



Л. Д. ПІЧКУР¹, С. А. ВЕРБОВСЬКА¹, В. В. ВАСЛОВИЧ¹,
С. Т. Акінола¹, О. Г. ДЕРЯБІНА², Я. О. ПОХОЛЕНКО^{2,3},
О. К. ТОПОРОВА^{2,3}, Н. С. ШУВАЛОВА², В. А. КОРДЮМ^{2,3}

¹ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ

²Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіну-10 на перебіг експериментального алергійного енцефаломієліту

Мета — оцінити вплив трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пуповини людини та введення рекомбінантного інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) людини на перебіг експериментального алергійного енцефаломієліту в щурів.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 50 білих щурах-самцях з масою тіла 210—230 г, віком 2—3 міс. Рецидивний перебіг ЕАЕ отримували шляхом введення у подушечки задніх лапок ад'юванта Фрейнда. Тварин розподілили на чотири групи з різною схемою лікування МСК та ІЛ-10. Ступінь тяжкості клінічного стану оцінювали в балах.

Результати. У тварин всіх експериментальних груп виявлено середню тяжкість стану (1,50—2,07 бала) на піку захворюваності (18-та—22-га доба) і хронічний ремісивний перебіг захворювання. У групі порівняння (без лікування) пік клінічних виявів спостерігали на 22-гу доба. Після трансплантації ксеногенних МСК на 17-ту доба від індукції ЕАЕ (група 2) стан тварин погіршувався статистично незначущо. Пік клінічних виявів ЕАЕ спостерігали на 20-ту доба, потім відбувався поступовий регрес клініки ЕАЕ з повним клінічним одужанням на 32-гу доба. Після внутрішньовенного введення ІЛ-10 (група 3) зафіксували незначне погіршення стану щурів, але після субокулярної введення ІЛ-10 на 17-ту доба від початку експерименту протягом декількох днів тяжкість стану зменшувалася, і повне клінічне одужання наставало на 31-шу—32-гу доба. Перебіг ЕАЕ до піку клінічних виявів у групі 4 (двохетапне лікування ІЛ-10 та МСК) був подібним до такого у групі 3, але після 17-ї доби, коли тваринам групи 4 субокулярно було введено ІЛ-10 та МСК, тяжкість перебігу ЕАЕ значно збільшилася у перші 2 доби. Одужання тварин у групі 4 відбувалося швидше, але статистично незначущо порівняно з групами 2 та 3.

Висновки. Застосування протизапального ІЛ-10 і МСК у різних комбінаціях сприяє повному клінічному одужанню тварин до 32-ї доби експерименту. Порівняння поліноміальних регресій засвідчує більшу ефективність застосування на 10-ту доба внутрішньовенно ІЛ-10, а на 17-ту доба — МСК та ІЛ-10.

Ключові слова: експериментальний алергійний енцефаломієліт, мезенхімальні стовбурові клітини, інтерлейкін-10, ксенотрансплантація.

Лікування запально-дегенеративних захворювань центральної нервової системи — актуальна медична проблема. Одним із шляхів вирі-

шення цієї проблеми є впровадження в практику методів клітинної терапії. Застосування стовбурових клітин — новий напрям у лікуванні низки захворювань. Стовбурові клітини виявлено у багатьох тканинах [7]. Останнім часом найбільшу увагу приділяють дослідженням властивостей мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) [13, 20].

© Л. Д. Пічкур, С. А. Вербовська, В. В. Васлович, С. Т. Акінола,
О. Г. Дерябіна, Я. О. Похолоенко, О. К. Топорова, Н. С. Шувалова,
В. А. Кордюм, 2018

З трансплантацією МСК, зокрема використанням їх імуносупресивних властивостей та здатністю стимулювати відновні процеси у ЦНС, пов'язаний розвиток одного з напрямів патогенетичної терапії розсіяного склерозу (РС) [8]. Патогенетичні зміни при РС виявляються агресивним деструктивним автоімунітетом, запальні вияви та інтенсивність якого періодично загострюються або прогресують постійно, а також дегенеративними явищами та демієлінізацією аксонів у вогнищах запалення паренхіми ЦНС, неадекватних ступеню дегенерації процесів регенерації в умовах дефіциту трофічних чинників та мієлінувальних клітин [6]. Стратегія використання МСК при цьому захворюванні ґрунтується на можливості забезпечення ними протизапальної дії, супресії деструктивного автоімунітету та створення сприятливих умов для поновлення мієліноутворення у ЦНС. Вивчення імунітопатогенезу та розробка специфічної терапії РС вже багато років провідними дослідниками цієї проблеми проводяться на його моделі — експериментальному алергійному енцефаломієліті (ЕАЕ) [23]. ЕАЕ має патоморфологічні особливості й патогенетичні механізми, подібні до таких при РС, а тому є загальноприйнятною та найадекватнішою імунітологічною моделлю для вивчення патогенезу та розробки нових підходів до лікування цієї патології ЦНС. Останнім часом у багатьох роботах продемонстровано вплив МСК на клінічний розвиток ЕАЕ. Показано, що внутрішньовенне введення МСК супресує клінічні вияви ЕАЕ, пригнічує рівень запалення, зменшує демієлінізацію та має протекторний вплив на аксони [18]. Іншими авторами [24] виявлено, що введення МСК у період з 20-го до 22-го дня після індукції ЕАЕ знижує клінічні вияви захворювання, регулює вміст імунітокомпетентних клітин, продукцію мРНК Foxp3, TGF- β_1 та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) у спленоцитах, лімфовузлах і тимусі тварин з моделюваним ЕАЕ. Внутрішньовенне введення МСК людини C57BL/6 мишам з індукованим ЕАЕ супресує клінічні вияви ЕАЕ та зменшує демієлінізацію [16]. Результати оцінки здатності МСК жирової тканини інтактних щурів та щурів з вираженими клінічними виявами ЕАЕ та супернатантів клітинних культур пригнічувати мітоген- та мієлініндуковану проліферацію спленоцитів *in vitro* свідчать про те, що 1—4 пасажи МСК, отриманих з жирової тканини здорових щурів та щурів з ЕАЕ, інгібували як мітоген-, так і мієлініндуковану проліферацію спленоцитів здорових щурів при спільному культивуванні при співвідношенні МСК до спленоцитів 1 : 10. Супернатанти культур МСК жирової тканини щурів не виявляли інгібувальну активність на рівні всіх пасажів, які досліджували [16].

