 \cdot 10^6$/см^2; стрілками позначені клітини, подібні на незрілі олігодендроцити.

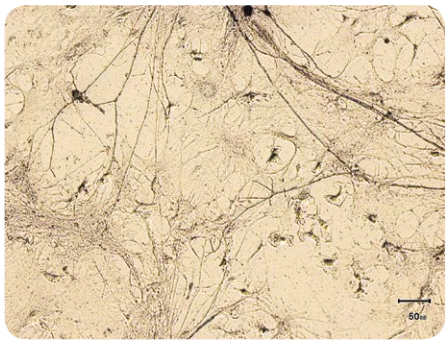

Рис. 6. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 26-та доба культивування, фарбування мієлінових оболонок аксонів суданом чорним В, світлова мікроскопія.

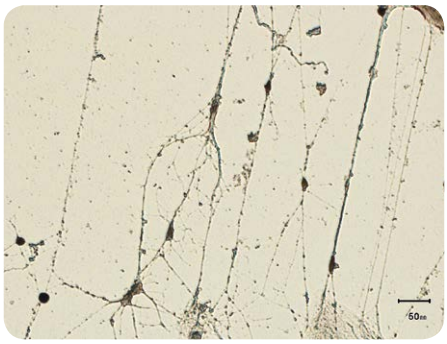

Рис.7. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей із використанням купризону у дозі 25 μМ, 26-та доба культивування, фарбування мієлінових оболонок аксонів суданом чорним В; світлова мікроскопія.

Рис.8. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей із використанням купризону у дозі 500 μМ, 26-та доба культивування, фарбування мієлінових оболонок аксонів суданом чорним В; світлова мікроскопія.

новонароджених мишей за умов введення купризону на 7-му добу культивування.

На **3-му етапі роботи** для дослідження впливу купризону на олігодендроцити, які знаходяться на різних стадіях свого розвитку, ми порівнювали демієлінізуючий вплив купризону за умов додавання його на різних строках культивування дисоційованої культури мозочка, а саме на 7-му та на 18-ту добу культивування. На цьому етапі дослідження ми проводили імуноцитохімічне забарвлення лінійним маркером олігодендроцитів Olig2.

Перед остаточним дозріванням олігодендроцити проходять чотири стадії розвитку, що визначається за проявом різних антигенних маркерів, а також мітотичного та міграційного статусу цих клітин. Клітини-попередники олігодендроцитів розвиваються в вентральній частині нейроепітелію нервової трубки на ранніх етапах ембріонального розвитку, а точніше – з домену попередника моторного нейрона (motor neuron progenitor domain, pMN); в спинному мозку і в задньому мозку (теленцефалі) – на пізніх етапах ембріонального розвитку, а також в ранньому постнатальному житті. Ці проліферативні клітини мігрують у білу речовину, що розвивається, виходять із клітинного циклу, диференціюються в зрілі олігодендроцити і починають експресувати асоційовані з мієліном білки [5].

Щодо стадій диференціації олігодендроцитів відомо, що попередники олігодендроцитів мають біполярну морфологію та експресують специфічні маркери гангліозид GD3 та протеоглікан NG2 (neuron-glial antigen 2). Показано, що ці клітини активно проліферують та володіють міграційними властивостями. У системі *in vitro* при додаванні в культуру фактора росту фібробластів (fibroblast growth factor, FGF) та тромбоцитарного ростового фактора (plateled-derived growth factor, PDGF) проліферативний потенціал цих клітин збільшується.

Наступна стадія дозрівання олігодендроцитів – трансформація в преолігодендроцити, які зберігають властивості клітинного поділу та набувають маркер O4. На цій стадії клітини малорухливі та втрачають проліферативну відповідь на PDGF. Далі преолігодендроцит перетворюється в незрілий олігодендроцит. Ця стадія характеризується появою маркера GalC/O1 (галактоцереброзид) та втратою експресії GD3 антигенів на поверхні клітини. Зрілі олігодендроцити експресують клітиноспецифічні галактоцереброзиди GalC і сульфатиди SUL, а також мієлінспецифічні білки CNP (2,3-cyclic nucleotide-3-phosphohydrolase), маркер дозрівання олігодендроцитів PLP (proteolipid protein), маркер диференціації олігодендроцитів MBP (myelin basic protein), MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), один із ранніх мієлінспецифічних білків MAG (myelin-associted glycoprotein) [23]. MBP-позитивні олігодендроцити класифікуються на три категорії: немембранні (non-membranous), мембранні (membranous) та з мієліновими листками (with myelin sheets). Формування мембранних мієлінових листів описано лише на пізніх стадіях диференціації олігодендроцитів [26-28].

