

Вплив тироксину і естрадіолу на поведінку, нейральні стовбурові та імунні клітини головного мозку мишей із купризоною моделлю демієлінізації

І.Ф. Лабунець, А.Є. Родніченко, Т.М. Пантелеймонова

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ,
e-mail: irina_labunets@ukr.net

*У молодих мишей лінії 129/Sv, які отримували нейротоксин купризон і гормони L-тироксин або β-естрадіол, досліджували зв'язок змін показників поведінки і кількості нейральних стовбурових клітин, T-лімфоцитів, клітин мікроглії/макрофагів у головному мозку, оцінених за маркерами nestin, CD3, Mac1 відповідно, а також числа фагоцитуючих латекс макрофагів. Щоденно з їжею давали купризон впродовж 3 тиж; тироксин або естрадіол – з 8-го дня купризонової дієти. Під впливом купризону суттєво зменшувалася рухова, емоційна та дослідницька активності. Зміни показників поведінки збігалися зі зростанням у головному мозку кількості nestin⁺, CD3⁺ - і Mac1⁺-клітин та активних макрофагів (в 1,6, 2,3, 1,5 та 1,2 раза відповідно) відносно значень інтактних тварин. У мишей, яким вводили тироксин, рухова активність підвищувалася в 1,3 раза, проте була меншою, ніж в інтактних тварин. Кількість nestin⁺, Mac1⁺-клітин і активних макрофагів зменшувалася до рівня інтактної групи. Після введення естрадіолу рухова та емоційна активність зростала в 1,4 та 2,5 раза відповідно щодо значень у тварин, які вживали купризон. Кількість nestin⁺-клітин була вищою у мишей, які отримували естрадіол, ніж у тварин без нього, тоді як кількість активних макрофагів зменшувалася і не відрізнялася від значень інтактної групи. Таким чином, у мишей із купризоною моделлю демієлінізації позитивна дія тироксину і естрадіолу на функціонування ЦНС супроводжується зміною у головному мозку вмісту nestin⁺-клітин та факторів патології.
Ключові слова: купризон; тироксин; естрадіол; поведінка; нейральні стовбурові клітини; макрофаги і T-лімфоцити головного мозку.*

ВСТУП

Розсіяний склероз є одним із найбільш розповсюджених демієлінізуючих захворювань центральної нервової системи (ЦНС) [1]. У пацієнтів із цією патологією спостерігаються рухові, емоційні, вегетативні та когнітивні порушення, які призводять до високої частоти їх інвалідизації. При цьому вони можуть бути пов'язані зі змінами не тільки вмісту мієліну нервових волокон, олігодендроцитів і нейронів, але й нейральних стовбурових клітин (НСК)/прогеніторів, які є джерелом клітин гліальної та нейрональної лінії [2].

Встановлено, що функціонування НСК та їх нащадків знаходиться під впливом таких

чинників мікро- та макрооточення, як цитокіни, ростові фактори і гормони [2]. Серед останніх слід відмітити тиреоїдні та статеві гормони, вміст яких при розсіяному склерозі змінюється [3, 4]. Показано, що вони, з одного боку, безпосередньо впливають на мієло- та нейрогенез, а з іншого, опосередковано, через патогенетичні чинники демієлінізуючої патології (продукти оксидативного стресу, клітин імунної системи та нейрозапалення). Так, встановлено, що клітини мікроглії та макрофаги головного мозку продукують вільні радикали, прозапальні цитокіни (фактор некрозу пухлин α, інтерферон-γ, інтерлейкін-1β) [5, 6]. Джерелом прозапальних цитокінів

© І.Ф. Лабунець, А.Є. Родніченко, Т.М. Пантелеймонова

також можуть бути Т-лімфоцити, які інфільтрують головний мозок при нейрозапаленні.