Внутрішньовенне введення МСК жирової тканини до появи клінічних виявів захворювання значно полегшує перебіг ЕАЕ [14]. Імунітодіяція внаслідок введення МСК сприяє зменшенню запального процесу в спинному мозку та демієліні-

зації. Морфологічно це виявляється зменшенням загибелі аксонів та збільшенням кількості ендогенних попередників олігодендроцитів у місцях демієлінізації ЦНС. Показано, що МСК після внутрішньовенного введення мігрують переважно у лімфоїдні органи, а частина цих клітин чи їх нащадків — до ЦНС. Трансплантовані клітини стимулюють виділення Т-лімфоцитами цитокінів. Таким чином, припускають декілька механізмів впливу МСК жирової тканини на розвиток ЕАЕ [4]: по-перше, пригнічення автоімунної реакції на ранніх стадіях захворювання; по-друге, стимуляція нейрогенезу за участі ендогенних попередників у тварин, хворих на ЕАЕ.

Отже, у роботах, проведених останніми роками, показано, що МСК людини та щурів стимулюють олігодендрогенез і знижують запальну інфільтрацію, демієлінізацію та загибель аксонів у ЦНС при ЕАЕ за рахунок пригнічення автореактивної Т-клітинної відповіді. Акумуляція МСК у тканині ЦНС та лімфоїдних органах щурів з ЕАЕ зменшує клінічні вияви захворювання та модулює функції Т-клітин: зменшує секрецію прозапальних цитокінів Th1- і Th17-клітинами (інтерферон- γ та ІЛ-17), збільшує кількість Th2-клітин і Т-регуляторних клітин та секрецію цими клітинами протизапальних цитокінів, збільшує кількість Th1- і Th17-клітин та кількість олігодендроцитів у ЦНС при ЕАЕ.

Наведені дані свідчать про експериментальну розробку механізмів впливу та можливості використання МСК при нейродегенеративній патології ЦНС.

Мета роботи — оцінити вплив трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини та введення рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини на перебіг експериментального алергійного енцефаломієліту в щурів.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на 50 статевозрілих білих безпородних щурах-самцях з виводку віварію ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А. П. Ромоданова НАМН України» з масою тіла 210—230 г, віком 2—3 міс. Тварин утримували із забезпеченням вільного доступу до їжі та води. Всі процедури виконували відповідно до міжнародних правил і норм біоетики, зокрема European Communities Council Directives 86/609/ ЕЕС від 24.11.1986 р. «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і Закону України № 3447—IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.20.2006 р. [2, 3].

Для моделювання ЕАЕ використовували повний ад'ювант Фрейнда (Sigma, США), який містить 4 мг мікобактерій туберкульозу в 1 мл ад'юванта. При цьому керувалися наведеними у літературі рекомендаціями [1, 12]. Це дало змогу отримати хронічний рецидивний перебіг ЕАЕ се-

реднього ступеня тяжкості [12, 23]. Саме хронічно рецидивна форма ЕАЕ дає змогу детальніше вивчити вплив різних чинників на перебіг демієлінізуювального процесу та уникнути високої летальності експериментальних тварин, яка при гострому ЕАЕ становить 30—60 % [23].

Тварин з модельованим ЕАЕ розподілили на чотири групи (табл. 1), яким з лікувальною метою внутрішньовенно або субокципітально вводили у різних поєднаннях ІЛ-10 та МСК Вартонових драглів пуповини людини. При лікуванні МСК кожній тварині вводили $1 \cdot 10^6$ клітин 2-го пасажу ксеногенних МСК у 100 мкл фізіологічного розчину. При лікуванні ІЛ-10 кожній тварині вводили 1 мкг рекомбінантного білка (ІЛ-10) у фосфатному буфері загальним об'ємом 100 мкл. Щурам четвертої групи ІЛ-10 додавали у концентрації 1 мкг/мл до $1 \cdot 10^6$ МСК безпосередньо перед їх введенням субокципітально, об'єм суміші — 100 мкл.

