

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
Державна установа
«Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

АКІНОЛА САМУЕЛЬ ТОЛУВАНІ

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

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

14.01.05 – нейрохірургія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Акінола Самуель Толувані

Науковий керівник:
доктор медичних наук
Пічкур Леонід Дмитрович

Київ – 2019

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, на основі результатів проведеного комплексного дослідження оцінки впливу мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), представлено узагальнення і новий підхід до вирішення наукової задачі – покращення результатів лікування запально-демієлінізуючих уражень центральної нервової системи в умовах експериментального моделювання шляхом ксенотрансплантації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) Вартонових драглів пуповини і протизапального інтерлейкіна 10 (ІЛ - 10).

Дослідження виконано на білих безпородних щурах-самицях 3-х місячного віку, вагою біля 230 ± 20 г ($n = 104$; 6 експериментальних груп). У якості моделі запально-демієлінізуючого ураження використано експериментальний алергічний енцефаломієліт, який отримували шляхом імунізації тварин у подушечки задніх лапок енцефалітогенною сумішшю з повним ад'ювантом Фрейнда з вмістом *Mycobacterium tuberculosis* 2 мг/мл. Проведено дослідження впливу різних доз ад'юванта Фрейнда на поведінкові реакції і морфологічні зміни спинного мозку, що дозволило удосконалити модель ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом, яка вважається адекватною моделлю демієлінізуючого ушкодження нервової при розсіяному склерозі, уникнути летальності експериментальних тварин, у подальшому вивчати вплив різних чинників на процеси де- і ремієлінізації та перебіг захворювання.

Проведено дослідження перебігу захворювання за 5-бальною шкалою, поведінкові реакції (тест «відкрите поле»), культуральні, молекулярно-генетичні, морфологічні і математико-статистичні дослідження.

Вивчено біологічні властивості МСК Вартонових драглів пуповини в умовах культивування. У процесі культивування МСК спостерігається тенденція до зниження інтенсивності експресії маркерів CD105 та CD90, хоча ці зміни не є статистично значущими. Найбільш стабільною є експресія маркеру CD73. Встановлено, що властивості МСК (типова морфологія, експресія поверхневих маркерів) зберігаються протягом 2 пасажів культивування. В більш пізні терміни появляються ознаки деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу. З терапевтичною метою необхідно використовувати МСК пуповини не вище другого пасажу в культурі.

Першу групу склали тварини з ЕАЕ (група порівняння). Другій групі тварин МСК Вартонових драглів пуповини (1×10^6 в 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду) вводили субокципітально на 17-ту добу на піку захворювання. Третій групі тварин на 10-ту добу, після імунізації ад'ювантом Фрейнда з енцефалітогенною сумішшю, внутрішньовенно вводили ІЛ-10 (1 мкг/мл) і на 17 добу – ІЛ-10 (0,1 мкг в 0,1 мл) – субокципітально з метою вивчення протизапального впливу. Тваринам четвертої групи на 10 добу після імунізації внутрішньовенно вводили ІЛ-10 (1 мкг/мл) і на 17 добу, на піку клінічних проявів, субокципітально вводили МСК (1млн МСК у 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду) з метою оцінки протизапального впливу і здатності МСК впливати на процеси де- і ремієлінізації ЦНС на морфологічному рівні. П'ятій групі тварин на піку захворювання (17 доба) субокципітально трансплантували МСК, трансфіковані геном ІЛ-10 (МСКТ). Шосту групу склали інтактні щурі.

Підтверджена здатність МСК Вартонових драглів пуповини людини до хоумінгу. Субокципітально введені клітини можуть мігрувати через спинномозкову рідину з місця ін'єкції (велика потилична цистерна) у різні

відділи ЦНС і виживати в них принаймні протягом 5 діб після трансплантації, яка була виконана на піку ЕАЕ (17 доба) в ксеногенному варіанті без імуносупресії.