Як мієлінізація, так і ремієлінізація відбуваються через активацію мієлін-білкових генів, які індукуються різними транскрипційними факторами. Послідовна активація білка мієліну корелює з активацією та гальмуванням декількох факторів транскрипції, таких як Olig1, Olig2 та Nkx2.2 [29]. Olig2 необхідний для підтримки експресії MYRF (myelin regulatory factor), який регулює мієліносоційовані білки MBP, PLP1, MAG, CNP та MOG, які мають вирішальне значення при утво-

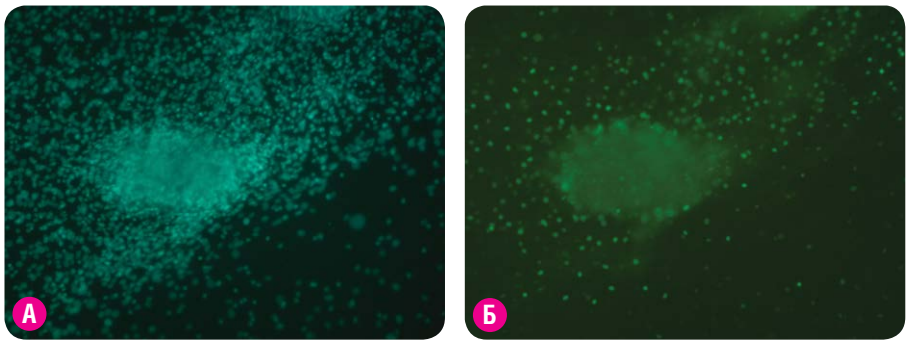

Рис. 9. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей, 28-ма доба культивування, імуноцитохімічне фарбування ядер Hoechst 33342 (бірюзовий колір – А), та олігодендроцитів на маркер Olig2 (зелений колір – Б); флуоресцентна мікроскопія.

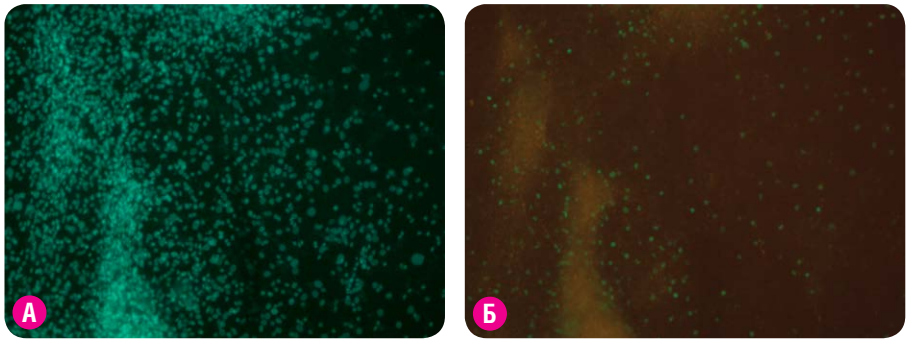

Рис. 10. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей з використанням купризону у дозі 25 μM на 7-му добу, 28-ма доба культивування, імуноцитохімічне фарбування ядер Hoechst 33342 (бірюзовий колір – А), та олігодендроцитів на маркер Olig2 (зелений колір – Б); флуоресцентна мікроскопія.

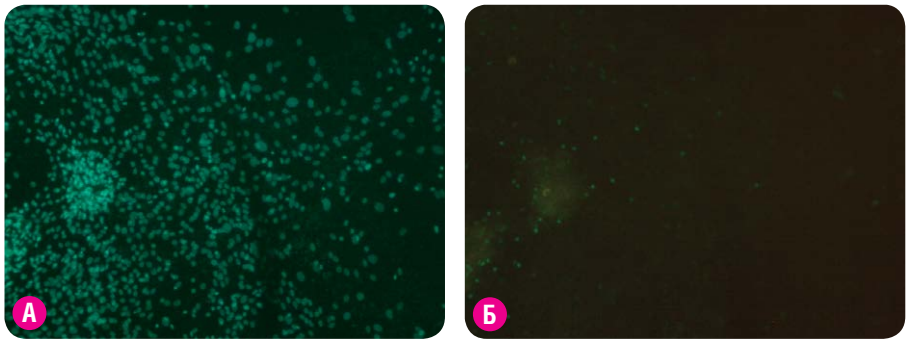

Рис. 11. Мікрофотографія дисоційованої культури клітин мозочка новонароджених мишей з використанням купризону у дозі 25 μM на 18-ту добу, 28-ма доба культивування, імуноцитохімічне фарбування ядер Hoechst 33342 (бірюзовий колір – А), та олігодендроцитів на маркер Olig2 (зелений колір – Б); флуоресцентна мікроскопія.

