

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ
ім. акад. А.П. РОМОДАНОВА НАМН УКРАЇНИ»

АКІНОЛА САМУЕЛЬ ТОЛУВАНІ

УДК 616.832-004.2-089:611-013.395-018.1:616-092.9

**ХІРУРГІЧНА КОРЕКЦІЯ ДЕМІЄЛІНІЗУЮЧИХ УШКОДЖЕНЬ
ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.01.05 — нейрохірургія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ — 2019

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Робота виконана в Державній установі «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» та Інституті молекулярної біології і генетики НАН України

Науковий керівник: доктор медичних наук **Пічкур Леонід Дмитрович**, Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», начальник науково-організаційного відділу з групою епідеміології та прогнозування нейрохірургічних захворювань.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **П'ятикоп Володимир Олександрович**, Харківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії;

доктор медичних наук, доцент **Медведєв Володимир Вікторович**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, доцент кафедри нейрохірургії

Захист відбудеться «15» жовтня 2019 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01 в Державній установі «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» за адресою: 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» (04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32).

Автореферат розісланий «13» вересня 2019 р.

Т.в.о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради,
д-р мед. наук, професор

Л.М. Яковенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Демієлінізуючі захворювання та ушкодження центральної нервової системи (ЦНС) є одними з найбільш актуальних розділів медицини. На сьогоднішній день у світі налічується понад 3 млн. хворих тільки на розсіяний склероз (РС) (Kampuraj D., et al., 2016; Абдурахманова Р.Ф. и др., 2016; Marvin M.G., 2012). Захворювання частіше виникає у осіб працездатного віку, має прогресуючий перебіг, спричиняє стійку інвалідизацію та втрату соціальної активності (Шмидт Т.Е., 2014), що обґрунтовує пошук ефективних методів лікування даної патології. Більшість сучасних методів лікування спрямована на профілактику або сповільнення прогресування демієлінізуючих і дегенеративних змін ЦНС, проте залишається невирішеним питання можливостей та умов відновлення ушкоджених структур і функціональних систем ЦНС.

Важливою складовою вирішення цих завдань є експериментальні дослідження з використанням лабораторних тварин.

Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) тварин є моделлю розсіяного склерозу людини, особливо, його аутоімунного компоненту. У морфогенезі ЕАЕ на різних етапах істотно значення має поєднання процесів демієлінізації, запалення, клітинної та аксональної дегенерації.

Певний прогрес у перспективах лікування запально-дегенеративних уражень нервової системи людини пов'язують з розвитком клітинних технологій (Лисяний М.І. та ін., 2015; Shroff G., 2016). Сучасний рівень знань про властивості стовбурових клітин (СК) дозволяє прогнозувати їх широке застосування у лікуванні дегенеративних захворювань ЦНС (Семенова В.М., 2014). При цьому, обов'язковою є відповідність певним умовам: джерела отримання СК повинні бути доступні, відсутність морально-етичного конфлікту, можливість отримання великої кількості клітин за короткий проміжок часу шляхом культивування і збереження при цьому мезенхімального фенотипу, здатністю до трансдиференціювання, хоумінгу і секретувати необхідні біологічно активні речовини (цитокіни та ін.), мати низьку імуногенність (Цимбалюк В.І. та ін.; Лисяний М.І. та ін., 2015; Медведєв В.В., 2017). Цим вимогам у повній мірі відповідають мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) Вартонових драглів пуповини (Changhui Z. et al., 2011; Kovalchuk M.V. et al., 2015). Вони, на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, містять МСК ембріонального походження (є дані про можливість експресії ними ембріональних маркерів Oct4 і Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1) з навіть плюрипотентним стовбуровим потенціалом (Patel A. et al., 2008; Armand K., 2012; Цимбалюк В.І., 2015) та мають дещо відмінний від зрілого імунофенотип, що відкриває додаткові можливості для трансплантації (Taghizadeh R.R. et al., 2011). У численних експериментальних дослідженнях встановлена тропність і міграційна здатність МСК різного походження до вогнища ураження у мозкові (Phinney D.G. et al., 2006; Kovalchuk M.V. et al., 2015). У ряді робіт досліджена здатність диференціювання МСК в олігодендроцити і шванівські клітини (Maslova O.O. et al., 2013; Jeffrey A. et al., 2013). На моделі ушкодження спинного мозку щурів показано поліпшення моторних функцій після внутрішньовенної трансплантації клітин-попередників олігодендроцитів, отриманих із МСК щура (Nakano N., 2013).

Сучасним перспективним напрямком лікування патології ЦНС є також застосування трофічних факторів, клітин, які їх продукують, та клітин-попередників олігодендроцитів для відновлення зруйнованої мієлінової оболонки аксонів (Adami R. et al., 2014; Dulamea A.O. et al., 2017). Стовбурові клітини здатні продукувати ці фактори. Попереднє введення хірургічним шляхом у ліквор протизапальних цитокінів може сприяти виживанню трансплантованих у вогнище запалення МСК, підсилити синтез ними цитокінів, що позитивно вплине на процеси демієлінізації структур ЦНС. Цим питанням присвячені поки що поодинокі дослідження (Barhum Y. et al., 2010; Федулов АС и др., 2016).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках комплексної науково-дослідної роботи ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»: «Дослідити біологічні властивості та визначити відновлювальний потенціал кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини при лікуванні рухових порушень в експерименті» за № державної реєстрації 0116U001030.

Мета роботи: оцінка впливу мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини на перебіг експериментального демієлінізуючого ушкодження центральної нервової системи.

Завдання дослідження

1. Удосконалити модель експериментального алергічного енцефаломієліту з хронічним рецидивуючим перебігом шляхом індукції демієлінізуючого процесу різними дозами ад'юванта Фрейнда (АФ).
2. Визначити властивості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини в умовах культивування.
3. Дослідити можливість виживання трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини у спинному мозку щурів з ЕАЕ.
4. Оцінити вплив мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна-10 (ІЛ-10) на поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле».
5. Дослідити вплив нативних МСК та ІЛ-10 на клінічний перебіг ЕАЕ.
6. Порівняти на ультраструктурному рівні вираженість процесів демієлінізації у спинному мозку щурів з ЕАЕ під дією МСК та ІЛ-10.

Об'єкт дослідження: демієлінізуючі ушкодження центральної нервової системи при модельованому ЕАЕ.

Предмет дослідження: функціональні, структурні кореляції демієлінізації на тлі експериментального алергічного енцефаломієліту і ксенотрансплантації МСК Вартонових драглів пуповини та ІЛ-10.

Методи дослідження: експериментальні методи (індукція запально-демієлінізуючого ураження ЦНС на щурах; дослідження впливу ксенотрансплантації нативних мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини та трансфікованих геном ІЛ-10 на поведінкові реакції, рухову активність експериментальних тварин та клінічний перебіг ЕАЕ (тест «відкрите поле», 5 бальна шкала оцінки клінічного стану тварин). **Експериментально-клітинний:** отримання, культивування, фенотипування та морфологічний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин протягом пасажування *ex vivo*; **молекулярні**

(трансфекція в МСК генів, відповідальних за продукцію протизапального цитокіна ІЛ-10, полімеразно-ланцюгова реакція для виявлення ДНК донорських МСК в тканинах експериментальних тварин після їх субокципітального введення); **морфологічні методи** (світлооптичне та електронно-мікроскопічне дослідження тканини спинного мозку, морфометричні дослідження стану мієлінових оболонок білої речовини спинного мозку з метою вивчення впливу ксеногенних МСК на перебіг модельованого алергічного енцефаломієліту, процеси де- і ремієлінізації); **методи математичного та статистичного аналізу** (визначення статистично значущих відмінностей між експериментальними групами).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертації на підставі проведеного комплексного дослідження в експерименті представлено новий підхід до вирішення актуальної наукової задачі в нейрохірургії – корекції демієлінізуючих ушкоджень ЦНС шляхом застосування мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини.

Виявлено, що удосконалена модель ЕАЕ супроводжується розвитком хронічного рецидивуючого перебігу, приводить до суттєвих структурних змін ЦНС і адаптивної поведінки експериментальних щурів. Модель відтворювана і може застосовуватись для дослідження ефективності різних лікувальних стратегій.

Підтверджено, що при культивуванні МСК Вартонових драглів протягом 2 пасажів зберігають свої біологічні властивості. У подальшому проявляються ознаки деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу.

В роботі поглиблено знання щодо особливостей виживання і міграції (хоумінгу) ксеногенних МСК в організмі експериментальних тварин.

Доведено, що найбільш ефективною схемою корекції порушень адаптивної поведінки щурів з ЕАЕ є внутрішньовенне введення ІЛ-10 на 10 добу експерименту і МСК субокципітально – на 17 добу, що забезпечує їх міграцію поза гематоенцефалічним бар'єром та прискорення відновних процесів у ЦНС.

Встановлено, що ІЛ-10 у поєднанні з трансплантацією ксеногенних МСК сприяють відновленню поведінкових реакцій, рухової активності тварин і гальмують процеси демієлінізації уже в ранні терміни дослідження.

Практичне значення одержаних результатів. Удосконалена модель ЕАЕ відтворювана і може застосовуватись для дослідження механізмів впливу різних лікувальних заходів на дегенеративно-деструктивні та відновно-приспосувальні процеси ЦНС в експерименті.

З корегуючою метою необхідно використовувати МСК не вище другого пасажу *ex vivo*.

Апробовано нові способи впливу на модельований ЕАЕ, які полягають у субокципітальному введенні МСК на піку захворювання, або у в/в введенні ІЛ-10 на 10 добу експерименту і МСК субокципітально – на 17 добу. При трансплантації МСК доцільно застосовувати введення клітин в зони ушкодження ЦНС або субарахноїдальні простори хірургічним шляхом.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є особистим науковим дослідженням автора. Спільно з науковим керівником роботи д-ром мед. наук Пічкуром Л.Д. визначено мету, завдання роботи, проаналізовано результати

дослідження. Автором самостійно проведено аналіз літератури, патентоспроможність теми дослідження, приймав участь в експериментах по оптимізації моделі ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом, проведив експериментальні дослідження – субокципітальне введення МСК та в/в - ІІ-10, моніторинг поведінкових реакцій, клінічного перебігу захворювання. Здобувач брав безпосередню участь у заборі матеріалу патоморфологічних досліджень, аналізі та статистичному опрацюванні фактичного матеріалу. Дисертантом проаналізовано та узагальнено результати, сформульовано висновки, обґрунтовано теоретичні та практичні положення роботи. Усі розділи дисертації написано та оформлено автором особисто. Висловлюємо подяку за допомогу співробітникам Інститута молекулярної біології і генетики НАН України і ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднено на IV науково-практичній конференції «Інновації в нейрохірургії» (Київ, 25-26 квітня 2017), VI з'їзді нейрохірургів України (Харків 14–16 червня 2017).