Для внутрішньовенного введення ІЛ-10 на 11-ту добу після індукції ЕАЕ тварину розташовували у фіксаторі, тильну поверхню основи хвоста обробляли толуолом, що спричиняло набряк поверхневих вен, який суттєво полегшує внутрішньовенне введення суспензії.

Для субокципітального введення суспензії на 17-ту добу після індукції ЕАЕ щурів наркотизували (початкова доза 2 % розчину тіопенталу становила 0,5 мл внутрішньочеревно з поступовим титруванням по 0,1 мл). Задню поверхню шиї та потилицю вистригали ножицями та тричі обробляли спиртовим розчином йоду. В положенні максимального згинання шиї пунктували велику потиличну цистерну і за допомогою інсулінового шприца вводили 0,1 мл суспензії МСК ($1 \cdot 10^6$ нативних клітин).

Клінічні спостереження за тваринами проводили щоденно протягом 35 діб. У кожній тварини визначали ступінь тяжкості з урахуванням зовнішніх ознак та клінічного стану за такими ознаками: м'язовий тонус кінцівок, тонус хвоста, стан сфінктерів, наявність парезів та паралічів, артрити, трофічні зміни на кінцівках. Ступінь тяжкості оцінювали в балах, як описано [9]. У подальшому тварин обстежували двічі на тиждень до 65-ї доби.

Отримання ІЛ-10 і МСК з Вартонових драглів пуповини людини, визначення їх проліферативної активності, життєздатності і вивчення фенотипових характеристик проводили співробітники Інсти-

туту генетичної та регенеративної медицини НАМН України та Інституту молекулярної біології та генетики НАН України відповідно до описаного раніше протоколу [13].

Для статистичної обробки отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних перевіряли за критерієм Шапіро—Вілка. Для міжгрупового порівняння середніх значень використовували непараметричний U- критерій Манна—Уїтні. Для порівняння значень одного й того самого показника в різні проміжки часу застосовували непараметричний критерій Вілкоксона. Для деталізації відновного процесу проводили аналіз динамічних рядів. Щоденний абсолютний приріст (спад) стану піддослідних тварин у балах визначали за формулою:

$$\text{Абс. приріст} = x_n - x_{n-1},$$

де n — доба спостереження.

Прискорення приросту (спаду) обчислювали за формулою:

$$\begin{aligned} \text{Прискорення приросту (спаду)} &= \\ &= (\text{Абс. приріст}_n : x_{n-1}) \cdot 100 \%. \end{aligned}$$

Розрахунок абсолютного приросту і прискорення приросту проведено за допомогою програмного пакета MS Excel 2007.

Усереднені величини наведено у вигляді $M \pm m$, де M — середнє арифметичне значення величини, а m — стандартна похибка середнього арифметичного значення.

Для більшої наочності динаміки клінічного стану експериментальних тварин на графіках за допомогою стандартного програмного пакета MS Excel 2007 додатково будували тренди апроксимації часових послідовностей. Використовували поліноміальний алгоритм з мірою полінома — 6.

Статистичний аналіз виконували з використанням пакета програм MS Excel 2003 [5] і Statistica 6.1 [10], графічне представлення результатів — з використанням пакета програм MS Excel 2003 [5].

Результати та обговорення

Дослідження перебігу ЕАЕ засвідчило, що інкубаційний період до перших виявів ЕАЕ становив 10 діб. Вважається, що при ЕАЕ спостерігається спонтанне видужання тварин. Така особливість характерна для легкого перебігу ЕАЕ, при хронічному ремітивному перебігу ЕАЕ у групі спостереження спонтанного одужання не відбувалося.

Т а б л и ц я 1

Розподіл тварин в експерименті

Група	Лікування
1 (n = 8)	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2 (n =14)	Лікування ЕАЕ МСК (у кількості $1 \cdot 10^6$ клітин у 100 мкл фізіологічного розчину) субокципітально на 17-ту добу
3 (n =14)	Лікування ЕАЕ ІЛ-10 (у кількості 1 мкг/мл) внутрішньовенно на 10-ту добу, ІЛ-10 субокципітально на 17-ту добу
4 (n =14)	Лікування ЕАЕ ІЛ-10 внутрішньовенно на 10-ту добу, ІЛ-10 та МСК субокципітально на 17-ту добу

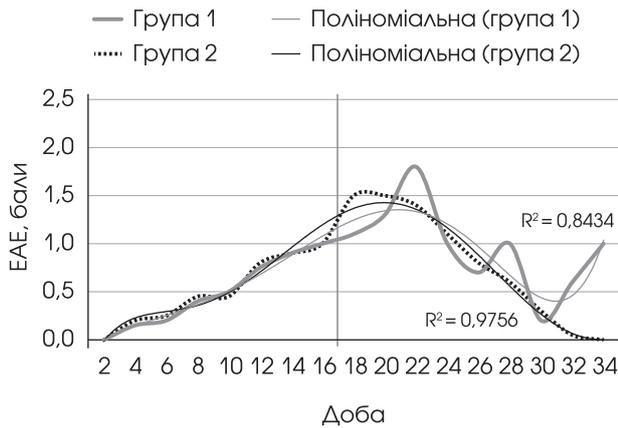


Рис. 1. Динаміка клінічного стану щурів після субоципітального введення мезенхімальних стовбурових клітин та щурів групи порівняння

У тварин усіх експериментальних груп виявлено середню тяжкість стану (1,50—2,07 бала) на піку захворюваності (18-та—22-га доба) і хронічний ремісивний перебіг захворювання.