ренні мієліну [18]. Слід зазначити, що Olig2 виявляється на різних стадіях розвитку олігодендроцитів: попередників олігодендроцитів, пре-олігодендроцитів, дозріваючих та зрілих олігодендроцитів.

В наших дослідженнях було виявлено, що істотна загибель Olig2$^+$ олігодендроцитів порівняно з контрольними культурами (без внесення куприпзону) спостерігалася тільки при застосуванні куприпзону на 18-ту добу культивування дисоційованої культури клітин мозочка: з 420,0 ± 78,4 до 62,5 ± 18,2 клітин ($p < 0,05$). Слід зазначити, що внесення демієлінізуючого фактора у ці строки культивування призвело до зниження загальної кількості ядровмісних клітин: з 2381,1 ± 167,7 до 663,0 ± 208,4 клітин ($p < 0,05$) **(рис. 9, 11, див. с. 90)**.

Слід зазначити, що все більше дослідників вважають розсіяний склероз нейродегенеративним захворюванням. Ушкодження нейронів може сприяти порушенню структури та функціонування відростків цих клітин і формуванню таких неврологічних симптомів, характерних для розсіяного склерозу людини, як зміни пам'яті, емоцій, інтелекту, вегетативні розлади, тощо [3, 30]. Зниження загальної кількості ядровмісних клітин можна пояснити і загибеллю нейронів під впливом куприпзону.

При додаванні куприпзону на 7-му добу культивування істотних змін кількості Hoechst$^+$ та Olig2$^+$ клітин порівняно з контрольними культурами виявлено не було: 2381,1 ± 167,7 та 2205,0 ± 392,0; 420,0 ± 78,4 та 493,0 ± 41,0 клітин, відповідно **(рис. 9, 10)**. Таким чином, були підтверджені попередні дані наших досліджень та дані літератури стосовно того, що куприпзон не призводить до зменшення кількості олігодендроцитів, які знаходяться на ранніх стадіях свого розвитку [24, 25].

На даний час терапія розсіяного склерозу спрямована на пригнічення імунної відповіді та є лише помірно ефективною зі зниженням частоти клінічних рецидивів, але не сповільнює прогресування хвороби та не впливає на ремієлінізацію в ЦНС. Тому пошук оптимальних експериментальних моделей для вивчення процесів демієлінізації та ремієлінізації є актуальним питанням та має важливе значення для вивчення патогенезу розсіяного склерозу та пошуку нових терапевтичних підходів лікування цього захворювання.

ВИСНОВКИ

1. При відтворенні токсичної куприпзонової моделі демієлінізації визначена щільність посіву клітинної суспензії мозочка мишей, підібрані умови культивування дисоційованих клітин мозочка, досягнуто виживання культури клітин мозочка до 26-28-ї доби культивування.

2. Підтверджено присутність процесів мієлінізації та демієлінізації аксонів нейронів в культурі клітин мозочка мишей в умовах in vitro.

3. Виявлений дозо-залежний демієлінізуючий вплив куприпзону на аксони нейронів у дисоційованій культурі клітин мозочка новонароджених мишей за умов введення куприпзону на 7-му добу культивування.