Публікації за темою дисертації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 10 наукових праць, у тому числі 8 статей у фахових періодичних виданнях, рекомендованих МОН України та цитуються у міжнародних наукометричних базах, з яких 5 статей у співавторстві засвідчують основні результати дисертаційного дослідження, 3 статті – додатково відображають результати дисертації, 2 тез доповідей на конференції та з'їзді нейрохірургів України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, 5 розділів власних досліджень, заключення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Робота викладена на 159 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 47 рисунками, містить 11 таблиць. Список використаних літературних джерел включає 154 посилання, з яких 55 – кирилицею та 99 – латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал та методи дослідження. Основу дисертаційної роботи становлять результати експериментального дослідження 104 статевозрілих безпородних щурах-самицях виводку віварію Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», масою 230 ± 20 г. Тварини утримувалися з забезпеченням вільного доступу до їжі та води. Всі процедури виконували у відповідності з міжнародними правилами і нормами біоетики.

Для моделювання хронічного рецидивуючого перебігу ЕАЕ з метою подальшого дослідження ефективності застосування лікувальних стратегій необхідно оптимізувати модель захворювання. З цією метою 32 безпородним щурам-самицям ЕАЕ індукували шляхом одноразового введення у подушечки задніх кінцівок суспензії, яка містила 1 мл гомогенату спинного мозку дорослих щурів емульгований у співвідношенні 1:2 мг, 1:3 мг та 1:4 мг *Mycob. tuberculosis*. Використовували повний ад'ювант Фрейнда виробництва («Sigma», США).

Тварин поділили на 4 експериментальні групи: інтактні тварини (n=12); щури з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ (n=8); тварини з ЕАЕ, індукованим 3 мг АФ (n=6) та 4 мг (n=6) АФ. Дослідження поведінкових реакцій за тестом «відкрите поле» проводили на 12 добу (початок виявлення патологічних неврологічних симптомів) згідно загальноприйнятої методики (Величко О.М. та співав., 2016).

Морфологічні дослідження спинного мозку експериментальних тварин проводили на 35 і 60 добу експерименту після внутрішньочеревиного передозування засобів для наркозу. Зрізи фарбували класичними оглядовими барвниками. Для селективного дослідження тонкої цитоструктури нейронів сірої речовини спинного мозку застосовували фарбування тіоніном. Гістологічні препарати досліджували на бінокулярному мікроскопі («NIKON», Японія) з наступною мікрофотодокументацією на світлооптичному фотомікроскопі Ахіорфот фірми («OPTON», Німеччина) при різних збільшеннях мікроскопу. Для морфометричного дослідження проведено підрахунок кількості змінених нейронів сірої речовини поперекового відділу спинного мозку, у тому числі необоротно змінених та загиблих нейронів у вигляді клітин-тіней, на 100 нейроцитів спинного мозку.

Дослідження біологічних властивостей МСК у процесі пасажування.

Морфологічний аналіз мезенхімальних стовбурових клітин протягом пасажування *ex vivo*. Забір пуповини, виділення МСК і дослідження їх характеристик проведені в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України згідно договору про співпрацю (№115 від 07.04.2017).

Для експериментальних досліджень використовували МСК 2 пасажу.

Для оцінки структури клітин використовували флуоресцентну (інвертований флуоресцентний мікроскоп - LEICA DMIL зі збільшенням $\times 80$) і конфокальну мікроскопію (конфокальній мікроскоп – AXIOSKOP – 2 ZEISS з лазерною скануючою програмою LSM 510 PASCAL («Carl Zeiss», Німеччина). Для фотодокументації росту культур застосовували апарат Canon Power Shot A640.

Визначення експресії поверхневих маркерів. FACS-аналіз експресії маркерів МСК (CD105, CD90, CD73, CD34– «BD», США) як специфічних критеріїв для визначення мезенхімальних стромальних клітин згідно з рекомендаціями Міжнародного товариства клітинної терапії виконували на сортері «BD FACSAria» із застосуванням програмного забезпечення «BD FACSDiva» у відділі клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» (договір про наукове співробітництво №134 від 05.04.2017). Аналіз проводився згідно стандартних протоколів. Клітини вміщували в епендорф у вигляді суспензії ($1-5 \times 10^6$ кл/мл) у крижаному PBS з додаванням 1% азиду натрію. Додавали 0,1-10 мкг/мл первинних мічених антитіл, розчинених у 3% BSA/PBS та інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Потім клітини відмивали тричі, центрифугуючи на 400 g протягом 5 хв та ресуспендували у 500 мкл крижаного PBS. Після цього етапу матеріал аналізувався у проточному цитометрі. У якості мітки використовувався FITC. Були виконані стандартні контрольні виміри

Більш ніж 95 % клітин 2 пасажу були позитивними за вказаними маркерами.

Дизайн дослідження. Для індукції ЕАЕ щурів імунізували 2 мл суспензії, яка містила гомогенат спинного мозку (ГСМ) щурів у фізіологічному розчині,

емульгований з повним ад'ювантом Фрейнда, який містить 2 мг мікобактерій туберкульозу у 1 мл ад'юванта. Ін'єкцію виконували підшкірно в подушечки задніх лап кінцівок. Це дозволило отримати хронічний рецидивуючий перебіг ЕАЕ середнього ступеня тяжкості захворювання (1,8 – 2 бали) з хронічним ремітуючим перебігом.

Тварин з модельованим ЕАЕ розподілили на декілька груп (табл. 1), яким з експериментальною метою внутрішньовенно або субокципітально вводили у різних поєднаннях ІЛ-10 (1 мкг рекомбінантного білку у фосфатному буфері загальним об'ємом 100 мкл) та/або 1×10^6 ксеногенних МСК Вартонових драглів пуповини 2 пасажу у 100 мкл фізіологічного розчину. У групі щурів 4 ІЛ-10 додавали у концентрації 1 мкг/мл до 1×10^6 МСК безпосередньо перед їх введенням субокципітально, при цьому об'єм суміші залишався незмінним – 100 мкл.

МСК марковані для досліджень отримували з паспортом біологічної характеристики з Інститута молекулярної біології і генетики НАН України, в рамках спільної НДР. Вводили їх субокципітально у кількості 1×10^6 (група 5).

Для внутрішньовенного введення ІЛ-10 на 11 добу після індукції ЕАЕ тварину розташовували у фіксаторі, тильну поверхню основи хвоста обробляли толуолом, що дозволяло отримати набряк поверхневої вени.

Для субокципітального введення суспензії МСК на 17 добу після індукції ЕАЕ у положенні максимального згинання шиї під лускою потиличної кістки пунктували велику потиличну цистерну і за допомогою інсулінового шприца вводили 0,1 мл суспензії МСК (1×10^6 нативних клітин).

Знеболення досягали шляхом внутрішньочеревного введення суміші розчинів ксилазіну (15 мг/кг) і кетаміну (70 мг/кг).

Таблиця

Розподіл тварин у експерименті

Група	Кіль-ть тварин	Групи тварин
1	28	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2	26	ЕАЕ + МСК (в кількості 1 млн в 100 мкл фіз.розчину) субокципітально на 17 добу
3	14	ЕАЕ + ІЛ-10 (в кількості 1 мкг/мл) внутрішньовенно на 10 добу, ІЛ-10 субокципітально на 17 добу
4	14	ЕАЕ + ІЛ-10 внутрішньовенно на 10 добу, ІЛ-10 та МСК субокципітально на 17 добу
5	10	ЕАЕ + трансфіковані геном ІЛ-10 МСК (в кількості 1 млн в 100 мкл фіз.розчину) субокципітально на 17 добу
6	12	Контроль, інтактні щури

Дослідження виживання мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини у ЦНС щурів з ЕАЕ після їх субокципітального введення.

МСК вводили 6 тваринам на піку захворювання на 17 добу після індукції ЕАЕ субокципітально у велику потиличну цистерну у кількості 1×10^6 . Групою порівняння були тварини з ЕАЕ. Забір матеріалу для досліджень (поперекове потовщення, стовбур мозку, ліквор, півкулі головного мозку) проводили на 2, 5 і 10 добу після трансплантації.

Виділення ДНК. Із спино-мозкової рідини методом висолювання геномну ДНК екстрагували з МСК клітин відповідно до (Grimberg J. et al., 1989), з головного і спинного мозку - з використанням методу (Biase F.H., 2012). ДНК МСК використано в якості позитивного контролю, ДНК тканин щурів групи порівняння – як негативний контроль. ДНК визначали за показником оптичної щільності з використанням спектрофотометра Thermo Scientific Nano Drop 2000 UV Vis. (США).

Для ідентифікації МСК використовували ПЛР-аналіз зі специфічними до альфа-сателітних послідовностей ДНК праймерами. Стандартизовану ПЛР виконували відповідно до (Becker M., 2002). Продукти реакції були візуалізовані за допомогою електрофорезу в 1,2% агарозному гелі.

Чутливість ПЛР-аналізу становила 1 клітина людини на 10^5 клітин щура, що було встановлено в ПЛР-реакціях з використанням матриць, отриманих з логарифмічних розведень МСК людини в спленоцитах щурів загально прийнятих протоколів та стандартів.

Методика дослідження поведінкових реакцій. Поведінкові реакції щурів досліджували за тестом «відкрите поле» (Величко О.М. та ін., 2016) тричі: на 12, 15 доби для вивчення ступеню розвитку ЕАЕ та на 24 добу після індукції ЕАЕ.

Адаптивну поведінку тварин оцінювали за тестом «відкрите поле» протягом 10 хвилин (за перші 5 хвилин, за другі 5 хвилин та сумарно за 10 хвилин) за показниками горизонтальної (перетин центральних та периферійних квадратів) та вертикальної локомоторної активності (вставання на задні лапи), дослідницької активності (заглядання у нірки), емоційної активності (грумінг і кількість болюсів). Реєстрували: латентний період (LP), кількість епізодів за перші 5 хвилин (n1), кількість епізодів за другі 5 хвилин (n2), загальну кількість епізодів за 10 хвилин спостережень (ns), тривалість епізодів за перші 5 хвилин (T1), тривалість епізодів за другі 5 хвилин (T2), загальну тривалість епізодів (Ts), середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хвилин (t1), середню тривалість окремого епізоду за другі 5 хвилин (t2) та середню тривалість окремого епізоду за 10 хвилин спостережень (ts).

Методика дослідження перебігу ЕАЕ. Клінічний перебіг ЕАЕ щурів оцінювали за 6 бальною шкалою (Касьяненко Ю.А., 2004): 0 - відсутність клінічних проявів; 1 - знижений тонус хвоста; 2 - слабкість або легкий параліч задніх кінцівок; 3 - важкий параліч задніх або всіх чотирьох кінцівок; 4 - передсмертний стан; 5 – смерть. Клінічні спостереження за тваринами проводили щоденно протягом 35 діб. У подальшому тварин обстежували 2 рази на тиждень до 65 доби.