Дані щодо клінічного стану щурів наведено на рис. 1 та в табл. 2.

Уже через 7 діб після введення клітин візуально відзначено прискорення поновлення м'язового тону кінцівок експериментальних тварин, поліпшення рухів та сили м'язів кінцівок і хвоста, яке відбувалося раніше та було швидшим, ніж у щурів групи порівняння. На 18-ту добу від індукції ЕАЕ стан статистично незначуще (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,2$) погіршувався (див. табл. 2). У цій групі тварин пік клінічних виявів ЕАЕ зміщувався на 20-ту добу. Далі відбувався поступовий статистично значущий (критерій Вілкоксона; $p = 0,001$) регрес клініки ЕАЕ з повним клінічним одужанням на 32-гу добу.

Отже, у щурів з ЕАЕ субоципітальне введення ксеногенних МСК супроводжувалося поступовим поліпшенням стану та прискоренням одужання, з тимчасовим статистично незначущим погіршенням стану тварин щодо групи порівняння безпосередньо після введення клітин. При аналізі динамічних рядів відзначено рівномірний помірний спад з 22-ї до 32-ї доби (−83,3%).

Ми також дослідили вплив на клінічний перебіг ЕАЕ внутрішньовенного уведення ІЛ-10 (на 10-ту добу після індукції) з наступним введенням субоципітально майже на піку захворювання (рис. 2).

Таблиця 2

Аналіз динамічних рядів клінічного стану щурів з ЕАЕ після введення ІЛ-10 і мезенхімальних стовбурових клітин у різних комбінаціях

Доба	ЕАЕ			ЕАЕ + МСК			ЕАЕ + ІЛ-10			ЕАЕ + ІЛ-10 + МСК		
	Бали	Абсолютний приріст	Прискорення, %	Бали	Абсолютний приріст	Прискорення, %	Бали	Абсолютний приріст	Прискорення, %	Бали	Абсолютний приріст	Прискорення, %
2	0	Немає	Немає	0	Немає	Немає	0	Немає	Немає	0	Немає	Немає
4	0,15	0,1		0,2	0,2		0,2	0,2		0,2	0,2	
6	0,2	0,1	33,3	0,25	0,0	25,0	0,25	0	25	0,25	0	25
8	0,4	0,2	100,0	0,45	0,2	80,0	0,4	0,2	60	0,4	0,2	60
10	0,5	0,1	25,0	0,45	0,0	0,0	0,55	0,2	37,5	0,55	0,2	37,5
12	0,75	0,3	50,0	0,8	0,4	77,8	0,9	0,3	63,6	0,9	0,3	63,6
14	0,9	0,2	20,0	0,9	0,1	12,5	1,1	0,2	22,2	1,1	0,2	22,2
16	1	0,1	11,1	1	0,1	11,1	1,3	0,2	18,2	1,3	0,2	18,2
18	1,1	0,1	10,0	1,5	0,5	50,0	1,9	0,6	46,2	2,07	0,7	57,7
20	1,3	0,2	18,2	1,5	0,0	0,0	1,9	0	0	1,9	−0,1	−7,3
22	1,8	0,5	38,5	1,4	−0,1	−6,7	1,6	−0,3	−15,8	1,3	−0,6	−31,6
24	1	−0,8	−44,4	1,1	−0,3	−21,4	1,1	−0,5	−31,2	0,8	−0,5	−38,5
26	0,7	−0,3	−30,0	0,8	−0,3	−27,3	0,9	−0,2	−18,2	0,4	−0,4	−50
28	0,2	−0,5	−71,4	0,6	−0,2	−25,0	0,6	−0,3	−33,3	0,2	−0,2	−50
30	0,6	0,4	200,0	0,3	−0,3	−50,0	0,3	−0,3	−50	0,1	−0,1	−50
32	1	0,4	66,7	0,07	−0,3	−83,3	0,07	−0,3	−83,3	0,07	−0,1	−50
34	0	−1	−100,0	0	−0,1	−100,0	0	−0,1	−100,0	0	−0,1	−100,0

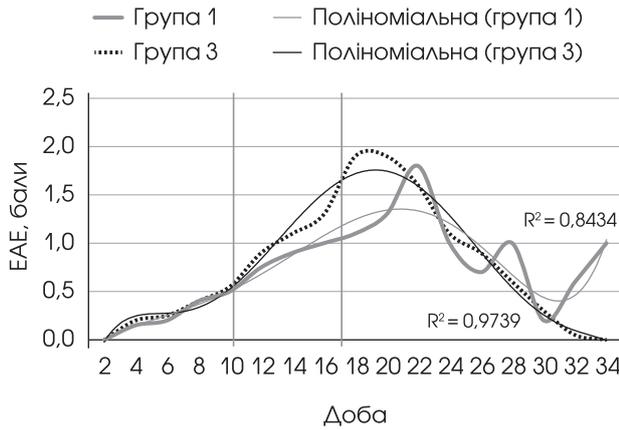


Рис. 2. Динаміка клінічного стану щурів з ЕАЕ під впливом внутрішньовенного (10-та доба) та субоципітального (17-та доба) введення ІЛ-10