При вивченні патогенезу демієлінізуючої патології, зокрема розсіяного склерозу, важливим є використання адекватних експериментальних моделей. Нами та іншими авторами показано, що використання експериментальної токсичної купризонової моделі демієлінізації дає змогу оцінити зміни не тільки числа НСК, структури та функціонального стану ЦНС, але й факторів імунних, нейрозапалення та оксидативного стресу [5–7]. Більше того, на купризонової моделі показано протекторний ефект тиреоїдних і статевих гормонів на демієлінізовані нейротоксином мієлінові волокна головного мозку [8, 9].

Мета нашої роботи – дослідити вплив тироксину і естрадіолу на показники поведінки у мишей із купризоновою моделлю демієлінізації; оцінити значення змін НСК, макрофагів і Т-лімфоцитів головного мозку в реалізації цього впливу.

МЕТОДИКА

Тварини. Досліди проводили на 68 мишах-самцях лінії 129/Sv (віком 3–5 міс), із розплідника ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» (ІГРМ). Миші знаходились у стандартних умовах віварію при фіксованому світловому режимі 12:12. Під ефірним наркозом їх декапітували і отримували матеріал для дослідження. Всі дослідження виконували відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою».

Моделі. Експеримент проводили на токсичній купризонової моделі демієлінізації, яка вперше в Україні була відтворена в лабораторії експериментального моделювання ІГРМ [7]. Нейротоксин купризон («Sigma», США) давали мишам щоденно з їжею (0,2% від добового корму), впродовж 3 тиж. Ін-

тактні тварини знаходилися на звичайному раціоні віварію.

Мишам з 8-ї доби вживання купризонової щоденно вводили в ранкові години: 1) L-тироксин, внутрішньоочеревино, в разовій дозі 0,25 мг/кг, всього 12 ін'єкцій; 2) β -естрадіол, підшкірно у ділянку шиї, в разовій дозі 10,0 мг/кг, всього 12 ін'єкцій. Всі гормони виробництва «Sigma», США. Схема введення гормонів базувалася на даних щодо їх ремієлінізуючого ефекту на демієлінізовані структури головного мозку, а також розвитку апоптозу олігодендроцитів і пригнічення рухової активності мишей вже через 5–7 діб прийому купризону [6, 7]. Контрольні групи тварин із купризоновою дієтою отримували за аналогічними схемами ін'єкції 0,9%-го розчину хлориду натрію.

Експериментальні групи. Тварин розподілили на групи: до I ввійшли інтактні миші ($n = 20$), до II – контрольні, які отримували купризон і розчинник гормонів ($n = 24$), до III – миші, які отримували купризон і гормони L-тироксин або β -естрадіол ($n = 24$).

При фенотипуванні клітин головного мозку за маркерами CD3 (маркер Т-клітин), Mac-1 (маркер клітин мікроглії/макрофагів) і nestin (маркер НСК) використовували кон'юговані з флюорохромами моноклональні антитіла (МАТ; «Becton Dickinson», США) [5, 10]. Проте треба зазначити, що при демієлінізації маркер клітин мікроглії Mac1⁺ експресують також макрофаги, які потрапляють у головний мозок із периферичної крові [5]. Тому для гетерогенної популяції Mac1⁺-клітин головного мозку авторами запропоновано термін «клітини мікроглії/макрофаги», який ми і використовували при описуванні результатів дослідження та їх обговорення.

Гомогенат головного мозку мишей фіксували 4%-м розчином параформальдегіду на 0,1 М фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) з рН 7,4. Клітини пермеабілізували впродовж 15 хв буфером Perm/Wash («Becton Dickinson», США). До гомогенату головного мозку ($2 \cdot 10^5$ клітин у 50 мкл), згідно з рекомендаціями

фірми-виробника додавали МАТ у розведенні 1:50 (0,5 мкг/10⁶ клітин). Зразки без нього були контрольними. Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria («Becton Dickinson», США) за допомогою програми BD FACS Diva 6.1.