Для статистичної обробки отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлкі. Для міжгрупового порівняння середніх значень використовували непараметричний

критерій U-Манна-Уїтні. Для співставлення значень одного і того ж показника в різні проміжки часу застосовували непараметричний критерій Вілкоксона. З метою деталізації відновного процесу проводили аналіз динамічних рядів, де щоденний абсолютний приріст (спад) стану піддослідних тварин в балах визначали за формулою 1:

$$\text{Абс. приріст} = x_n - x_{n-1}, \text{ де } n - \text{ доба спостереження} \quad (1);$$

а прискорення приросту (спаду) обчислювали за формулою 2:

$$\text{Прискорення приросту(спаду)} = (\text{абс.приріст}_n / x_{n-1}) * 100\% \quad (2)$$

Усереднені величини представляли у вигляді $M \pm m$, де M – середнє значення величини, а m – стандартна похибка середнього значення величини.

Для більшої наочності динаміки перебігу ЕАЕ на графіках за допомогою ліцензованого стандартного програмного пакету MS Excel 2007 додатково будували тренди апроксимації часових послідовностей.

Використовували поліноміальний алгоритм з мірою полінома – 6.

Методика дослідження структурних змін спинного мозку щурів за умов експерименту. Для вивчення тонких механізмів процесів де- і ремієлінізації нервових волокон з допомогою електронної мікроскопії проводили дослідження ультраструктурних змін тканини спинного мозку експериментальних тварин на 35 і 60 добу експеримента. Після введення токсичної дози тіопенталу натрію внутрішньочеревно, відразу після забою тварин проводили забір фрагментів тканини поперекових відділів спинного мозку розміром 1-2 мм³, фіксували в суміші 4% параформальдегіда, 2,5% глутаральдегіда і 4% сахарози на 0,1 молярному фосфатному буфері рН=7,4 з наступною стандартною фіксацією, зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу і оксіпропілена і заливали в суміш епоксидних смол (епон-аралдит) за загальноприйнятими методиками електронної мікроскопії. Для оцінки ступеню демієлінізації розраховували коефіцієнт відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осьового циліндра (Цимбалюк В.І., 2006) на комп'ютерному аналізаторі зображень САІ-01АВН фірми («SELMI», Україна) з використанням програмного забезпечення («Карра opto-electronics GmbH», Німеччина) при однаковому збільшенні (окуляр х 40, перехідник х 2, об'єктив х 10). Коефіцієнт відношення ширини мієлінової оболонки (МО) до діаметра осьового циліндра (ОЦ) визначався з розрахунку довільно взятих 30 мієлінізованих аксонів на 1 випадок за формулою: $МО/ОЦ$.

Для статистичної обробки отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлкі. Оскільки перевірка не підтвердила, що закон розподілу нормальний, для множинного міжгрупового порівняння середніх значень використовували непараметричний ранговий дискримінантний аналіз Краскела-Уолліса з подальшим застосуванням попарних порівнянь груп у діалозі тесту Краскела-Уолліса в STATISTICA 6.1, що еквівалентно множинним порівнянням за допомогою критерію U-Манна-Уїтні. Реалізація процедури Хольма-Бонферроні виконана засобами MS

Excel 2007. Усереднені величини представляли у вигляді М (25%; 75%) (n), де М – медіана; (.) – інтерквартильний діапазон.

Результати дослідження та їх обговорення.

Результати удосконалення моделі ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом. При дослідженні поведінкових реакцій щурів після індукції ЕАЕ 1 групи (2 мг мікобактерій) у «відкритому полі» у порівнянні з інтактними тваринами виявили: вірогідне зниження горизонтальної локомоторної активності (зменшення кількості перетинів периферійних квадратів – n_1 – в 1,7 разів ($p < 0,0015$), n_2 – в 1,9 разів ($p < 0,004$), ns – в 1,8 разів ($p < 0,0002$), вертикальної локомоторної активності (статистично значуще зменшення латентного періоду – LP– в 4 рази ($p < 0,0001$) та тенденція до зниження кількості вертикальних стійок – n_2 , ns , їх тривалості – T_2 , T_s та середньої тривалості – t_1 , t_2 , t_s), статистично значуще зниження дослідницької активності (збільшення латентного періоду – LP– в 2 рази ($p < 0,031$), зменшення тривалості – T_s – в 2,4 рази ($p < 0,047$) і середньої тривалості заглядань у нірки – t_s – в 2,6 разів ($p < 0,004$).

Також спостерігали тенденцію до підвищення емоційної активності (збільшення тривалості епізодів грумінгу – T_1 , T_2 , T_s при зменшенні кількості епізодів грумінгу – n_1 , n_2 , ns).

Загальний стан тварин 2 і 3 груп погіршувався і половина їх гинула.

Результати світлової мікроскопії поперекового потовщення спинного мозку щурів 1 групи на 35 добу спостереження засвідчують структурні ознаки процесу демієлінізації у переважній більшості аксонів. Останні витончені та деформовані. Олігодендроцити та астроцити із пікнотизованою цитоплазмою, окремі нейрони із збереженою типовою цитоструктурою, явища перичелюлярного та периваскулярного набряку.

На 60 добу дослідження у тканині спинного мозку явища демієлінізації наростають. У 2 групі тварин процес демієлінізації більш поширений з утворенням периаксіальних спустошень, поглибленням ступеня пошкодження аксонів з трансформацією їх у некротизовані гомогенні структури, у нейроцитах виявлені дистрофічні та некробіотичні зміни із збільшенням вмісту загиблих клітин. У гістоструктурі спинного мозку тварин 3 групи деструктивні зміни у сірій і білій речовині спинного мозку наростають, переважають загиблі клітини.

Таким чином, проведені дослідження, спрямовані на пошук оптимальної дози АФ для індукції ЕАЕ у щурів, показали, що найбільш поширений процес демієлінізації у тканині спинного мозку спостерігається при застосуванні збільшених доз АФ з вмістом 3 і 4 мг/мл мікобактерій туберкульозу (2 і 3 групи). Процес супроводжується появою дистрофічних змін у більшості нейроцитів сірої речовини спинного мозку. Але ступінь тяжкості тварин настільки важкий, що сприяє смерті 60-70% тварин і дуже важкому перебігу захворювання, унеможливорює спостереження за ними в тесті «відкрите поле». Отримані результати засвідчують достатність використання однієї дози АФ (2 мг/мл мікобактерій) для отримання моделі ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом.

Біологічні властивості МСК з Вартонових драглів пуповини протягом культивування ex vivo.

Морфологічна характеристика і фенотиповий потенціал культур МСК з Вартонових драглів відповідає результатам досліджень, представлених у роботі (Цимбалюк В.І. та ін., 2015). Вартонові драгли пуповини містять МСК, фібробласти, макрофаги та інші клітинні елементи. У матеріалі нульового пасажу спостерігається присутність різних за морфологією клітин - від округлих до фібробластоподібних. При подальшому культивуванні МСК спостерігається переважання веретеноподібних клітин, культура стає однорідною, і на рівні 2 пасажу практично всі клітини мають характерну веретеноподібну форму (рис.1).

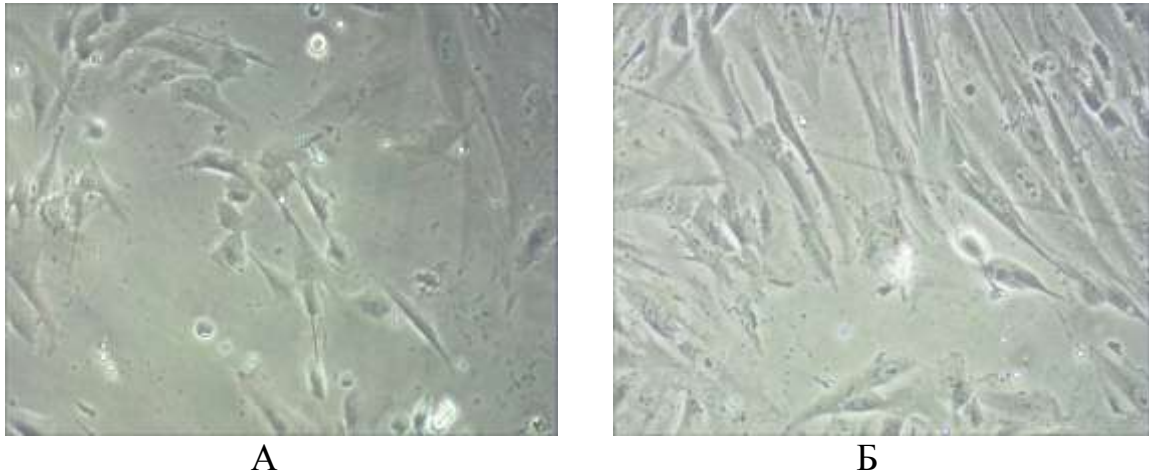


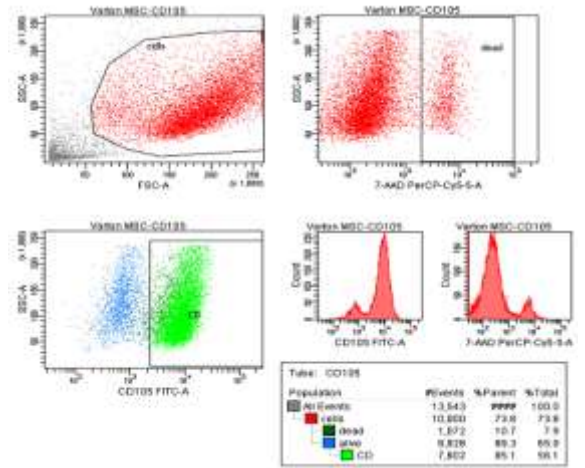
Рис. 1. Суспензійна культура клітин Вартонових драглів пуповини. А – 0 пасаж; Б - 2 пасаж. Фазово-контрастна мікроскопія. 20x10

Клітини збільшуються, їх розмір сягає 100 - 150 мкм. Життєздатність клітин, визначена за допомогою забарвлення трипановим синім, становила > 95%. Час подвоєння популяції МСК в культурі 0 пасажу у середньому складає $82,86 \pm 4,78$ години, на 1-2 пасажах - $53,28 \pm 8,9$ та $45,57 \pm 4,04$ годин відповідно, на 3 пасажі - $28,43 \pm 5,44$ години. На 3 пасажі з'являються клітини атипової форми, старіючі клітини. На більш пізніх пасажах зустрічались випадки спонтанної адипогенної та хондрогенної диференціації у моношарі, що є ознакою деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу.