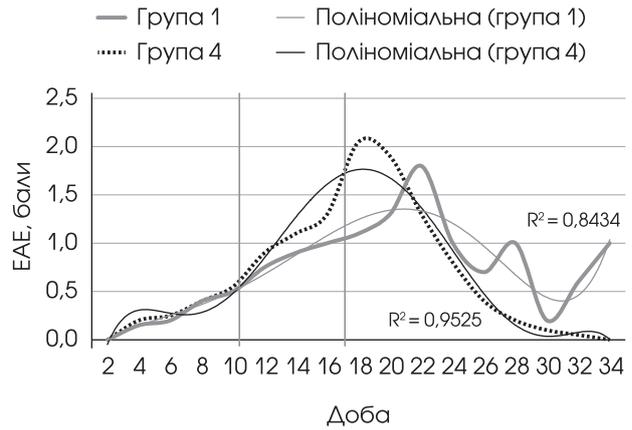


Рис. 3. Динаміка клінічного стану щурів з ЕАЕ під впливом внутрішньовенного введення ІЛ-10 (10-та доба) та субоципітального (17-та доба) введення ІЛ-10 і мезенхімальних стовбурових клітин

Після внутрішньовенного введення ІЛ-10 спостерігали незначне статистично незначуще погіршення стану щурів порівняно з першою групою. Після субоципітального введення ІЛ-10 відразу зафіксували статистично значуще погіршення стану (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,01$). Проте погіршення стану тривало лише декілька діб. На 22-гу добу тяжкість перебігу в третій групі незначущо (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,8$) була меншою за таку в групі порівняння, в якій у цей термін спостерігалися пік клінічних виявів ЕАЕ ($(1,8 \pm 1,3)$ бала). Потім у третій групі виявлено поступовий регрес клініки ЕАЕ до повного клінічного одужання на 32-гу добу. В динаміці відновного процесу (див. табл. 2) відзначено рівномірний помірний спад з 22-ї до 32-ї доби ($-83,3\%$).

Починаючи з 22-ї доби від індукції ЕАЕ, перебіг захворювання у другій та третій групах мав майже однаковий характер. Повне клінічне одужання тварин наставало на 32-гу добу. Спостерігали статистично незначуще (критерій Вілкоксона; $p = 0,06$) погіршення клінічного стану щурів третьої групи після двохетапного введення ІЛ-10, статистично значущий (критерій Вілкоксона; $p = 0,001$ на 32-гу добу щодо 22-ї доби дослідження) регрес клініки ЕАЕ, починаючи з 22-ї доби та одужання на 32-гу добу порівняно з першою групою (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,03$).

ЕАЕ — це модельне автоімунне захворювання ЦНС, при якому патогенетичну роль відіграють антигенспецифічні Th1-лімфоцити. Енцефалітогенними при ЕАЕ є різні білки ЦНС, зокрема основний білок мієліну [11]. Антигенспецифічні Th1-лімфоцити продукуються у відповідь на імунізацію, долають гематоенцефалічний бар'єр, проникають у ЦНС, продукують прозапальні цитокіни, ініціюють автоімунне запалення та руйнують тканину ЦНС. Антигенспецифічні В-лімфоцити продукують автоантитіла різних класів до основного білка мієліну та інших нейроспецифічних білків [11]. Антиті-

ла також можуть спричиняти руйнування мієліну [15]. Дослідження на експериментальних тваринах індукції та існування мікрохимеризму виявило важливу роль CD4, CD25 та CD8 Т-клітин, їх перехресний баланс в імунній відповіді [9, 24]. Тривала толерантність між реципієнтними та донорськими клітинами без фармакологічної супресії може існувати за умов, наприклад, попереднього введення внутрішньовенно CD34⁺ (гемопоетичних) клітин або трансплантації МСК. При цьому реципієнт отримує інтенсивні імуносупресорні агенти до реакції «трансплантат проти хазяїна» [22]. Деякі дослідники трактують зміну імунної відповіді у реципієнтів із мікрохимеризмом, спричиненим донорськими клітинами, як індукцію взаємної імунологічної нереактивності [21]. МСК пригнічують імунні реакції реципієнта [17], при цьому імуносупресивна дія МСК забезпечується клітинно-контактною взаємодією та продукцією розчинних молекул (цитокінів) [19].

Дослідили вплив ІЛ-10, введеного внутрішньовенно на 10-ту добу після індукції ЕАЕ, та субоципітального введення ІЛ-10 та МСК (пік захворювання) на перебіг ЕАЕ (рис. 3, див. табл. 2).

Перебіг ЕАЕ у четвертій групі до піку клінічних виявів подібний до такого у третій групі, але після 17-ї доби у четвертій групі тяжкість перебігу ЕАЕ статистично значущо збільшувалася у перші дві доби після трансплантації (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,004$), що, ймовірно, можна пояснити великою кількістю клітин, які потрапили у ліквор потиличної цистерни щурів, та впливом наркозу. Одужання тварин відбувалося швидше порівняно з третьою групою. На 26-ту добу клінічний стан був гіршим, проте статистично незначуще за рахунок значного розкиду даних порівняно з третьою (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,08$) і другою (U-критерій Манна—Уїтні; $p = 0,2$) групою.