Функціональна активність макрофагів. Головний мозок гомогенізували в розчині ФСБ і вносили до чашок Петрі діаметром 100 мм («Sarstedt», Німеччина) у ростовому середовищі (RPMI-1640, 10%-ва ембріональна теляча сироватка, антибіотики, 2 ммоль L-глютаміну) [11]. Після культивування при 37°C впродовж години клітини, що адгезувалися до пластика, знімали за допомогою суміші розчинів трипсину/версену. Потім їх диспергували і у концентрації 2,5×10⁶ мл нашаровували на покривні скельця та інкубували протягом години при 37°C. На отриманий моношар наносили 0,2 мл суспензії латексу (2,5·10⁸ мл) та інкубували 45 хв при 37°C. Надалі скельця фіксували у парах 4%-го параформальдегіду та фарбували за Романовским – Гімза. Всі реактиви фірми «Sigma» (США). У світловому мікроскопі підраховували не менше ніж 200 макрофагів і визначали фагоцитарний індекс (ФІ – кількість клітин, здатних до фагоцитозу часточок латексу) та фагоцитарне число (ФЧ – кількість часточок латексу, які поглинулися одним макрофагом).

Функціональний стан ЦНС вивчали за показниками поведінки у тесті «відкритого поля» та «ротарод-тесті» [12]. Перший дає можливість оцінити у тварин активності: горизонтальну рухову (кількість перетнутих квадратів), емоційну (кількість фекальних болюсів), дослідницьку (кількість заглядань у «нірки» – нірковий рефлекс). Мишей всіх груп тестували впродовж 3 хв. «Ротарод-тест» (тест із барабаном, що обертається) дає змогу досліджувати координацію, рівновагу та м'язовий тонус мишей [12]. Швидкість обертів в установці змінювали послідовно з 10 (3,0 В; 300 мА) до 20 об/хв (5,0 В; 300 мА). Результати наводили у вигляді сумар-

ного часу (секунда) утримання на валу при 10 і 20 об/хв.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою критерію t Стьюдента. Різницю між досліджуваними показниками вважали вірогідною при значенні P < 0,05. Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували програму Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив тироксину на поведінку, nestin⁺-клітини, клітини мікроглії/ макрофаги, Т-лімфоцити головного мозку мишей із купризоною моделлю демієлінізації. Встановлено, що у мишей, які отримували купризон істотно зменшувалася рухова, емоційна та дослідницька активність (рис. 1). У тварин із купризоною дієтою, яким вводили L-тироксин, значно зростала рухова активність, але вона не сягала значень інтактної групи (див. рис. 1, а). Емоційна та дослідницька активність не змінювалися після введення гормону (див. рис. 1, б, в). Час утримання на валу в «ротарод-тесті» в групі інтактних тварин, тих, що отримували купризон із розчинником або купризон із тироксином був 810,2 ± 31,0; 582,3 ± 25,3 і 510,4 ± 28,2 с відповідно. При цьому під впливом купризону він істотно зменшувався (P < 0,05) і залишався на тому самому рівні після введення гормону.

У мишей, які отримували купризон, значно зростало в головному мозку число nestin⁺, Mac1⁺, CD3⁺-клітин, а також фагоцитуючих латекс-макрофагів (табл. 1). Після ін'єкцій тироксину число nestin⁺, Mac1⁺-клітин і активних макрофагів суттєво зменшувалося, тоді як CD3⁺-клітин залишалося без змін.

Вплив естрадіолу на поведінку, nestin⁺-клітини, макрофаги і Т-лімфоцити головного мозку мишей із купризоною моделлю демієлінізації. У тварин, що отримували купризон разом з ін'єкціями естрадіолу, відновлювалася знижена рухова активність, проте не до значень інтактних тварин (рис. 2, а). Емоційна активність також суттєво

Таблиця 1. Число nestin⁺-, Mac1⁺-, CD3⁺-клітин і активних макрофагів у головному мозку мишей, які отримували купризон і L-тироксин (M ± m)

Показник	Дослідні група		
	Інтактна	Купризон і розчинник	Купризон і L-тироксин
nestin ⁺ , %	5,1 ± 0,5	8,2 ± 1,0*	6,1 ± 1,0**
Mac-1 ⁺ , %	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2*	1,0 ± 0,1**
Фагоцитарний індекс, %	74,2 ± 2,1	82,0 ± 2,5*	71,3 ± 2,2**
Фагоцитарне число, ум.од.	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,2
CD3 ⁺ , %	0,9 ± 0,1	2,1 ± 0,3*	2,0 ± 0,2*

Примітка: тут і в табл. 2 *P < 0,05 порівняно з інтактними мишами; **P < 0,05 порівняно з тваринами, які вживали купризон.