У наших дослідженнях морфологічні зміни культур при пасажуванні супроводжуються фенотиповими змінами МСК. Типові МСК експресують CD73, CD90, CD105 поверхневі маркери (рис.2). Нами встановлено, що клітинний матеріал протягом 2 пасажів в культурі відповідає цим критеріям. Популяція клітин 0 пасажу різниться за ступенем експресії CD90 (min=8%, max=97,8%), а популяція клітин 3 пасажу – за ступенем експресії CD105 (min=5,5%, max=75%). Експресія маркеру CD73 найменше змінюється під час пасажування (від min=70,1% на 6 пасажі до max=99,3% на 1 пасажі). Відповідно до FACS аналізу (Fluorescence-activated cell sorting), більше 90% МСК Вартонових драглів другого пасажу, підготовлених для трансплантації, були позитивними по CD73, CD90 і CD105 маркерам.



А



Б

Рис. 2. А - імуногістохімічне виявлення CD105 - позитивних клітин в культурі Вартонових драглів пуповини 2 –го пасажу. 20x10.

Б – експресія позитивного CD105 маркера за даними FACS – аналіза

Час подвоєння популяції клітин на 1 пасажі складає $53,28 \pm 8,9$ години, на другому - $45,57 \pm 4,04$ годин.

Таким чином, застосований підхід обґрунтовує можливість подальшого використання клітин не вище 2 пасажу в культурі і адаптований до отримання необхідної кількості клітин в обмежені (1 місяць) строки.

Вживання МСК пуповини після субокципітального введення щурам з ЕАЕ.

Для повної характеристики клітин, які трансплантуються в умовах патології, необхідне розуміння їх поведінки, виживання і можливої міграції *in vivo*. Поодинокі дослідження виживання МСК у ЦНС щурів засвідчують, що клітини, принаймні протягом 5 діб, виявляються у лікворі і місцях ушкодження ЦНС щурів з ЕАЕ. Ми дослідили виживання клітин на 2, 5 і 10 добу після субокципітального введення щурам з ЕАЕ. Аналіз ПЛР засвідчив, що альфа-сателітні послідовності ДНК ксеногенних МСК виявляються на 2 і 5 добу експерименту у спино-мозковій рідині, стовбурі мозку і грудному відділі. На 10 добу альфа-сателітні послідовності ДНК ксеногенних МСК в жодному випадку не виявлено.

Таким чином, МСК виживають *in vivo* і здатні до хоумінгу у місця можливого ушкодження ЦНС щурів з ЕАЕ.

Результати дослідження поведінкових реакцій експериментальних тварин.

При дослідженні поведінкових реакцій щурів у «відкритому полі» на 12 добу після індукції ЕАЕ (група 1) порівняно з інтактними тваринами (група 6) виявлено статистично значуще зниження горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів периферійних квадратів $n1$ ($p=0,0015$), $n2$ ($p=0,004$), ns ($p=0,0002$); вертикальної локомоторної активності – статистично значуще зменшення латентного періоду LP ($p=0,0001$) та тенденція до зменшення кількості вертикальних стійок $n2$, ns , їх тривалості $T2$, Ts та середньої тривалості $t1$, $t2$, ts : статистично значуще зменшення дослідницької активності – збільшення латентного періоду LP ($p=0,031$) та зменшення

тривалості T_s ($p=0,047$) і середньої тривалості «заглядань у нірки» t_s ($p=0,004$). Також спостерігали тенденцію до збільшення емоційної активності – незначне збільшення тривалості епізодів грумінгу T_1 , T_2 , T_s при зменшенні кількості епізодів грумінгу n_1 , n_2 , n_s та збільшення кількості фекальних болосів.

Друге тестування у «відкритому полі» проведене на 15 добу після індукції ЕАЕ і на 7 добу після внутрішньовенного введення ІЛ-10 з метою оцінки змін поведінкових реакцій дослідних тварин під час перебігу захворювання та під впливом ІЛ-10. Статистично значущі відмінності показників поведінкових реакцій в групах тварин не виявлені.

При третьому тестуванні у «відкритому полі» поведінкових реакцій щурів груп 2 та 1 (рис. 3) спостерігали тенденцію до зменшення горизонтальної локомоторної активності при статистично значущому збільшенні LP перетину центральних ($p=0,028$) та периферійних ($p=0,028$) квадратів підвищення емоційної активності – збільшення тривалості T_2 ($p=0,01$), T_s ($p=0,028$) та середньої тривалості епізодів грумінгу t_2 ($p=0,005$). Також відзначено тенденцію до зменшення показників вертикальної локомоторної активності та збільшення показників горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів центральних квадратів та збільшення – периферійних квадратів, а також зменшення показників дослідницької активності за перші 5 хв. та збільшення – за другі 5 хв. дослідження. При тестуванні у «відкритому полі» щурів групи 5 порівняно з групою 2 (рис.3) спостерігали статистично значуще збільшення показників горизонтальної локомоторної активності (при зменшеному латентному періоді LP ($p<0,05$) збільшувалась кількість перетинів периферійних квадратів n_2 ($p=0,021$)), статистично значуще зменшення дослідницької активності (при збільшеному латентному періоді LP ($p=0,027$) зменшувалась «кількість заглядань у нірки» n_1 ($p<0,05$), тривалість та середня тривалість епізодів T_1 ($p=0,034$), t_1 ($p=0,034$)) та статистично значуще зниження емоційної активності (зменшення кількості епізодів грумінгу n_2 ($p=0,034$), n_s ($p=0,016$) та зменшення тривалості епізодів грумінгу T_2 ($p=0,034$)). Також виявлено тенденцію до зниження показників вертикальної локомоторної активності.

У щурів групи 5 порівняно з тваринами групи 4 при тестуванні у «відкритому полі» виявлено статистично значуще збільшення показників емоційної активності (середньої тривалості епізодів грумінгу t_s ($p=0,014$)). Також спостерігали тенденцію до зменшення показників горизонтальної і вертикальної локомоторної активності та показників дослідницької активності (рис. 4). Результати дослідження поведінкових реакцій щурів свідчили, що при індукованому ЕАЕ на 12 добу виникає статистично значуще зменшення орієнтовно-дослідницької діяльності (локомоторної та дослідницької активності) на тлі підвищення рівня емоційного напруження.

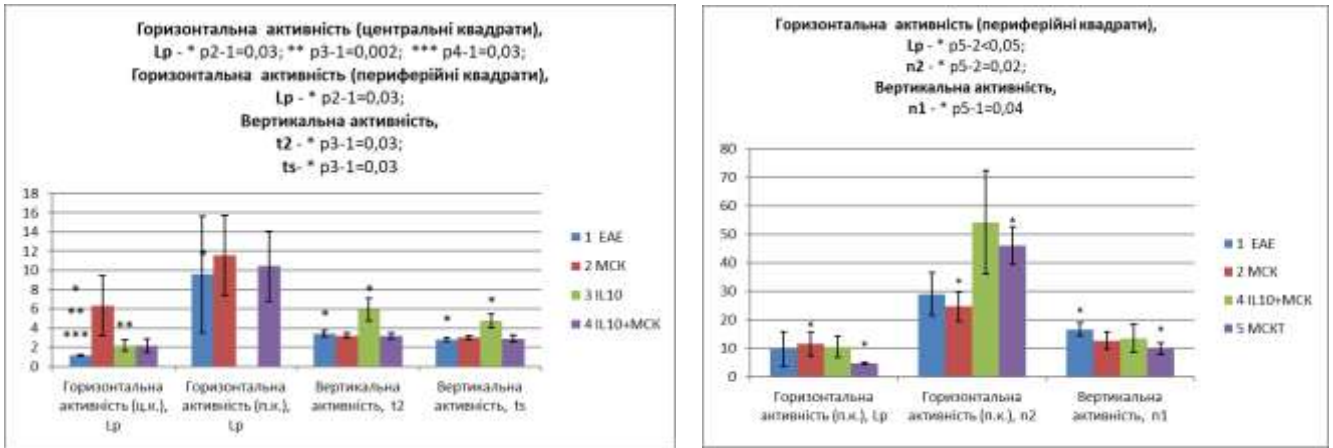


Рис.3 Показники локомоторної активності щурів з індукованим ЕАЕ за різних варіантів введення МСК та ІЛ-10

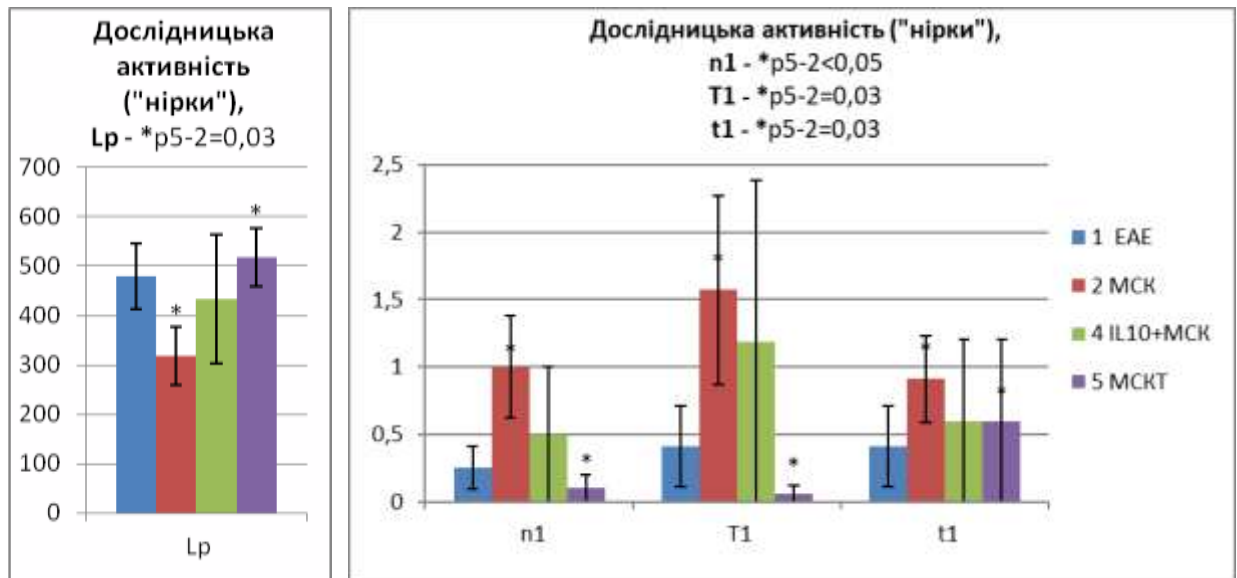


Рис.4 Показники дослідницької активності щурів з індукованим ЕАЕ за різних варіантів введення МСК та ІЛ-10

Таким чином, нами доведено, що ІЛ-10 справляє менш виражений вплив на поведінкові реакції щурів з індукованим ЕАЕ, ніж МСК та МСК і ІЛ-10. МСК, трансфіковані геном ІЛ-10, статистично значуще сприяють зменшенню емоційної і дослідницької активності, більш виражено збільшують локомоторну активність, ніж МСК.