У нашому дослідженні простежується сучасна тенденція у клітинній терапії — більша ефектив-

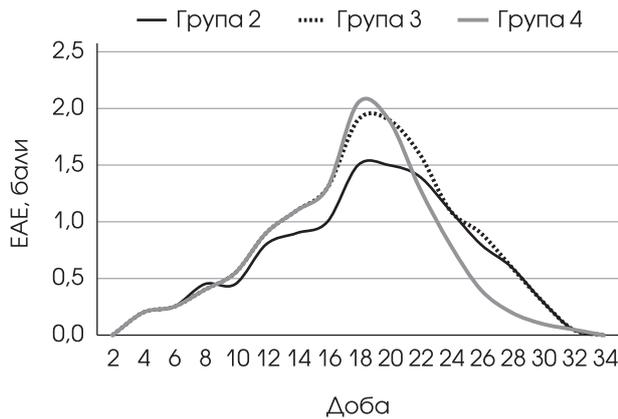


Рис. 4. Порівняння динаміки клінічного стану щурів

ність комбінованого застосування засобів із різним механізмом дії, наприклад, стовбурових клітин у комбінації з цитокінами. Так, лікування ЕАЕ у щурів четвертої групи супроводжувалося тимчасовим статистично значущим погіршенням стану тварин порівняно з другою групою (U-критерій Манна—Уїтні; $p=0,02$) та статистично незначущим порівняно з третьою групою. Слід урахувати, що тварин під час кожного введення клітин чи ІЛ наркотизували, що на тлі клінічних виявів ЕАЕ також призводило до погіршення клінічного стану. Регрес симптоматики ЕАЕ у четвертій групі статистично незначуще був швидшим, ніж у другій та третій групах.

Таким чином, перебіг ЕАЕ у групах, які отримали лікування, як клінічно, так і статистично відрізнявся. Величина вірогідності апроксимації розподілу R^2 , яка в експериментальних групах варіює від 0,95 до 0,98, а в групі порівняння становить 0,84, вказує на те, що математична модель досліджуваного явища підібрана з високою точністю.

Також, для унаочнення особливостей перебігу ЕАЕ у різних групах проведено міжгруповий аналіз динамічних рядів експериментальних груп тварин. Порівняння динамічних рядів другої і третьої груп виявило, що в цілому обидві лінії відображували позитивну динаміку відновного процесу з повним клінічним одужанням експериментальних тварин до 32-ї доби. Так, ці групи майже не відрізнялися за показниками клінічного стану в терміни 24-та–28-ма доба, а їх динамічні ряди характеризувалися зниженням ступеня тяжкості стану піддослідних тварин у ці терміни (див. табл. 2).

При порівнянні динамічних рядів другої та четвертої груп також виявлено нижчі бали у четвертій

групі порівняно з третьою групою, незважаючи на статистично значуще погіршення стану тварин після субоципітального введення МСК та ІЛ-10 на 18-ту добу. Найбільш показовою була динаміка відновлення у третій та четвертій групах, в яких лікування проводили у два етапи (рис. 4).

Такий результат цілком узгоджується зі швидким одужанням тварин на 29-ту добу в четвертій групі (критерій Вілкоксона; $p=0,0009$ щодо 22-ї доби), проте при міжгруповому порівнянні за U-критерієм Манна—Уїтні в цей термін дослідження результати були статистично незначущими. Так, лінія динамічного ряду візуально характеризується більшим спадом ступеня тяжкості стану піддослідних тварин у терміни 22-га–26-та доба, а прискорення спаду показника ступеня тяжкості на 26-ту добу становило $-50,0\%$ щодо третьої групи з відповідним прискоренням спаду $-33,3\%$ (див. табл. 2), що дає підставу припустити, що у четвертій групі за інших однакових умов з третьою групою внутрішньовенне введення ІЛ-10 на 10-ту добу зменшує запальні явища, запускає імунорегуляторні механізми, тому введення МСК та ІЛ-10 на 17-ту добу відбувається за сприятливих умов для клітинної терапії та підтверджує доцільність комбінованого лікування ІЛ і стовбуровими клітинами.

Висновки

Отримана нами модель відповідає хронічній рецидивній формі експериментального алергічного енцефаломієліту, що дає змогу детально вивчити вплив різних чинників на клінічний перебіг захворювання та уникнути летальності експериментальних тварин.

Застосування протизапального інтерлейкіну-10 і мезенхімальних стовбурових клітин у різних комбінаціях сприяє повному клінічному одужанню тварин до 32-ї доби експерименту на відміну від групи порівняння, де спонтанного клінічного одужання не настає.

Аналіз динамічних рядів засвідчує дещо більшу ефективність лікування у групі тварин, яким на 10-ту добу внутрішньовенно вводили інтерлейкін-10, а на 17-ту добу — мезенхімальні стовбурові клітини та інтерлейкін-10, незважаючи на статистично значуще тимчасове погіршення стану тварин після субоципітального введення мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіну. Такий результат цілком узгоджується зі швидким клінічним регресом симптоматики у тварин цієї групи на 28-му добу.

Конфлікту інтересів немає.