підвищувалася і при цьому навіть перевищила їх значення (див. рис. 2, б). Дослідницька активність практично не змінювалася (див. рис. 2, в). При дослідженні поведінки в «ротарод-тесті» встановлено істотне зменшення під впливом купризону часу утримання ми-

шей на валу (з 650,2 ± 23,3 до 510,0 ± 24,8 с; P < 0,05) та відсутність змін показника після введення естрадіолу (483,4 ± 30,4 с; P > 0,05).

У головному мозку тварин із купризоною дієтою, які отримували ін'єкції естрадіолу, значно зросло число nestin⁺-клітин, а

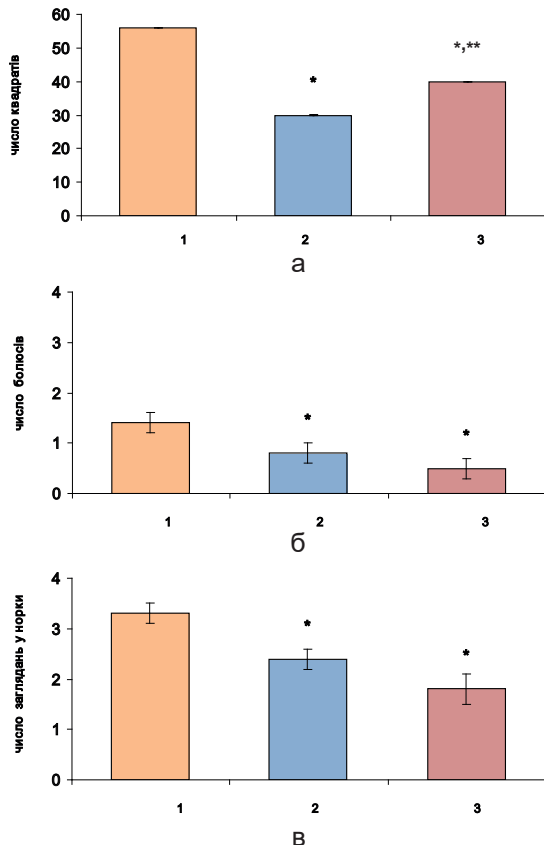


Рис. 1. Горизонтальна рухова (а), емоційна (б) та дослідницька (в) активність у мишей: 1 – інтактні; 2 – купризон; 3 – купризон і L-тироксин.

*P < 0,05 порівняно з інтактними мишами; **P < 0,05 порівняно з мишами, які вживали купризон