За комбінованого впливу (МСК та ІЛ-10) на поведінкові реакції щурів спостерігали наближення показників вертикальної локомоторної, дослідницької і частково емоційної активності до контрольних значень, що свідчило про більшу ефективність впливу МСК та ІЛ-10, ніж МСКТ.

Отже, результати цього дослідження засвідчують можливість корекції порушень поведінки щурів при індукованому ЕАЕ шляхом комбінованого

застосування (МСК та ІЛ-10), що супроводжувалося збільшенням орієнтовно-дослідницької активності та нормалізацією поведінкових реакцій тварин.

Результати дослідження клінічного перебігу ЕАЕ після ксенотрансплантації МСК та у їх поєднанні з інтерлейкіном -10. Перші симптоми ЕАЕ появляються на 10 добу після моделювання. У тварин всіх досліджуваних нами експериментальних груп виявлено середню важкість стану (1,8 – 2,07 бали) на піку захворюваності (17 – 19 доби) і хронічний ремітуючий перебіг захворювання тварин.

Вже через 7 діб після введення МСК (рис.5) було візуально відмічено прискорення поновлення м'язового тонузу кінцівок експериментальних тварин, покращення рухів та сили м'язів кінцівок і хвоста. На 18 добу від індукції ЕАЕ стан тварин погіршувався з $1,1 \pm 0,13$ балів у групі порівняння до $1,5 \pm 0,14$ балів у групі після введення МСК (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,2$). У цій групі тварин пік клінічних проявів ЕАЕ зміщувався на 20 добу. Далі відбувалось поступове статистично значущий покращення стану цих тварин з $1,4 \pm 1,3$ балів на 22 добу до $0,07 \pm 0,07$ балів з повним клінічним одужанням на 32 добу (критерій Вілкоксона; $p=0,001$).

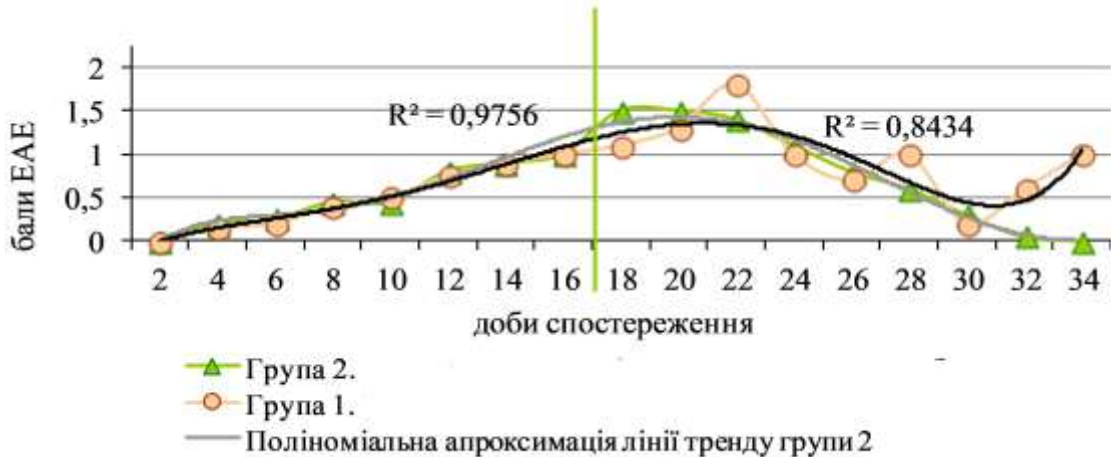


Рис.5 Динаміка клінічного перебігу ЕАЕ шурів після субокципітального введення МСК (група 2) та групи порівняння (група 1)

При аналізі динамічних рядів в динаміці відновного процесу відмічено рівномірний помірний спад, починаючи з 22 доби (-0,1 бали) і аж до 32 доби (-0,3 бали), де прискорення спаду становило - 83,3%.

У 3-ій групі тварин (рис.6) на 10 добу після індукції ЕАЕ внутрішньовенно вводили ІЛ-10, а на 17 добу на піку захворювання – субокципітально ІЛ-10, перебіг захворювання наближується до групи 4, яким субокципітально вводили МСК. Але після 17 доби у групі 4 (рис.7) тяжкість перебігу ЕАЕ статистично значуще збільшується у перші 2 доби після трансплантації – до $2,07 \pm 0,17$ балів відносно $1,1 \pm 0,13$ балів у групі порівняння (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,004$). Проте, одужання тварин 4 групи відбувалось швидше у порівнянні з щурами групи 3, які отримали лише ІЛ- 10. При цьому в групі 4 для терміну в 26 діб показник знижується, проте статистично незначуще за рахунок значного розкиду даних, відносно групи 3 – від $0,9 \pm 0,15$ до $0,4 \pm 0,14$ балів ($p=0,08$), відносно групи 2

$0,7 \pm 0,13$ ($p=0,2$). У нашому дослідженні простежується тенденція до більшої ефективності комбінованого застосування засобів із різним механізмом дії, наприклад, стовбурових клітин у комбінації з цитокінами.

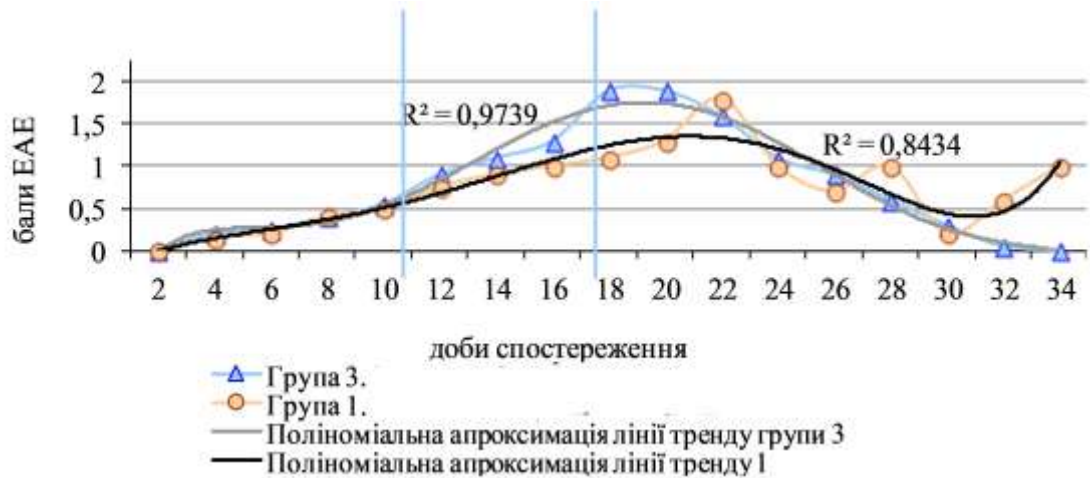


Рис.6 Динаміка клінічного перебігу ЕАЕ щурів після в/в (10 доба) і субоципітального (17 доба) введення ІЛ-10 (група 3) та групи порівняння (група 1)

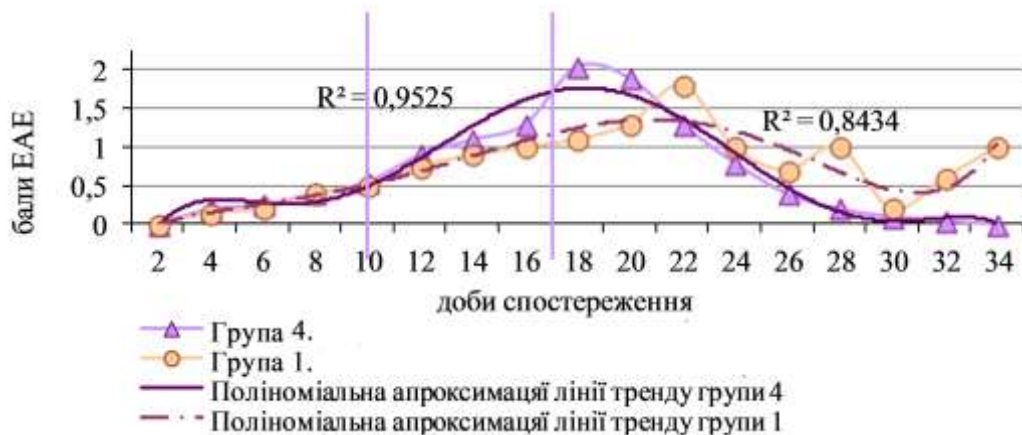


Рис.7 Динаміка клінічного перебігу щурів з ЕАЕ після в/в введення ІЛ-10 та субоципітального введення МСК (група 4) та групи порівняння (група 1)

Після субоципітального введення трансфікованих МСК щурам з ЕАЕ (група 5) на 17 добу експерименту перебіг захворювання подібний до 4 групи. Спостерігається деяке погіршення стану відразу після трансплантації з $1,1 \pm 0,13$ балів у групі порівняння до $1,6 \pm 0,14$ балів у групі після введення МСКТ ($p=0,8$), яке триває кілька днів і на 22 добу експерименту тяжкість перебігу у цій групі тварин, вже нижча ($1,4 \pm 0,14$ бали) за тяжкість у групі спостереження ($1,8 \pm 0,25$ бали) при $p=0,2$. У подальшому спостерігається швидкий регрес симптоматики ЕАЕ у групі 5 до повного клінічного одужання на 32 добу (критерій Вілкоксона; $p=0,008$ на 26 добу, і $p=0,005$ на 32 добу відносно 22 доби дослідження).

Для більшої об'єктивізації особливостей перебігу ЕАЕ у різних групах проведено міжгруповий аналіз динамічних рядів експериментальних груп тварин. Порівнюючи динамічні ряди групи 2, яким вводили лише МСК, і групи 3, яка отримала лише ІЛ-10 було відмічено, що в цілому, обидві лінії відображають позитивну динаміку відновного процесу з повним клінічним одужанням експериментальних тварин у цих групах до 32 доби. Так, групи 2 і 3 майже не відрізняються числовими даними в балах в терміни 24-28 діб і їх динамічні ряди характеризувалися зниженням показника ступеню тяжкості стану піддослідних тварин у ці терміни відповідно від -0,3 до -0,5 балів і від -0,2 до -0,3 балів, а прискорення спаду показника ступеню тяжкості стану на 28 добу становило для групи 2 - 25%, а для групи 3 -33,3% .

При порівнянні динамічних рядів груп 2 і 4 також визначаються нижчі бали динамічного ряду у групі 4, яка отримала двоетапне комбіноване лікування, у порівнянні з групою 3, навіть не зважаючи на статистично значуще погіршення стану тварин після субокципітального введення МСК. Але найпоказовішою є динаміка відновлення між групами 3 і 4, в яких лікування проводили у два етапи, а відрізнялися комбінацією МСК з інтерлейкіном у групі 4.