концепція і дизайн дослідження — Л. П., С. В., О. Д., В. К.;

збір матеріалу — Л. П., С. В., С. А., О. Д., Я. П., О. Т., Н. Ш.;

обробка матеріалу — Л. П., С. В., В. В.; статистичне опрацювання даних — В. В., Л. П.;

написання тексту — Л. П., В. В.; редагування тексту — Л. П., С. В., О. Д., О. Т.

Література

1. Давыдова Г. С. Вопросы направленного моделирования аллергического энцефаломиелиита // Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. — Минск: Наука и техника, 1975. — С. 24—33.
2. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986 р.: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи). — Електронний ресурс. — Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/main?find=1&sp=i&user=c393&text=%F2%E2%E0...>
3. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.06 № 3447—IV // Відомості Верховної Ради України. — 2006. — № 27. — С. 990.
4. Зафранская М. М., Нижегородова Д. Б., Колобова М. Ю. и др. Иммуносупрессивный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелиитом при кокультивировании с митоген/миелин-стимулированными спленоцитами // Медицина. — 2010. — Т. 70, № 3. — С. 85—88.
5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич Н. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001.
6. Лисяньий Н. И. Иммунология и иммунотерапия рассеянного склероза. — К.: ВІПОЛ, 2003. — 251 с.
7. Медведєв В. В. Вплив нейротрансплантації різних типів алогенних тканин на відновлення рухової функції після експериментальної травми спинного мозку // Укр. нейрохір. журн. — 2017. — № 1. — С. 11—23.
8. Пічкур Л. Д., Вербовська С. А., Акінола С. Т., Читаєва Г. Є. Основні патогенетичні механізми процесу демієлінізації в центральній нервовій системі та можливості його корекції // Укр. неврол. журн. — 2017. — № 2. — С. 12—19.
9. Пічкур Л. Д., Семенова В. М., Вербовська С. А. та ін. Особливості перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту після трансплантації стовбурових клітин // Укр. нейрохір. журн. — 2017. — № 2. — С. 27—33.
10. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: МедиаСфера, 2002. http://www.studmed.ru/rebrova-oyu-statisticheskiy-analiz-meditsinskih-dannyh_0149fe87d1d.html.
11. Руденко В. А., Бельська Л. М., Гнедкова І. О. та ін. Ксеногенна трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин трансфікованих геном ІЛ-10 як метод клітинної терапії експериментального алергічного енцефаломієліту // Зб. наук. праць співр. НМАПО імені П. Л. Шупика. — К., 2015. — Вип. 24. — С. 323—329.
12. Цимбалюк В. І., Величко О. М., Вербовська С. А. та ін. Вплив мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонового студня пуповини людини та інтерлейкіну-10 на поведінкові реакції щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом // Клітинна та органна трансплантологія. — 2015. — Т. 3, № 1. — С. 40—45.
13. Цимбалюк В. І., Дерябіна О. Г., Шувалова Н. С. та ін. Фенотипові зміни і проліферативний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонового студня пуповини людини в умовах культивування // Укр. нейрохір. журн. — 2015. — № 2. — С. 17—23.
14. Constantin G., Marconi S., Rossi B. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis // Stem. Cells. — 2009. — Vol. 27, N 10. — P. 2624—2635.
15. Djouad F., Plence P., Bony C. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals // Blood. — 2003. — Vol. 102. — P. 3837—3844.
16. Gordon D., Pavlovska G., Uney J. B. et al. Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 2010. — Vol. 69, N 11. — P. 1087—1095.
17. Jorgensen C., Djouad F., Apparailly F., Noël D. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy // Gene Therapy. — 2003. — Vol. 10. — P. 928—931.
18. Kassiss I., Petrou P., Halimi M., Karussis D. Mesenchymal Stem Cells (MSC) derived from mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors // Immunol. Lett. — 2013. — Vol. 154, N 1—2. — P. 70—76.
19. Klose J., Schmidt N. O., Melms A. et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells // J. Neuroinflammation. — 2013. — Vol. 10. — P. 117.
20. Kovalchuk M. V., Deryabina O. G., Pichkur L. D. et al. Distribution of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly in the central nervous systems of the EAE rats // Biopolym. Cell. — 2015. — Vol. 31, N 5. — P. 371—378.
21. Kratchmarova I., Blagoev B., Haack-Sorensen M. et al. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation // Science. — 2005. — Vol. 308. — P. 1472—1477.
22. Petite H., Viateau V., Bensaïd W. et al. Tissue-engineered bone regeneration // Nat. Biotechnol. — 2000. — Vol. 18, N 9. — P. 959—963.
23. Scuteri A., Donzelli E., Rigolio R. et al. Therapeutic Administration of mesenchymal stem cells abrogates the relapse phase in chronic relapsing-remitting EAE // J. Stem Cell Res Ther. — 2015. — Vol. 5. — P. 262.
24. Zhu J., Zhang J., Li Q. et al. Transplanting of mesenchymal stem cells may affect proliferation and function of CD4 (+)T-cells in experimental autoimmune encephalomyelitis // Exp. Clin. Transplant. — 2012. — Vol. 10, N 5. — P. 492—500.