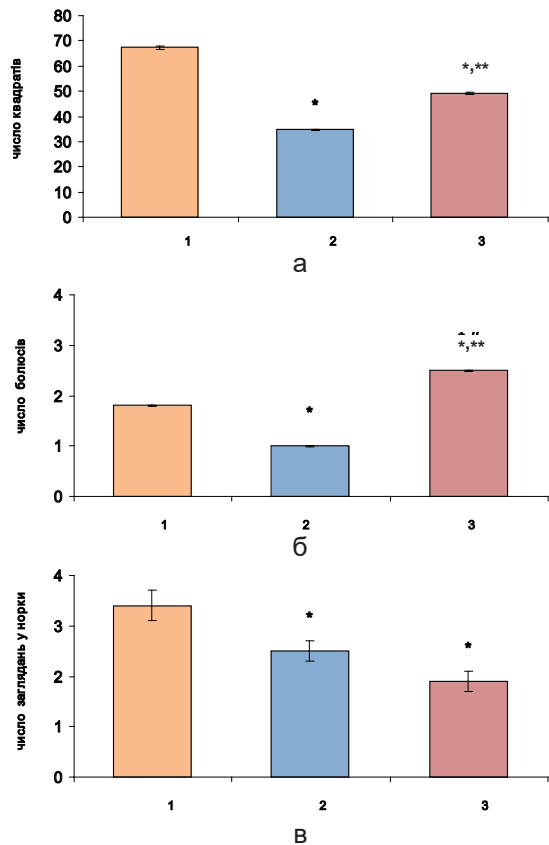


Рис. 2. Горизонтальна рухова (а), емоційна (б) та дослідницька (в) активність у мишей: 1 – інтактні; 2 – купризон; 3 – купризон і β-естрадіол.

*P < 0,05 порівняно з інтактними мишами; **P < 0,05 порівняно з мишами, які вживали купризон

також зменшувалася кількість і активність макрофагів відносно значень тварин, котрі вживали тільки купризон (табл. 2). Вміст CD3⁺-клітин залишався підвищеним і після ін'єкцій гормону. Таким чином, у мишей із купризонною моделлю демієлінізації дія тироксину і естрадіолу *in vivo* поліпшує поведінкові реакції, які були пригнічені нейротоксином. Позитивні зміни функціонального стану ЦНС спостерігаються на тлі змін у головному мозку числа nestin⁺-клітин і клітин мікроглії/макрофагів. На тваринах із модуляцією функції щитоподібної залози показано стимулюючий вплив тиреоїдних гормонів на метаболізм у клітинах ЦНС, диференціювання попередників олігодендроцитів, експресію основного білка мієліну (MBP) та мієлінасоційованого глікопротеїну (MAG) в олігодендроцитах [4, 13]. Саме тому дослідники вважають тиреоїдні гормони перспективними медикаментозними ремієлінізуючими засобами при демієлінізуючій патології ЦНС із протекторним ефектом на функціональний стан цієї системи.

У нашому експерименті встановлено істотне зростання під впливом тироксину пригніченої купризонном рухової активності тварин. Такі зміни поведінки можна пояснити ремієлінізуючим ефектом гормону в мозолистому тілі, мозочку і корі головного мозку, який пов'язаний із підвищенням кількості олігодендроцитів у цих структурах ЦНС [8, 13]. Є дані, що при демієлінізуючій патології вплив тироксину на кількість олігодендроцитів значною мірою реалізується через зміни біологічних властивостей НСК головного мозку [14]. Дійсно, нами встановлено

зниження числа nestin⁺-клітин у головному мозку мишей, які отримували купризон разом із тироксином, що, найімовірніше, відображає посилення їх диференціювання саме в олігодендроцити. При цьому ми не виключаємо можливості змін нейрогенезу, оскільки відомий вплив тироксину на диференціювання НСК і в нейрональному напрямку [15].

Виявлене нами значне зменшення кількості клітин мікроглії/макрофагів у головному мозку мишей після введення тироксину свідчить про можливість опосередкованого впливу гормону на функціонування НСК, нейронів і олігодендроцитів. Зменшувалося також число активованих астроцитів, які разом із клітинами мікроглії/макрофагами є джерелом прозапальних цитокінів, а також хемокінів [8]. Крім того, у головному мозку мишей, які вживали купризон, зростає вміст малонового діальдегіду і, навпаки, зменшувалась активність антиоксидантних ферментів [11, 16]. Разом з тим показана активація під впливом тироксину антиоксидантної системи тканин організму [17].