Дослідження поведінкових реакцій щурів з індукованим ЕАЕ у тесті «відкрите поле» на 12 добу виявило статистично значуще зниження орієнтовно-дослідницької (зменшення показників горизонтальної та вертикальної локомоторної активності) та емоційної активності. Застосування МСК та МСК у поєднанні з ІЛ-10 справляло більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів при ЕАЕ, ніж внутрішньовенне і субокципітальне введення ІЛ-10. Субокципітально введені МСК, трансфіковані геном інтерлейкіна 10, справляють більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів з індукованим ЕАЕ, ніж МСК. Комбіноване застосування МСК та ІЛ-10 статистично значуще більш ефективно сприяє корекції порушень орієнтовно-дослідницької активності та емоційної сфери щурів з ЕАЕ, ніж МСКТ.

Виявлено, що застосування МСКТ, протизапального ІЛ-10 і МСК у різних комбінаціях також сприяють повному клінічному регресу симптоматики і одужанню тварин до 32 доби експерименту відносно групи порівняння, де спонтанного клінічного одужання не настає. Аналіз динамічних рядів також засвідчує більшу ефективність лікування у цих групах тварин. Прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану в цих групах дослідження на 28 добу становило - 50 %.

Результати морфометричних досліджень впливу інтерлейкіну-10 та МСК на морфо-функціональний стан нейронів сірої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з модельованим ЕАЕ засвідчують, що на 35 добу експерименту спостерігається статистично значуща різниця між групою порівняння (ЕАЕ) та експериментальними групами 2 (ЕАЕ+МСК) і 4 (ЕАЕ+ІЛ-10+МСК). При цьому, в даних групах зменшення кількості патологічно змінених нейронів відносно групи з модельованим ЕАЕ складало для групи 2 – 47,29%, а для групи 4 – 42,79%. Різниця між групою порівняння і групами 3 (ЕАЕ+ІЛ-10) та 5 (ЕАЕ+МСКТ) була статистично незначущою.

Подібна тенденція спостерігається і на 60 добу дослідження, однак наростає кількість патологічно змінених нейронів в групі 5 порівняно з іншими експериментальними групами. Найбільш виражений вплив на клітинні елементи спинного мозку спостерігається після введення ІЛ-10 внутрішньовенно на 10 добу експерименту і МСК Вартонових драглів пуповини субокципітально в ліквор на 17 добу.

Вивчення структурних ознак де- і ремієлінізації на ультраструктурному рівні за умов введення тваринам з експериментальним алергічним енцефаломієлітом мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна 10 за різними схемами дозволило узагальнити дані і установити, що мезенхімальні стовбурові клітини демонструють позитивний вплив уже в ранні терміни дослідження, морфологічним проявом чого є зниження ступеня міжламілярного і периаksonального набряку та сприяють активації процесу ремієлінізації. В експериментальних групах тварин процес демієлінізації призупиняється за деяким винятком групи 3, відносно групи порівняння, починаючи з терміну дослідження 35 діб. Введений у ліквор субокципітально ІЛ-10 не справляє статистично значущого впливу на морфологічні зміни центральної нервової системи, однак, демонструє підсилення й потенціювання дії МСК. Слід зауважити, що навіть у віддалені терміни від початку експерименту морфологічні дослідження засвідчили не повну нормалізацію ультраструктурної організації мієлінізованих аксонів і клітинних елементів речовини спинного мозку в експериментальних групах тварин.

Значення отриманих результатів полягає в удосконаленні моделі ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом, яка відтворювана і може застосовуватись для дослідження механізмів впливу різних лікувальних заходів на дегенеративно-деструктивні та відновно-приспосувальні процеси центральної нервової системи в експерименті.

Мезенхімальні стовбурові клітини Вартонових драглів пуповини мають унікальні властивості, характерні стовбуровим клітинам. Нами підтверджено, що протягом 2 пасажів мезенхімальні стовбурові клітини не втрачають свої

властивості і фенотипові характеристики, що, наряду з можливістю отримання великої кількості клітин за короткий проміжок часу, дає їм перевагу при клінічному застосуванні в перспективі. Встановлені виживання ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин, тропність і їх міграційна здатність до вогнища ураження у центральній нервовій системі можуть отримати широке застосування в практичній медицині.