Такий результат цілком узгоджується з швидким одужанням тварин на 29 добу у групі 4 (критерій Вілкокса; $p=0,0009$ на 29 добу, відносно 22 доби дослідження). Так, у групі 4 лінія динамічного ряду візуально характеризується більшим спадом показника ступеню тяжкості стану піддослідних тварин в терміни 22-26 діб (від -0,6 до -0,2 балів), де прискорення спаду показника ступеню тяжкості на 26 добу становило -50,0% відносно групи 3 (від -0,3 до -0,2 балів), з відповідним прискоренням спаду -33,3%, що дозволяє зробити припущення, що у групі 4, при інших рівних умовах з групою 3, внутрішньовенне введення ІЛ-10 на 10 добу зменшує запальні явища, запускає імунорегуляторні механізми, на тлі яких наступне введення МСК з інтерлейкіном-10 на 17 добу припадає на сприятливі умови для клітинної терапії та підтверджує доцільність комбінованого застосування інтерлейкіну і стовбурових клітин.

При порівнянні динамічних рядів групи 5, яким вводили МСКТ, і групи 4, яка отримала МСК і ІЛ-10, у обох випадках спостерігається позитивна динаміка відновного процесу з повним клінічним одужанням експериментальних тварин до 32 доби. Так, групи 5 і 4 майже не відрізнялися числовими даними в балах в терміни 24-28 діб і їх динамічні ряди характеризувалися зниженням показника ступеню тяжкості стану у ці терміни відповідно від -0,4 до -0,2 балів та від -0,5 до -0,2 балів, а прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану на 28 добу становило для обох вищевказаних груп дослідження -50 %. При цьому, група 2 у порівнянні з групою 5 за числовими даними в балах в терміни 24-28 діб виглядала дещо гірше зі зниженням показника ступеню тяжкості відповідно від -0,3 до -0,1 балів, а прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану для тварин групи дослідження 2 на 28 добу склало всього - 14,3 %.

Отже, за застосування різних комбінацій введення ІЛ-10 і МСК тваринам з ЕАЕ, одужання тварин настає до 32 доби експерименту. Ці показники статистично значуще відрізняються від групи порівняння. Перебіг захворювання

після введення нативних ксеногенних МСКТ легший, ніж у групі тварин після введення нетрансфікованих нативних МСК.

Таким чином, перебіг ЕАЕ у експериментальних групах тварин, як клінічно, так і статистично відрізняється. Величина вірогідності апроксимації розподілу R^2 , що 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.

Морфометричні дослідження нейронів спинного мозку. Проведено морфометричне дослідження впливу ІЛ-10 та МСК на морфо-функціональний стан нейронів сірої речовини поперекових відділів спинного мозку щурів з модельованим ЕАЕ, для чого підраховували кількість змінених нейронів, у тому числі необоротно змінених та загиблих нейронів у вигляді клітин-тіней, з розрахунку на 100 нейроцитів спинного мозку.

Якщо згідно з ДА Краскела-Уолліса показник «відсоток патологічно змінених нейронів» на 35 добу експерименту – $H(5, n = 60) = 38,46, p = 0,0000$; і, оскільки $p < 0,05$, то групи дослідження статистично високозначуще різняться між собою. При цьому, за даними міжгрупового порівняльного аналізу, враховуючи поправку Хольма-Бонферроні, на 35 добу спостерігається статистично значуща різниця між 1 групою та експериментальними групами 2, 3, 4 (рис. 8). При цьому, в даних групах відсоток патологічно змінених тіл нейронів відносно групи з модельованим ЕАЕ статистично значуще знижувався в групі 2 в 1,9 разу (з 61,81 (57,89; 69,23)% до 32,58 (28,57; 35,29)%, критерій U-Манна-Уїтні; $p = 0,00002$), в групі 3 – в 1,5 разу (до 41,88 (36,36; 47,62)%, критерій U-Манна-Уїтні; $p = 0,001$), а в групі 4 – в 1,7 разу – до 35,36 (33,33; 42,86)%, критерій U-Манна-Уїтні; $p = 0,0003$). Різниця між групою порівняння та групою 5 була статистично незначущою.

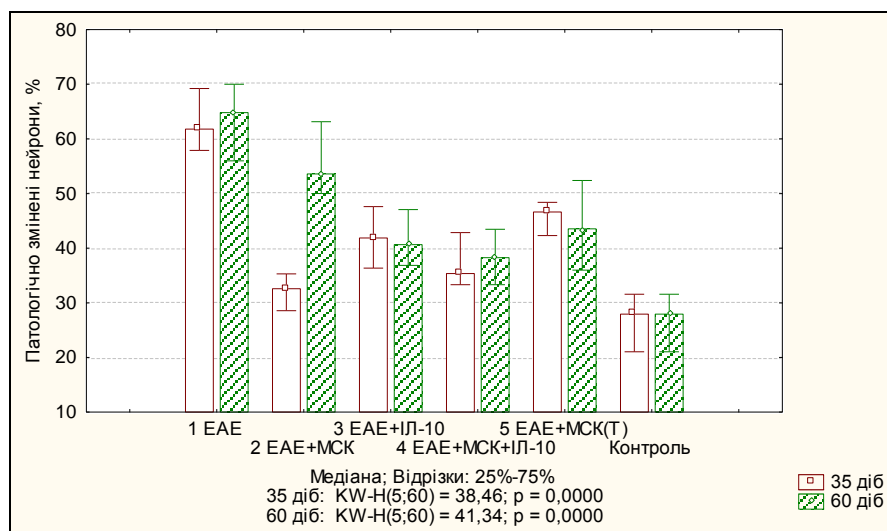


Рис. 8. Динаміка змін відсотку патологічно змінених нейронів в сірій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, під впливом різних схем введення МСК та ІЛ-10

На 60 добу експерименту, згідно ДА Краскела-Уолліса – $H(5, n = 60) = 41,34, p = 0,0000$; тобто групи дослідження статистично високозначуще різняться між

собою. В цей термін дослідження, відбулося статистично значуще підвищення відсотку патологічно змінених нейронів в групі 2 – до 53,59 (50,0;63,16)% відносно попереднього терміну дослідження (U-Манна-Уїтні; $p=0,00008$), яке, втім, було незначущим в порівнянні з відповідною групою ЕАЕ без лікування.

При цьому в інших лікованих групах зберігалася статистично значуща різниця відносно групи порівняння 1. Так, в групі 3 відбувалося статистично значуще зниження цього показника в 1,6 разу (з 64,81 (56,0;70,0)% до 40,66 (36,84;47,06)%, $p = 0,007$), в групі 4 – в 1,7 разу – до 38,28 (33,33;43,48)%, $p = 0,002$), а в групі 5 – в 1,5 разу – до 43,55 (36,0;52,38)%, $p=0,02$).

Наше дослідження засвідчило беззаперечне статистично значуще зниження відсотку патологічно змінених нейронів спинного мозку експериментальної групи 4 відносно групи порівняння у всі терміни експерименту, що доводить доцільність попереднього застосування протизапального ІЛ-10 і на цьому фоні – в лікворній шляхи МСК.

Результати дослідження ультраструктурних змін спинного мозку щурів з ЕАЕ під впливом МСК та ІЛ -10.

ЕАЕ (група порівняння) характеризується на електронно-мікроскопічному рівні деструктивними змінами клітин олігодендроглії та поширеною демієлінізацією тканини спинного мозку.

У тварин групи 1 у всі терміни дослідження у спинному мозку переважають дегенеративні і деструктивні форми олігодендроцитів, з передапоптичними змінами. Зміни з боку клітин олігодендроглії експериментальних груп тварин у всі терміни дослідження носять поліморфний характер. Реактивно змінені форми олігодендроцитів, поряд з деструктивними, частіше представлені в групі дослідження 3 ЕАЕ+ІЛ-10, і характеризуються порівняно електронно-світлою цитоплазмою з розширеними каналцями і цистернами ендоплазматичного ретикулу (ЕПР) і нечисленними набухлими мітохондріями і темним округлим або овальним ядром, заповненим як еу-, так глибоками гетерохроматину. Гіпертрофовані олігодендрогліоцити частіше виявляються після трансплантації МСК.

Олігодендроцити тварин групи 5 вирізняються численними набухлими мітохондріями з фрагментацією крист, аж до часткової вакуолізації органел. Це все дозволяє оцінювати стан таких олігодендрогліоцитів як компенсаторний функціональний. Звертає на себе увагу і той факт, що кількість контактів окремих олігодендроцитів з мієліновими волокнами в площині зрізу в експериментальних групах досягає 5 і більше. Такі олігодендроцити здатні до здійснення ними нормальної мієлінізації. Встановлені нами зміни будови олігодендрогліоцитів характеризують зміни їх метаболізму і перебудову білок-синтезуючого апарату, зокрема, ядра та ядерця, ендоплазматичного ретикулу, мітохондрій.

Структурні ознаки ремієлінізації нервових волокон у всіх групах дослідження починали з'являтися вже на 35 добу дослідження, при цьому новоутворена мієлінова оболонка вирізнялася наявністю тоншого, ніж у інтактних тварин, шару мієліну, що можна трактувати як ознаку ремієлінізації. Ремієлінізація нервових волокон здійснювалась своєрідними відростками олігодендрогліоцитів за рахунок утворення внутрішніх витків мієліну. Аксони в області ремієлінізації містили щільні, можливо, новоутворені, округлі мітохондрії з дещо набухлими кристами. Збільшення площі,

зайнятої ремієлінізованими аксонами, відносно групи порівняння в більшій чи меншій мірі виявлялися на 60 добу в усіх експериментальних групах тварин.

Морфометричні дослідження мієлінових оболонок. Для оцінки ступеню демієлінізації розраховували коефіцієнт відношення товщини мієлінової оболонки (МО) до діаметра осевого циліндра (ОЦ). Згідно з аналізом змін морфо-функціонального стану мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини спинного мозку щурів з модельованим ЕАЕ для показника МО/ОЦ на 35 добу експерименту – $H(5, n = 160) = 46,16, p = 0,0000$; і, оскільки $p < 0,05$, то групи дослідження статистично високозначуще різняться між собою (рис.9). При цьому, за даними міжгрупового порівняльного аналізу, враховуючи поправку Хольма-Бонферроні, відносно групи з ЕАЕ на 35 добу спостерігається статистично значуща різниця між цією групою та всіма експериментальними групами, за винятком групи 3 (рис.9).