Відомо про промієлінізуючі властивості статевих гормонів (естрадіол, тестостерон, прогестерон) при демієлінізуючій патології [3, 4, 9]. Так, у щурів із моделлю експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) естрогени впливають на проліферацію і диференціювання попередників олігодендроцитів, змінюють ремієлінізацію при дії демієлінізуючих чинників, виявляють антиапоптотичний ефект на клітини ЦНС. У мишей із купризонною моделлю демієлінізації введення β-естрадіолу призводить до посилення проліферації і диференціювання

Таблиця 2. Число nestin⁺-, CD3⁺-клітин і активних макрофагів у головному мозку мишей, які отримували купризон і β-естрадіол (M ± m)

Показник	Дослідні групи		
	Інтактна	Купризон і розчинник	Купризон і β-естрадіол
Nestin ⁺ , %	5,1 ± 0,5	8,2 ± 1,0*	11,2 ± 0,5*, **
Фагоцитарний індекс, %	68,0 ± 2,1	76,0 ± 2,5*	68,3 ± 1,9**
Фагоцитарне число, ум.од	4,1 ± 0,2	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1**
CD3 ⁺ , %	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,2*	2,0 ± 0,1*

попередників олігодендроцитів, експресії МРВ у олігодендроцитах і ремієлінізації ушкоджених нейротоксином структур головного мозку.

В експерименті використовували дозу β -естрадіолу, яка відповідає концентрації гормону в третьому триместрі вагітності гризунів і виявляє виражений ремієлінізуючий ефект при купризоніндукованій демієлінізації [9]. Нами встановлено значне підвищення рухової та емоційної активності тварин. Подібні зміни поведінки спостерігалися на тлі істотного зростання числа nestin⁺-клітин у головному мозку, що може відображати посилення їх проліферації за умов введення естрадіолу. При цьому гормон спроможний впливати на проліферацію НСК безпосередньо, через ядерні рецептори в цих клітинах, а також опосередковано, через ростові фактори [9, 18]. Так, показано, що естрадіол підвищує в клітинах нервової системи експресію та синтез фактора росту фібробластів (FGF-2), який є мітогеном для НСК [2]. Крім того, під дією гормону в ЦНС мишей із купризоною дією зростає експресія інсуліноподібного ростового фактора (IGF-1), який разом із FGF-2 стимулює проліферацію попередників олігодендроцитів [19]. У механізмі поліпшення під впливом естрадіолу функціонального стану ЦНС тварин із купризоніндукованою патологією є важливим підвищення виживаності нейронів [3], пригнічення активності клітин мікроглії [20], а також встановлене нами істотне зменшення числа/активності макрофагів головного мозку.

Згідно з нашими результатами, зміни числа мікроглії та макрофагів є загальним ефектом тироксину і естрадіолу у мишей із купризоною моделлю демієлінізації. При цьому слід відмітити відсутність зменшення кількості Т-лімфоцитів у головному мозку, хоча відомо щодо взаємодії НСК та Т-лімфоцитів у цьому органі, та імуномодуючий вплив тироксину і естрадіолу у тварин із ЕАЕ [21]. Не виключено, що для дії тироксину і естрадіолу на Т-лімфоцити може мати значення їх доза. Крім того, Т-

лімфоцити можуть змінюватися під впливом інших гормонів. Дійсно, нами встановлено, що після введення мишам із купризоною моделлю демієлінізації гормону мелатоніну зростання рухової, емоційної і дослідницької активності спостерігалось на тлі зниження в головному мозку не тільки числа/активності макрофагів, але й Т-лімфоцитів [16].

Таким чином, у мишей із купризоною моделлю демієлінізації зниження рухової, емоційної та дослідницької активності збігається зі зростанням у головному мозку числа nestin⁺-клітин, клітин мікроглії/макрофагів і Т-лімфоцитів. Тироксин і естрадіол *in vivo* поліпшують пригнічений нейротоксином купризоною функціональний стан ЦНС, що пов'язано зі змінами кількості nestin⁺-клітин, а також числа/активності клітин мікроглії/макрофагів. Естрадіол виявився більш ефективним щодо змін показників поведінки і активності макрофагів. Тироксин і естрадіол можна вважати перспективними засобами патогенетичної терапії демієлінізуючої патології, яка супроводжується порушеннями функціонування ЦНС. Купризонова модель демієлінізації може бути важливим інструментом для вивчення шляхів впливу різних гормонів із нейропротекторним/ремієлінізуючим ефектом при цій патології.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**И.Ф. Лабунец, А.Е. Родниченко,
Т.Н. Пантелеймонова**

ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА И ЭСТРАДИОЛА НА ПОВЕДЕНИЕ, НЕЙРАЛЬНЫЕ СТЕЛОВЫЕ И ИММУННЫЕ КЛЕТКИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ С КУПРИЗОНОЙ МОДЕЛЮ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ

У молодых мышей линии 129/Sv, которые получали нейротоксин купризон и гормоны L-тироксин или β -эстрадиол,

исследовали связь изменений показателей поведения и числа нейральных стволовых клеток, Т-лимфоцитов, клеток микроглии/макрофагов в головном мозгу, оцененных по маркерам nestin, CD3, Mac1 соответственно, а также числа фагоцитирующих латекс макрофагов. Ежедневно с пищей давали купризон в течение 3 нед, тироксин или эстрадиол – с 8-го дня купризоновой диеты. Под влиянием купризона существенно уменьшалась двигательная, эмоциональная и исследовательская активности. Изменения показателей поведения совпадали с увеличением в головном мозгу числа nestin⁺-, CD3⁺- и Mac1⁺-клеток и активных макрофагов (в 1,6; 2,3; 1,5 и 1,2 раза соответственно) относительно значений у интактных животных. У мышей, которым вводили тироксин, двигательная активность повышалась в 1,3 раза, но была меньше, чем у интактных животных. Количество nestin⁺-, Mac1⁺-клеток и активных макрофагов уменьшалось до значений интактной группы. После введения эстрадиола двигательная и эмоциональная активность повышалась соответственно в 1,4 и 2,5 раза относительно значений в группе животных, которые употребляли купризон. Число nestin⁺-клеток было выше у мышей, которые получали эстрадиол, чем у животных без него, тогда как число активных макрофагов уменьшалось и не отличалось от значений интактной группы. Таким образом, у мышей с купризоновой моделью демиелинизации положительный эффект тироксина и эстрадиола на функционирование ЦНС реализуется через изменение в головном мозгу числа nestin⁺-клеток и факторов патологии.

Ключевые слова: купризон; тироксин; эстрадиол; поведение; нейральные стволовые клетки; макрофаги и Т-лимфоциты головного мозга.

**I.F. Labunets, A.E. Rodnichenko,
T.M. Panteleymonova**

THE EFFECT OF THYROXINE AND ESTRADIOL ON THE BEHAVIOR, NEURAL STEM AND IMMUNE CELLS OF THE MOUSE BRAIN WITH A CUPRIZONE DEMYELINATION MODEL

In young 129/Sv mice receiving neurotoxin cuprizone and thyroxin or estradiol we investigated the relationship between changes in behavioral indices and the number of neural stem cells, T-lymphocytes, microglia/macrophage cells in the brain assessed by nestin, CD3, Mac1 markers, as well as the number of latex phagocytic macrophages. Cuprizone was given with food daily for 3 weeks; L-thyroxin or β-estradiol were administered from the 8th day of the cuprizone diet, daily. It is shown that cuprizone significantly reduced motor, emotional and exploratory activities. Changes in behavioral indices coincided with an increase in the number of nestin⁺-, CD3⁺- and Mac1⁺-cells in the brain and active macrophages (1.6, 2.3, 1.5 and 1.2 times, respectively) comparing to the intact mice. In the thyroxin-treated mice the locomotor activity increased by 1.3 times, but it was lower comparing to the intact animals.

Under the influence of thyroxin the number of nestin⁺-, Mac1⁺-cells and active macrophages decreased to the values of the intact group. After estradiol administration the locomotor and emotional activities increased 1.4 and 2.5 times, respectively, comparing to the cuprizone group. The number of nestin⁺-cells was higher in the group with estradiol than in the mice without it, while the number of active macrophages decreased and did not differ from the values of the intact group. Thus, in mice with the cuprizone demyelination model, the positive effect of thyroxin and estradiol on the CNS functioning was realized through the changes in the number of brain nestin⁺- cells and the factors of the pathology.

Key words: cuprizone; thyroxin; estradiol; behavioral indices; neural stem cells; macrophages and T-lymphocytes, brain.