В роботі апробовано нові способи впливу на модельований експериментальний енцефаломієліт, які полягають у субокципітальному введенні мезенхімальних стовбурових клітин на піку захворювання, або у в/в введенні протизапального цитокіна інтерлейкіна 10 на 10 добу експерименту і мезенхімальних стовбурових клітин субокципітально – на 17 добу. Таке поєднання сприяє відновленню поведінкових реакцій, рухової активності тварин і гальмуванню процесів демієлінізації у спинному мозку щурів уже в ранні терміни дослідження. При трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин доцільно застосовувати введення клітин в зони ушкодження центральної нервової системи або субарахноїдальні простори хірургічним шляхом, поза гемато-енцефалічним бар'єром.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, пуповина, Вартонові драгли, мезенхімальні стовбурові клітини, інтерлейкін 10, поведінкові реакції, спинний мозок, ксенотрансплантація.

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.

In the dissertation, on the basis of the conducted comprehensive research, a generalization and a new approach to solving a scientific problem - improvement of the results of treatment of the inflammatory and demyelinating defeat of the central nervous system in the conditions of experimental modeling by xenotransplantation of mesenchymal stem cells (MSC) of umbilical cord blood casts and anti-inflammatory interleukin 10 (IL - 10). The study was performed on white, unborn male rats, 3 months old, weighing about 250 g (n = 106, 6 experimental groups). Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) was used as a model of inflammatory demyelinating defeat, which was obtained by immunizing animals into pads of the hind legs with full Freund's adjuvant with an encephalitogenic mixture at a ratio of 2 mg/ml. The study of the influence of various doses of Freund's adjuvant on behavioral reactions and morphological changes in the spinal cord was carried out, which allowed to optimize the EAE model, to avoid the lethality of experimental animals and to obtain a chronic recurrent course, which in the future allowed to study the influence of various factors on the processes of de-and remyelination and course disease of experimental animals.

In the dissertation, on the basis of the conducted comprehensive research, a generalization and a new approach to solving a scientific problem - improvement of the results of treatment of the inflammatory and demyelinating defeat of the central nervous system in the conditions of experimental modeling by xenotransplantation of mesenchymal stem cells (MSC) of umbilical cord blood casts, anti-inflammatory interleukin 10 (IL - 10) and MSCs transfected with the IL-10 gene.

Clinical and experimental (5-point scale of assessment of clinical condition of animals), behavioral reactions (open field test), cultural, molecular-genetic, pathomorphological and mathematical-statistical researches were conducted.

The phenotypic characteristics and proliferative potential of the MSC of the Warton umbilical jujube capsules under cultivation conditions were studied. In the process of cultivation of MSCs, there is a tendency to decrease the intensity of the expression of the markers CD105 and CD90, although these changes are not statistically significant. The most stable expression is the marker CD73. It has been established that the properties of MSC (typical morphology, surface markers expression) are stored during 2 cultivating passages. At a later date there are signs of degradation of culture and loss of cells of the mesenchymal multipotent phenotype. For therapeutic purposes, it is necessary to use the MSC human umbilical cord not higher than the second passage in the culture.

The first group consisted of animals from the EAE (comparison group). The second group of animals MSC Swine umbilical cord blood swabs (1×10^6 in 100 μ l of isotonic sodium chloride solution) was injected subocipitally at the 17th day at the height of the disease. In the third group of animals, 10 days after immunization, intravenous IL-10 (1 μ g / ml) was injected intravenously, and on the 17 day, IL-10 (0.1 μ g in 0.1 ml) was subcapitalized to study anti-inflammatory effects. In animals of the fourth group, intravenous IL-10 (1 μ g / ml) was injected intravenously over the 10th day after immunization, and on the 17th day, at the peak of clinical manifestations, suboccipitally injected MSCs (1 ml of MSC in 100 μ l of isotonic sodium chloride solution) to evaluate anti-inflammatory effects and the ability of MSC to influence the processes of de-and remyelination of the central nervous system at the morphological level. The fifth group of animals at the peak of the disease (17 days) subocipital transplanted MSC transfected with the IL-10 genome. The sixth group consisted of intact rats (second group of comparison).