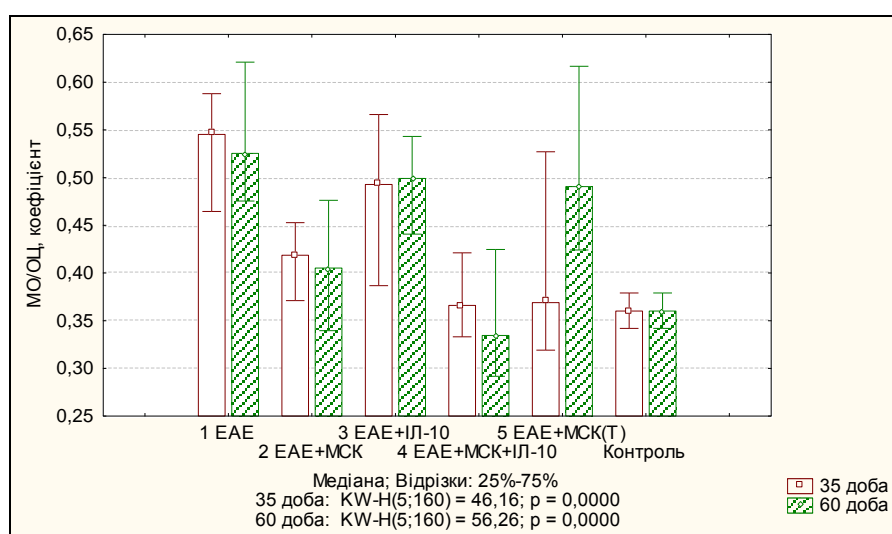


Рис. 9. Динаміка змін коефіцієнту відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра у білій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ під впливом різних схем введення МСК та ІЛ-10

Так, в експериментальних групах спостерігалось статистично значуще зниження показника МО/ОЦ відносно групи з модельованим ЕАЕ для групи 2 в 1,3 разу (з 0,55 (0,46;0,59) до 0,42 (0,37;0,45), критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,002$), і для груп 4 та 5 – в 1,5 разу (відповідно до 0,37 (0,33;0,42) і до 0,37 (0,32;0,52), критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,0000$). При цьому, для групи 3 числовий показник МО/ОЦ складає 0,49 (0,39;0,57) і є статистично незначущим за рахунок значного посилення ступеня розсіювання інтерквартильного розмаху. В групах 2, 4 і 5 прослідковується зв'язок між зниженням показника МО/ОЦ та зменшенням ознак періаксонального і міжламелярного набряку та зниженням кількості патологічно змінених мієлінових оболонок в мієлінізованих аксонах на ультраструктурному рівні. В цей термін спостерігається статистично значуща різниця між експериментальними групами дослідження: 4 і 5 відносно 3 (критерій U-Манна-Уїтні; відповідно $p=0,005$; $p=0,05$). Між самими вищевказаними групами статистично значущих відмінностей не виявлено.

На 60 добу збільшується ступінь розсіювання показника МО/ОЦ у всіх експериментальних групах, морфологічним еквівалентом чого була поліморфність ультраструктурних змін спинного мозку. На їх фоні виявляються ділянки впорядкованості ламел та нервові волокна з тонким шаром мієліну – прояви ремієлінізації аксонів.

На 60 добу експерименту, за даними міжгрупового порівняльного аналізу, зберігається статистично значуща різниця між групою порівняння та експериментальними групами (для показника МО/ОЦ на 60 добу експерименту – $H(5, n = 160) = 56,26, p = 0,0000$). В цілому, в терміни дослідження 35 і 60 діб числові значення коефіцієнта МО/ОЦ майже не відрізнялися і між ними немає статистично значущих відмінностей.

Таким чином, найвагомим фактом, встановленим нами, є значне зменшення коефіцієнта МО/ОЦ в експериментальних групах тварин, яким вводили МСК та ІЛ-10 у різних комбінаціях, відносно групи порівняння в усі терміни експерименту. При цьому, МСК демонструють позитивний вплив вже у ранні терміни дослідження, морфологічним проявом чого є зменшення міжламелярного і периаксонального набряку та сприяють активації процесу ремієлінізації.

Введений у ліквор субокципітально ІЛ-10 не справляє впливу, ознаки якого мають статистичну значущість, однак, при комплексному застосуванні демонструє підсилення й потенціювання дії МСК.

Слід зауважити, що навіть у віддалені терміни від початку експерименту морфологічні дослідження засвідчили неповну нормалізацію ультраструктурної організації мієлінізованих аксонів і клітинних елементів тканини спинного мозку в експериментальних групах тварин в наведені терміни експерименту.

Отримані результати свідчать, ступінь тяжкості ЕАЕ залежить від дози введеного ад'юванта Фрейнда. Оптимізація моделі дозволила отримати хронічний рецидивуючий перебіг захворювання з відповідним структурно-функціональним еквівалентом, що, з урахуванням специфічних деструктивних процесів в ЦНС, може вважатись моделлю РС. Застосування МСК та ІЛ-10 у різних варіантах справляє позитивний статистично значущий вплив на поведінкові реакції, перебіг захворювання, строки і функціональність відновлення структурних елементів спинного мозку.

Отримані результати дозволяють сформулювати висновки та практичні рекомендації щодо теоретичного обґрунтування відновного лікування демієлінізуючих ушкоджень ЦНС.

ВИСНОВКИ

1. Удосконалено модель експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів шляхом індукції демієлінізуючого процесу різними дозами ад'юванта Фрейнда. Використання дози ад'юванта Фрейнда 2 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* оптимально для отримання ефективної моделі експериментальний алергічний енцефаломієліт у щурів з хронічним рецидивуючим перебігом, характеризується задовільною відтворюваністю, відсутністю летальності на фоні виражених рухових

порушень, релевантністю в плані оцінки ефектів застосування засобів клітинної інженерії.

2. Підтверджено, що мезенхімальні стовбурові клітини Вартонових драглів пуповини, які застосовані в експерименті, протягом двох пасажів зберігають життєздатність, біологічні властивості і мезенхімальний фенотип (експресія поверхневих маркерів мезенхімальних стовбурових клітин - CD105, CD90, CD73).

3. Мезенхімальні стовбурові клітини Вартонових драглів пуповини поширюються через спино-мозкову рідину з місця ін'єкції (велика потилична цистерна) у різні відділи центральної нервової системи і виживають в них протягом 5 діб після трансплантації, яка була виконана на піку експериментального алергічного енцефаломієліту в ксеногенному варіанті без імуносупресії.

4. У щурів з індукованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом уже на 12 добу знижується орієнтовно-дослідницька (горизонтальна і вертикальна локомоторна активність) та емоційна активність. Встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини та мезенхімальні стовбурові клітини у поєднанні з ІЛ-10 справляють більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом, ніж ІЛ-10.

5. Доведено, що комбіноване застосування мезенхімальних стовбурових клітин та ІЛ-10 статистично значуще більш ефективно впливає на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту і корекцію поведінкових порушень щурів, ніж мезенхімальні стовбурові клітини, трансфіковані геном ІЛ-10.

6. Встановлено, що за умов застосування різних схем введення мезенхімальних стовбурових клітин та ІЛ-10, мезенхімальні стовбурові клітини демонструють позитивний вплив на процеси де- і ремієлінізації у центральній нервовій системі тварин з експериментальним алергічним енцефаломієлітом уже до 35 доби дослідження морфологічним проявом чого є зниження ступеня міжламелярного і периаksonального набряку та активації процесу ремієлінізації.

7. Встановлено, що у всіх експериментальних групах тварин, за винятком групи тварин з експериментальним алергічним енцефаломієлітом +ІЛ-10, процес демієлінізації призупиняється, відносно групи порівняння, починаючи з терміну 35 діб. Більш ефективно комплексне застосування ІЛ-10 і мезенхімальних стовбурових клітин.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для відтворення хронічного ремітуючого перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту доцільно застосування ад'юванта Фрейнда з вмістом *Mycobacterium tuberculosis* 2 мг/мл.

2. Оптимізована модель експериментального алергічного енцефаломієліту відтворювана і може застосовуватись для дослідження ефективності різних методів впливу на процеси ремієлінізації.

3. З терапевтично метою необхідно використовувати мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини не вище другого пасажу *ex vivo*.

4. При трансплантації високоефективними є хірургічні методи доставки мезенхімальних стовбурових клітин в зони ушкодження центральної нервової системи або субарахноїдальні простори.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Пічкур ЛД, Семенова ВМ, Величко ОМ, Вербовська СА, Єгорова ДМ, Акінола СТ, Васлович ВВ. Оптимізація моделювання експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом. Експериментальна і клінічна медицина. 2017;4(77):4–14.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, участь у моделюванні ЕАЕ, дослідженні поведінкових реакцій, узагальненні отриманих результатів, написанні основної частини тексту статті).

2. Цимбалюк ВІ, Величко ОМ, Пічкур ЛД, Акінола СТ, Вербовська СА, Шувалова НС, Топорова ОК, Дерябіна ОГ. Вплив нативних МСК, інтерлейкіна-10 та МСК, трансфікованих геном інтерлейкіну-10 на поведінкові реакції щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті. Укр. нейрохірург. журнал. 2018;1:66-72.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, участь у моделюванні ЕАЕ, дослідженні поведінкових реакцій, узагальненні отриманих результатів, підготовці статті до друку).

3. Пічкур ЛД, Вербовська СА, Васлович ВВ, Акінола СТ, Дерябіна ОГ, Похолоenko ЯО, Топорова ОК, Шувалова НС, Кордюм ВА. Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіну-10 на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту. Укр. неврологічний журнал. 2018;1:56-63.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літератури за темою роботи, участь у моделюванні ЕАЕ, дослідженні перебігу ЕАЕ у різних групах тварин, узагальненні отриманих результатів, підготовці статті до друку).

4. Цимбалюк ВІ, Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ, Васлович ВВ, Дерябіна ОГ, Похолоenko ЯО, Топорова ОК, Шувалова НС, Кордюм ВА. Вплив ксеногенної трансплантації нативних і трансфікованих геном інтерлейкіна 10 мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту. Вісник проблем біології і медицини. 2018;1(2): 227-234.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літератури за темою роботи, участь у моделюванні ЕАЕ, субоципітальному введенні МСК, дослідженні перебігу ЕАЕ у різних групах тварин, аналізі результатів досліджень, підготовці статті до друку).

5. Васлович ВВ, Пічкур ЛД, Малишева ТА, Акінола СТ, Вербовська СА, Топорова ОК, Шувалова НС. Ультроструктурні зміни спинного мозку щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом під впливом мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна-10. Журнал клинических и экспериментальных медицинских исследований. 2018;1:17-30.

(Особистий внесок здобувача полягає у моделюванні ЕАЕ, формуванні груп експериментальних тварин, заборі матеріалу для морфологічних досліджень, підготовці статті до друку).

6. Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ, Читаєва ГЄ. Основні патогенетичні механізми процесу демієлінізації в ЦНС та можливості його корекції. Укр. неврологічний журнал. 2017;2:12-19.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні і аналізі сучасного стану проблеми демієлінізуючих уражень ЦНС, підходів до лікування, участь у написанні статті).

7. Маслова ОО, Дерябіна ОГ, Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ. Сучасні підходи до кріоконсервування клітин мезенхімального походження. Укр. нейрохірург. журн. 2017;1:5-10.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні і аналізі сучасного стану проблеми тривалого зберігання МСК, участь у написанні статті).

8. Акінола СТ, Вербовська СА, Васлович ВВ, Пічкур ЛД. Дослідження впливу стовбурових клітин на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту і морфофункціональний стан нервових волокон спинного мозку. Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупіка. 2017;(28):5-17.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літератури за темою роботи, участь у моделюванні ЕАЕ, формуванні експериментальних груп тварин, дослідженні перебігу ЕАЕ у різних групах тварин, заборі матеріалу для морфологічних досліджень, аналізі результатів досліджень, підготовці статті до друку).

9. Акінола СТ. Вплив мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіну -10 на клінічний стан щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом. IV наук-практ. конференція «Інновації в нейрохірургії». Київ, 25-26 квітня 2017р.: тези доп. Київ, 2017. С.68.

10. Akinola S., Verbovska S., Pichkur L. Cells therapy for EAE treatment. VI з'їзд нейрохірургів України, Харків, 14–16 червня 2017 року: тези доп. Харків, 2017. С.192.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літератури за темою роботи, дослідженні впливу стовбурових клітин різного походження на перебіг демієлінізуючих процесів у ЦНС, аналізі результатів, написанні тез).

АНОТАЦІЯ

Акінола Самуель Толувані. Хірургічна корекція демієлінізуючих ушкоджень центральної нервової системи із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.05 «нейрохірургія». – Державна установа «Інститут нейрохірургії ім.акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, 2019.

У дисертації представлено новий підхід до вирішення наукової задачі – покращення результатів лікування демієлінізуючих ушкоджень центральної

нервової системи в умовах експериментального моделювання шляхом ксенотрансплантації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) Вартонових драглів пуповини та протизапального інтерлейкіна - 10 (ІЛ - 10). Дослідження виконано на білих безпородних щурах-самицях 3-х місячного віку, вагою 230 ± 20 г ($n = 104$; 6 експериментальних груп). У якості моделі демієлінізуючого ураження застосували експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ). Удосконалення моделі ЕАЕ дозволила отримати хронічний рецидивуючий перебіг захворювання.

Перебіг захворювання (6 - бальна шкала оцінки клінічного стану тварин), поведінкові реакції (тест «відкрите поле»), проведені культуральні, молекулярно-генетичні, морфологічні і статистичні дослідження. Підтверджено, що морфологічні характеристики МСК і експресія ними поверхневих маркерів зберігаються протягом 2 пасажів культивування. В більш пізні терміни виникають ознаки деградації культури та втрати клітинами мезенхімального фенотипу. Методом ПЛР встановлено, що введені у субарахноїдальний ліквор тварин з ЕАЕ МСК пуповини зберігають життєздатність принаймні протягом 5 діб і розповсюджуються у різні відділи нервової системи. Введення у ліквор тварин МСК і протизапального ІЛ-10 у різних комбінаціях сприяє повному клінічному регресу симптоматики і одужанню тварин до 32 доби експерименту.

Вивчення ознак де- і ремієлінізації на ультраструктурному рівні засвідчують, що МСК гальмують явища де мієлінізації уже в ранні терміни дослідження (35 доба), сприяють активації процесу ремієлінізації аксонів.

Встановлені виживання ксеногенних МСК, тропність і їх міграційна здатність до вогнища ураження у ЦНС, позитивний вплив на перебіг ЕАЕ можуть отримати широке застосування в практичній медицині.

Нейрохірургічні методи (введення у велику потиличну цистерну) розширюють можливості застосування МСК та продуктів їх синтезу (цитокінів), які не проникають через гемато-енцефалічний бар'єр.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, мезенхімальні стовбурові клітини, інтерлейкін - 10, демієлінізація, поведінкові реакції, ксенотрансплантація.

АННОТАЦІЯ

Акинола Самуель Толувани. Хирургическая коррекция демиелинизирующих поражений центральной нервной системы с использованием мезенхимальных стволовых клеток (экспериментальное исследование). – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.05 «нейрохирургия». – Государственное учреждение «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины», Киев, 2019.

В диссертации представлен новый подход к решению научной задачи – улучшению результатов лечения демиелинизирующих поражений центральной нервной системы в условиях экспериментального моделирования путем ксенотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) Вартонового геля

пуповины и противовоспалительного интерлейкина – 10 (ИЛ-10). Исследование выполнено на беспородных крысах-самках 3-х месячного возраста, весом 230 ± 20 г ($n = 104$, 6 групп). В качестве модели демиелинизирующего поражения использован экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ). Усовершенствование модели ЭАЭ позволила получить хроническое ремитирующее течение. Проведено изучение течения заболевания (5-бальная шкала), поведенческие реакции (тест «открытое поле»), культуральные, молекулярно-генетические, морфологические и статистические исследования.

Подтверждено, что морфология МСК и экспрессия ими поверхностных маркеров сохраняются в течении 2 пассажей культивирования. В более поздние сроки появляются признаки деградации культуры и потери клетками мезенхимального мультипотентного фенотипа. Методом ПЦР установлено, что введенные в субарахноидальный ликвор животных с ЭАЭ МСК пуповины сохраняют жизнедеятельность как минимум в течении 5 дней и способны к хоумингу.

Введение в ликвор животных МСК и ИЛ-10 в разных комбинациях способствуют полному регрессу симптоматики и выздоровлению животных до 32 суток эксперимента.

Изучение структурных особенностей де- и ремиелинизации на ультраструктурном уровне свидетельствуют что МСК демонстрируют положительное влияние уже в ранние сроки исследования (35 сутки), морфологическим проявлением чего является снижение степени межламеллярного и периаксиального отека и способствуют активации процессов ремиелинизации. Введенный в ликвор животным с ЭАЭ ИЛ-10 не оказывает статистически значимого влияния, однако потенцирует действие МСК. Даже в отдаленном периоде (60 сутки) от начала эксперимента полной нормализации ультраструктурной организации миелинизированных аксонов и клеточных элементов спинного мозга не происходит.

Практическое значение полученных результатов состоит в оптимизации экспериментальной модели ЭАЭ, ее воспроизводимости, возможности использования для исследования эффективности разных методов влияния на процессы ремиелинизации. На протяжении 2 пассажей МСК сохраняют свои биологические свойства, имеют короткий период удвоения популяции в культуре, что дает им преимущества при клиническом использовании.

Установленные выживаемость ксеногенных МСК, тропность и миграционные свойства могут получить широкое применение в медицинской практике. Трансплантация ксеногенных МСК Вартоновского геля пуповины способствуют восстановлению поведенческих реакций и двигательной активности животных. Нейрохирургические методы (введение в большую затылочную цистерну и др.) введения расширяют возможности МСК и продуктов их синтеза (цитокинов), которые не проникают через гемато-энцефалический барьер. Трансфекционные технологии позволяют усилить положительное влияние МСК на процессы де- и ремиелинизации дополнительным синтезом противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: экспериментальный аллергический энцефаломиелит, мезенхимальные стволовые клетки, интерлейкин-10, демиелинизация, поведенческие реакции, ксенотрансплантация.

SUMMARY

Akinola Samuel Toluwani. Surgical correction of demyelinating injuries of the central nervous system using mesenchymal stem cells (experimental study). - Qualification of scientific work on the rights of manuscripts.

Summary for a candidate degree in medical sciences in specialty 14.01.05 — neurosurgery. State Institution “Institute of neurosurgery named after. acad. AP Romodanov NAMS of Ukraine”, Kyiv, 2019.

The dissertation presents a new approach to solving the scientific problem - improvement of the results of treatment of demyelinating injuries of the central nervous system under conditions of experimental modeling by xenotransplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) of umbilical cord blood counts and anti - inflammatory interleukin - 10 (IL - 10). The study was performed on white, non-breeding rats, females of 3 months of age, weighing 230 ± 20 g (n = 104, 6 groups). Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) was used as a demyelinating lesion model, which was obtained by immunizing animals with a Freund full adjuvant (2 mg / ml Mycobacterium tuberculosis). Optimization of the EAE model allowed to obtain a chronic relapsing course of the disease.

The course of the disease (a 5-point scale for assessing the clinical condition of animals), behavioral reactions (open field test), cultures, molecular-genetic, morphological and statistical studies were studied. It is confirmed that the morphology of MSCs and the expression of their surface markers are preserved during 2 cultivation passages. At a later date there are signs of degradation of culture and loss of cells of the mesenchymal multipotent phenotype. The PCR method has shown that when introduced into the subarachnoidal CSF of animals from the EAE MSC umbilical cord retain their viability for at least 8 days and are capable of humming. Introduction to the liver of animals MSC and anti-inflammatory IL-10 in various combinations promotes a complete clinical regression of symptoms and recovery of animals up to 32 days of the experiment.

The study of structural signs of de-remyelination at the ultrastructural level shows that MSCs have a positive effect already in the early stages of the study (35 days), contributing to the activation of the process of remyelination of axons. However, the complete normalization of the ultrastructural organization of myelinated axons and cellular elements of the spinal cord does not occur.

Established survival of xenogeneous MSCs, tropism and their migration ability to the focal point of the central nervous system, positive effects on the course of EAE can be widely used in practical medicine.

Neurosurgical methods (introduction into a large occipital cistern, ventricles of the brain, etc.) extend the possibilities of using MSCs and their synthesized products (cytokines) that do not penetrate the blood-brain barrier.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, mesenchymal stem cells, interleukin - 10, demyelination, behavioral reactions, xenograft.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФ	–	ад'ювант Фрейнда
ГЕБ	–	гемато-енцефалічний бар'єр
ЕАЕ	–	експериментальний алергічний енцефаломієліт
ДНК	–	дезоксірибонуклеїнова кислота
ІЛ	–	інтерлейкін
МО	–	мієлінова оболонка
МСК	–	мезенхімальні стовбурові клітини
МСКТ	–	мезенхімальні стовбурові клітини трансфіковані геном ІЛ - 10
МСК-ВДл	–	мезенхімальні стовбурові клітини Вартонових драглів
НСК	–	нейрогенні стовбурові клітини
ОЦ	–	осьовий циліндр
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
РС	–	розсіяний склероз
СК	–	стовбурові клітини
СМР	–	спинномозкова рідина
ФРН	–	фактор росту нервів
ФРФ	–	фактор росту фібробластів
ЦНС	–	центральна нервова система
LP	–	латентний період