*State Institute of Genetic and Regenerative Medicine,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv,
e-mail: irina_labunets@ukr.net*

REFERENCES

1. Mishchenko TS, Shulga OD, Bobryk NV, Shulga LA. Multiple Sclerosis: Global Perspectives. *Ukr Med Chasopis-Ukr Med J.* 2014;101(3):84-7. [Ukrainian].
2. Rybachuk O, Pivneva T. Contribution of neural stem cells to regeneration of the central nervous system. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2014;5(1):83-96.
3. El-Etr M., Ghoumari A., Sitruk-Ware R., Schumacher M. Hormonal influences in multiple sclerosis: New therapeutic benefits for steroids. *Maturitas.* 2011;68(1): 47-51.
4. Heidher RM, Emerson MR, Le Vine SM. Metabolic pathways as possible therapeutic targets for progressive multiple sclerosis. *Neural Regen Res.* 2017;12(8):1262-67.
5. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *J Neurobiol.* 2014;47:485-505.
6. Gudi V, Gingele S, Skripuletz Th, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci.* 2014;8 (Article 73): 24.
7. Labunets I. F. Possibilities and prospects of the application of the in vivo and in vitro toxic cuprizone model for demyelination in experimental and clinical neurology (literature review and own research results). *Ukr Neurol J.* 2018;2:63-8. [Ukrainian].
8. Silvestroff L, Bartucci S, Pasquini J, Franco P. Cuprizone-induced demyelination in the rat cerebral cortex and thyroid hormone effects on cortical remyelination. *Exp Neurol.* 2012;235(1):357-67.
9. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol.* 2009;118(6):723-36.
10. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990; 60(4): 585-95.

11. Labunets IF, Melnyk NO, Rodnichenko AE, Rymar SE, Utko NA. Cuprizone-induced disorders of central nervous system neurons, behavioral reactions, brain activity of macrophages and antioxidant enzymes in the mice of different ages: Role of leukemia inhibitory factor in their improvement. *J Aging Geriat Med.* 2017;1(2):1-8.
12. Amikishieva AV. Behavioral phenotyping: up-to date methods and equipment. *Vestnik VOGiS.* 2009;13(3): 529-42. [Russian].
13. Zhang M, Zhan XL, Mazi Y, Chen XS, Cai Qi Y, Yao Zh X. Thyroid hormone alleviates demyelination induced by cuprizone through its role in remyelination during the remission period. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 240:1183-96.
14. Calza L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *PNAS.* 2002;99(5):3258-63.
15. Gothie JD, Sebillot A, Luongo G, Legendre M, Nguyen Van C, La Blay K. et al. Adult neural stem cell fate is determined by thyroid hormone activation of mitochondrial metabolism. *Mol. Metabolism.* 2017;6:1551-61.
16. Labunets I, Rodnichenko A, Melnyk N, Utko N. Neuroprotective effect of melatonin in mice with toxic cuprizone model of demyelination and possible ways of its realization. *Cell and Organ Transplantation.* 2018;6(2):145-51.
17. Mancini A, Di Segni ChDi, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E. et al. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation. *Mediators Inflammation.* 2016; Article ID 6757154, 12.
18. Okada M, Makino A, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa Sh, Furukawa Y. Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. *Int J Mol Sci.* 2010;11:4114-23.
19. Jiang F, Frederick TJ, Wood TL. IGF-1 synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Dev Biol.* 2001;232:414-23.
20. Taylor LC, Puranam K, Gilmore W, Ting J.P-Y, Matsushima GK. 17- β estradiol protects male mice from cuprizone-induced demyelination and oligodendrocyte loss. *Neurobiol Dis.* 2010;39(2):127-37.
21. Liubich LD, Lisyany ML. Immunobiological properties of neurogenic cells of the fetal brain. Immune responses to neurogenic stem cells in vitro and in vivo. *Fiziol Zh.* 2018;64(1):103-17. [Ukrainian].

Матеріал надійшов до редакції 25.06.2019.