The ability of the MSC of the wattled human umbilical juices to humming was discovered. The cell-encapsulated cells can migrate through spinal cord fluid from the injection site (large occipital cistern) to different CNS departments and

survive for at least 5 days after transplantation performed at the peak of EAE (17 days) in the xenogonal variant without immunosuppression.

The study of behavioral reactions of rats with induced EAE in the "open field" test on the 12th day revealed a statistically significant decrease in the indicative-research (reduction of the indicators of horizontal and vertical locomotor activity) and emotional activity. The use of MSCs and MSCs in combination with IL-10 had a more pronounced effect on the behavioral responses of rats at EAE than intravenous and subocipital injection of IL-10. Subcategorically administered MSCs transfected with the interleukin 10 gene have a more pronounced effect on the behavioral responses of induced EAE rats than MSCs. The combined application of MSCs and IL-10 statistically significantly more effectively contributes to the correction of disorders of the orientational-research activity and emotional sphere of rats with EAE than the MSCs transfected with the IL-10 gene.

It has been found that the use of MSCT, anti-inflammatory IL-10 and MSC in various combinations also contributes to a complete clinical regression of symptoms and animal regeneration up to 32 days of the experiment relative to the comparison group where spontaneous clinical recovery does not occur. The analysis of dynamic rows also confirms the greater effectiveness of treatment in these animal groups. Acceleration of the decline in the severity of the clinical condition in these study groups at day 28 was -50%.

The study of structural signs of de-remyelination at the ultra-structural level in animals under the conditions of EAE MSK and IL-10 under different regimens allowed us to generalize the data and to assume that MSCs have a positive effect already in the early stages of the study, the morphological manifestation of which is the reduction of the degree of interlamellar and periaxonal edema and promote the activation of the remyelination process. In the experimental animal groups, the demyelination process is suspended with some exceptions of the EAE + IL group, relative to the comparison group, starting with the study period of 35 days. IL-10 introduced into liquor subocipitally does not produce an effect whose signs have statistical significance, however, demonstrates enhancement and potentiation of the effect of MSC. It should be

noted that even in the remote terms from the beginning of the experiment, morphological studies have shown that the normalization of the ultrastructural organization of myelinated axons and cellular elements of the spinal cord substance in the experimental groups of animals has not been fully demonstrated.

The practical significance of the results obtained is to standardize the experimental model of EAE and its reproducibility in further experimental research. MSC Warwick umbilical cord dragons have unique properties that are characteristic of SC. We have proven that during 2 passages they do not lose their pluripotent properties and phenotypic characteristics, which, along with the possibility of obtaining a large number of cells in a short period of time, gives them an advantage in clinical application. The established survival of xenogeneous MSCs, tropism and their migration ability to the focal point of the central nervous system can be widely used in practical medicine.

It has been proved that the transplantation of xenogeneous MSCs of the Warlock umbilical cord blood donors contributes to the restoration of behavioral responses and motor activity of animals.

Neurosurgical methods (introduction into a large occipital cistern, ventricles of the brain, etc.) extend the possibilities of using MSCs and their synthesis products (cytokines) as they do not penetrate the blood-brain barrier. Transfection technologies have allowed to enhance the effect of MSC by additional anti-inflammatory cytokines, which can have a positive effect on the processes of demyelination of the CNS structures.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, mesenchymal stem cells, interleukin - 10, transfection of the gene, xenotransplantation.

Список публікацій здобувача 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.

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.

3. Пічкур ЛД, Вербовська СА, Васлович ВВ, Акінола СТ, Дерябіна ОГ, Похоленко 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.

4. Цимбалюк ВІ, Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ, Васлович ВВ, Дерябіна ОГ, Похоленко 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.

5. Васлович ВВ, Пічкур ЛД, Малишева ТА, Акінола СТ, Вербовська СА, Топорова ОК, Шувалова НС. Ультраструктурні 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.

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.

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.

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.