4. Показано, що куприпзон має пригнічуючий вплив на олігодендроцити 18-ї доби культивування.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Мельник Н. О.* Структура деяких органів нервової та імунної систем за умов демієлінізації та ремієлінізації: дис. ... д.мед.н. Київ, 2005. 358 с.
2. *Пивнева Т. А.* Механизмы демиелинизации при рассеянном склерозе. Нейрофизиология. 2009. 41, № 5. С. 429-437.
3. *Суслина З. А., Завалишин И. А.* Рассеянный склероз: от представлений о патогенезе к лечению. Неврологический весник. 2010. № 1. С. 6-8.
4. *Міщенко Т. С., Шульга О. Д., Бобрик Н. В., та ін.* Розсіяний склероз: глобальні перспективи. Укр. мед. часопис. 2014. 101, № 3. С. 84-87.
5. *Miron V.E., Kuhlmann T., Antel J. P.* Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. BBA. 2011. 1812. P. 184-193.
6. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. Под ред. Зозули Ю. А., Лисяного Н. И. Киев, 2005. 368 с.
7. *Acs P., Kalman B.* Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. Methods Mol Biol. 2012. 900. P. 403-431.
8. *Kipp M., Clarner T., Dang J.* The cuprizone animal model: new insights into an old story. Acta neuropathol. 2009. 118. P. 723-736.
9. *Torkildsen O., Brunborg L.A., Myhr K.M., et al.* The cuprizone model for demyelination. Acta Neurol Scand Suppl. 2008. 188. P. 72-76.
10. *Sachs H. H., Bercury K. K., Popescu D.C., et al.* A New Model of Cuprizone-Mediated Demyelination/Remyelination. ASN Neuro. 2014. 6, № 5. DOI: 10.1177/1759091414551955.
11. *Herder V., Hansmann F., Stangel M., et al.* Lack of cuprizone-induced demyelination in the murine spinal cord despite oligodendroglial alterations substantiates the concept of site-specific susceptibilities of the central nervous system. Neuropathology and Applied Neurobiology. 2011. 37. P. 676-684.
12. *Абакумова Т. О., Кузькина А. А., Жарова М. В. и др.* Куприпзоновая модель как инструмент для доклинического исследования эффективности диагностики и терапии рассеянного склероза. Бюлл.эксперим. биологии и мед. 2015. 159, № 1. С. 124-129.
13. *Praet J., Guglielmetti C., Berneman Z., et al.* Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. Neurosci Biobehav Rev. 2014. 47. P. 485-505.
14. *Kipp M., Clarner T., Dang J., et al.* The cuprizone animal model: new insights into an old story. Acta Neuropathol. 2009. 118, № 6. P. 723-736.
15. *Basogly H., Boylu N. T., Kose H.* Cuprizone-induced demyelination in Wistar rats; electrophysiological and histological assessment. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013. 17, № 20. P. 2711-2717.
16. *Barateiro A., Fernandes A.* Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. BBA. 2014. 1843. P. 1917-1929.
17. *Пивнева Т. А., Колотушкина Е. В., Мельник Н. А.* Механизмы процесса демиелинизации и его моделирование. Нейрофизиология. 1999. № 6, т. 31. С. 497-509.
18. *Goldman S. A., Kuypers N. J.* How to make an oligodendrocyte. Development. 2015. 142. P. 3983-3995.
19. *LeBaron F.N., Sanyal S., Jungalwala F.B.* Turnover rate of molecular species of sphingomyelin in rat brain. Neurochem Res. 1981. 6, № 10. P. 1081-1089.
20. *Bradl M., Lassmann H.* Oligodendrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010. 119. P. 37-53.
21. *Mori S., Leblond C. P.* Electron microscopic identification of three classes of oligodendrocytes and a preliminary study of their proliferative activity in the corpus callosum of young rats. J Comp Neurol. 1970. 139, № 1. P. 1-28.
22. *Butt A. M., Ibrahim M., Ruge F. M., et al.* Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody rip. Glia. 1995. 14, № 3. P. 185-197.
23. *Baumann N., Pham-Dihn D.* Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev. 2001. 81, № 2. P. 871-927.
24. *Wendy C.* The neurotoxicant, cuprizone, redards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. Neurol Sci. 1999. 168. P. 116-120.

25. *Benardais K., Kotsiari A., Skuljiec J., et al.* Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. Neurotox Res. 2013. 24, № 2. P. 244-250.
26. *Osterhout D. J., Wolven A., Wolf R. M., et al.* Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. J Cell Bio. 1999. 145. P. 1209-1218.
27. *Lourenço T., Paes de Faria, Bippes C. A., et al.* Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues. 2009. DOI: 10.1038/srep21563.
28. *Robinson A. P., Rodgers J.M., Goings G. E., et al.* Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: Clues for MS Pathogenesis. Plos One. 2014. 9, № 9. P. 107649.
29. *Patel J. R., Klein R. S.* Mediators of oligodendrocyte differentiation during remyelination. FEBS Letters. 2011. 585. P. 3730-3737.
30. *Wegner C. I., Esiri M. M., Chance S. A., et al.* Neurocortical neuronal, synaptic and glial loss in multiple sclerosis. Neurology. 2006. 67, № 6. P. 960-967.

СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автор підтверджує відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 06.04.2018 р.
Прийнята до друку 30.05.2018 р.