Л. Д. ПИЧКУР¹, С. А. ВЕРБОВСКАЯ¹, В. В. ВАСЛОВИЧ¹, С. Т. АКИНОЛА¹,
 Е. Г. ДЕРЯБИНА², Я. О. ПОХОЛЕНКО^{2,3}, О. К. ТОПОРОВА^{2,3},
 Н. С. ШУВАЛОВА², В. А. КОРДЮМ^{2,3}

¹ГУ «Институт нейрохирургии имени акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины», Киев

²Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Влияние ксеногенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и интерлейкина-10 на течение экспериментального аллергического энцефаломиелиита

Цель — оценить влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пуповины человека и введения рекомбинантного интерлейкина-10 (ИЛ-10) человека на течение экспериментального аллергического энцефаломиелиита (ЭАЭ) у крыс.

Материалы и методы. Исследования проведены на 50 половозрелых белых крысах-самках с массой тела 210—230 г в возрасте 2—3 мес. Рецидивирующее течение ЭАЭ получали путем введения в подушечки задних лап адьюванта Фрейнда. Животных распределили на четыре группы с разной схемой лечения МСК и ИЛ-10. Степень тяжести клинического состояния оценивали в баллах.

Результати. У живих тварин всіх експериментальних груп виявили середню тяжкість стану (1,50—2,07 бала) на піку захворювання (18—22-е сутки). В групі порівняння (без лікування) пік клінічних проявів спостерігали на 22-е сутки. У крыс групи 2 після трансплантації ксеногенних МСК на 17-е сутки від індукції ЕАЕ статистично незначимо погіршилося стан. Пік клінічних проявів ЕАЕ приходився на 20-е сутки, потім спостерігали поступовий регрес клініки ЕАЕ з повним клінічним одужанням на 32-е сутки. Після внутрішньовенного введення ІЛ-10 (група 3) зафіксовано незначительне погіршення стану крыс, але після субоципітального введення ІЛ-10 на 17-е сутки від початку експерименту на протязі декількох днів тяжкість стану зменшувалася, повне клінічне одужання наставало на 31—32-е сутки. Течення ЕАЕ до піку клінічних проявів в групі 4, яка отримувала двохетапне лікування ІЛ-10 і МСК, нагадувало таке в групі 3, але після 17-х суток, коли тваринам в групі 4 субоципітально вводили ІЛ-10 і МСК, тяжкість течення ЕАЕ значимо зростала в перші 2 сутки. Одужання тварин групи 4 відбувалося статистично незначимо швидше порівняно з групами 2 і 3.

Висновки. Застосування протизапального ІЛ-10 і МСК в різних комбінаціях сприяє повному клінічному одужанню тварин до 3-х суток експерименту. Порівняння поліноміальних регресій демонструє більшу ефективність застосування на 10-е сутки внутрішньовенно ІЛ-10, а на 17-е сутки — МСК і ІЛ-10.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, мезенхімальні стовлові клітини, інтерлейкін-10, ксенотрансплантація.

L. D. PICHKUR¹, S. A. VERBOVSKA¹, V. V. VASLOVICH¹, S. T. AKINOLA¹,
O. G. DERIABINA², Ya. O. POKHOLENKO^{2,3}, O. K. TOPOROVA^{2,3},
N. S. SHUVALOVA², V. A. KORDIUM^{2,3}

¹ SI «Institute of Neurosurgery named after acad. A. P. Romodanov of NAMS of Ukraine», Kyiv

² Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine, Kyiv

³ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

Influence of transplantation of mesenchymal stem cells and interleukin-10 on experimental allergic encephalomyelitis course

Objective — to study the influence of the umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSC) and anti-inflammatory IL-10 injection on experimental allergic encephalomyelitis (EAE) course in rats.

Methods and subjects. 50 white male rats with mean body weight 210 g were enrolled into the study. The recurrent course of the EAE was induced via injection of Freund's adjuvant into the hind limb on the plantar surface. All animals were distributed into 4 groups depending on the MSC and IL-10 treatment scheme. The severity of the EAE was defined via specific severity scale (sum of points). Statistical data was proceeded through Microsoft Excel.

Results. The severity of chronic recurrent EAE during its acme among all groups of animals was the moderate one (1.50—2.07 points). In group 1 (control group) we observed the acme of EAE on 22nd day. In group 2 we observed the insignificant worsening of the state of rats (with no statistical reliability) after the transplantation of MSC on the 17th day of EAE. The EAE acme drifted towards day 20, then we observed step-by-step cease of all clinical signs with complete recovery on 32nd day. The intravenous injection of IL-10 in group 3 caused mild worsening of the state of rats, where in suboccipital injection of IL-10 on the 17th day of EAE caused decrease of EAE severity within couple of days and complete cease of all clinical signs with complete recovery on 31st day. The EAE course before its acme in group 4 (two-stage treatment with IL-10 and MSC) was similar to group 3. The suboccipital injection of IL-10 and MSC on the 17th day of EAE caused dramatic increase of EAE severity during first 2 days. Nevertheless, we observed fastened cease of all clinical signs of EAE in group 4 in comparison to group 2 and 3.

Conclusions. The administration of anti-inflammatory IL-10 and MSC in their different combinations induced the complete cease of all clinical signs of EAE before 32th day of the experiment. The comparison of polynomial regressions proved higher efficacy of IL-10 intravenous injections on the 10th day and IL-10/MSC on the 17th day of the experiment.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, mesenchymal stem cells, interleukin-10, xenotransplantation.