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.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	13
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Основні патогенетичні механізми процесу демієлінізації в ЦНС та можливості його корекції	24
1.2. Особливості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини	38
1.3. Оптимізація моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з хронічним рецидивуючим перебігом	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	45
2.1. Методика виділення, визначення біологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів пуповини в умовах культивування	45
2.1.1. Виділення МСК	45
2.1.2. Методи морфологічних досліджень МСК	46
2.1.3. Визначення експресії поверхневих маркерів	47
2.2. Удосконалення моделі експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом	48
2.3. Дизайн дослідження	51
2.4. Методика дослідження виживання мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини в центральній нервовій системі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом після їх субокципітального введення	53
2.5. Дослідження поведінкових реакцій та клінічного перебігу ЕАЕ у щурів після інтратекального введення МСК і інтерлейкіна-10	54
2.5.1. Методика дослідження поведінкових реакцій тварин	54
2.5.2. Методика дослідження клінічного перебігу ЕАЕ	56
2.6. Методика дослідження морфологічних змін тканини спинного мозку на клітинному і субклітинному рівнях у щурів з ЕАЕ під	

впливом мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна-10	57
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ. ХАРАКТЕРИСТИКА МСК	
ВАРТОНОВИХ ДРАГЛІВ ПУПОВИНИ	61
3.1. Морфологічна характеристика культур МСК з Вартонових	
драглів пуповини при культивуванні	61
3.2. Особливості проліферації МСК в культурі	63
3.3. Характеристика МСК з Вартонових драглів пуповини за	
поверхневими маркерами	65
3.4. Виживання МСК Вартонових драглів пуповини у ЦНС щурів з	
ЕАЕ після їх субокципітального введення	68
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ УДОСКОНАЛЕННЯ МОДЕЛІ ЕАЕ	
ХРОНІЧНИМ РЕМІТУЮЧИМ ПЕРЕБІГОМ	70
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЙ І ПЕРЕБІГУ	
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ	
ПІД ВПЛИВОМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ МСК	77
5.1. Результати дослідження клінічного перебігу ЕАЕ після	
ксенотрансплантації МСК та у їх поєднанні з інтерлейкіном-10	77
5.2. Вплив мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіном-10	
на поведінкові реакції щурів при експериментальному	
алергічному енцефаломієліті	86
РОЗДІЛ 6 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ	
ЗМІН СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ЕАЕ ПІД ВПЛИВОМ МСК ТА	
ІНТЕРЛЕЙКІНУ – 10	93
6.1. Ультраструктурні зміни спинного мозку щурів	93
6.2. Динаміка морфологічних змін спинного мозку щурів	
експериментальних груп на світлооптичному рівні	109
ПІДСУМКИ	126
ВИСНОВКИ	132
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	135
ДОДАТКИ	157

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФ	— ад'ювант Фрейнда
ГЕБ	— гемато-енцефалічний бар'єр
ГКГС	— головний комплекс гістосумісності
ЕАЕ	— експериментальний алергічний енцефаломієліт
ІЛ	— інтерлейкін
МО	— мієлінова оболонка
МСК	— мезенхімальні стовбурові клітини
МСК-ВДл	— мезенхімальні стовбурові клітини Вартонових драглів
НСК	— нейрогенні стовбурові клітини
ОС	— осьовий циліндр
РС	— розсіяний склероз
СК	— стовбурові клітини
СМР	— спинномозкова рідина
ФРН	— фактор росту нервів
ФРФ	— фактор росту фібробластів
ЦНС	— центральна нервова система

ВСТУП

Незважаючи на багаторічні різнобічні дослідження патогенезу демієлінізуючих захворювань центральної нервової системи (ЦНС), і, зокрема, розсіяного склерозу (РС), їх лікування залишається невирішеною проблемою сучасної медицини. В той же час протягом останніх 15 років у цій галузі досягнуті значні успіхи: сформувалася концепція гетерогенності нозологічних форм цих захворювань, описані нові та атипові клінічні їх форми у центральних та периферичних відділах нервової системи, ідентифіковані нові антигени, розроблені і впроваджені у практику діагностичні панелі аутоантитіл, апробовані нові лікарські засоби для імунотерапії, досліджуються біомаркери демієлінізуючих захворювань нервової системи, розробляються програми їх патогенетичної терапії [1, 2].

Поряд з тим, значна увага приділяється розробці альтернативних методів лікування демієлінізуючих захворювань ЦНС з використанням клітинної терапії фетальними та стовбуровими клітинами різного генезу. У зв'язку з цим особливу актуальність набуває наявність надійної експериментальної моделі, яка відтворює демієлінізуючий процес у ЦНС, подібний до такого при РС. У численних спостереженнях показано, що за клінічними проявами та гістологічною картиною експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ), який індукується антигенами мієліну та опосередковується Т-клітинами, має значну схожість з РС і може вважатись його модельним еквівалентом. Жодна з описаних моделей ЕАЕ не повторює всіх особливостей патоморфологічного перебігу РС. У зв'язку з цим проводяться подальші пошуки методів відтворення більш адекватних експериментальних моделей РС з розвитком хронічного демієлінізуючого процесу у ЦНС [2, 3].

На різних етапах патогенезу РС і його моделі – експериментального алергічного енцефаломієліту суттєву роль відіграє поєднання запалення, демієлінізації, дегенерації нейронів і аксонів. Нейродегенеративні зміни при РС виникають в умовах дефіциту трофічних факторів та мієліноутворюючих

клітин [4] і розвиваються під впливом різних субстанцій (цитокінів, протеаз, оксиду азоту ($\text{NO}^\cdot$), продуктів перекисного окислення ліпідів тощо), які виділяють імунокомпетентні клітини, мікроглія, макрофаги та інші активовані клітини [2, 5]. Безпосередній патогенний вплив вірусу або іншого, поки що не визначеного зовнішнього цитотоксичного чинника, стимуляція апоптозу олігодендроцитів і нейронів також спричиняють демієлінізацію і некроз. Тобто, патогенетичні зміни при цих захворюваннях складаються з одного боку з наявності агресивного деструктивного аутоімуунитету, запальні прояви та інтенсивність якого прогресують, а з другого боку - з дегенеративно - дистрофічних явищ у вогнищах запалення у паренхимі ЦНС, процесів регенерації, які неадекватні ступеню дегенерації [6]. Тому розробка лікувальних стратегій повинна бути спрямована на забезпечення протизапальної дії, супресії деструктивного аутоімуунитету та створення сприятливих умов для поновлення мієліноутворення у ЦНС хворих.

Виходячи з цього, з урахуванням не високої ефективності існуючих методів лікування, протягом останніх років в експериментальних дослідженнях при запально-дегенеративних процесах ЦНС широко вивчається можливість використання стовбурових клітин (СК) [7, 8].

Стовбурові клітини виявлені у багатьох тканинах. На сьогоднішній день добре вивчені мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). Більшість з них є мультипотентними, здатними диференціюватися практично у будь-які клітини організму, за винятком гемопоетичного ряду. Здатність МСК до трансдиференціювання, імунокоригуючі властивості, відносна простота культивування та доступність у дорослому організмі робить їх унікальним матеріалом у регенеративній медицині [9].

Дані літератури засвідчують більш виражені імуносупресивні властивості мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика у порівнянні з аналогічними клітинами з інших джерел, що, поряд з іншими перевагами, свідчить про перспективність використання їх в регенеративній медицині [10-12].

МСК з Вартонових драглів добре проліферують *in vitro*, мають унікальні властивості (здатність до міграції, трансдиференціювання в клітини ектодермального походження, існування системного і локального імуномодуючого впливу за рахунок швидкого збільшення регуляторних лімфоцитів і зменшення кількості активованих антигенпрезентуючих клітин). Наряду з цим МСК здатні стимулювати синтез і самостійно синтезувати цілий ряд протизапальних цитокінів. Ці властивості можуть бути надзвичайно важливими для корекції аутоімунних станів [13].

При цьому існує кілька суттєвих обмежень. СК необхідно вводити в лікворні простори ЦНС, оскільки при системному введенні вони не здатні проникати через гемато-енцефалічний бар'єр [14]. СК здатні продукувати протизапальні цитокіни і стимулювати гліогенез. Збільшенню концентрації цих факторів може сприяти перенос відповідних генів у складі вірусних векторів, якими трансфікуються СК (*ex vivo* перенесення гена) [15].

Це своєрідний альянс клітинної та генної терапії, який дозволяє уникнути недоліків і посилити переваги обох методів. Оскільки терапевтичний ефект при трансплантації МСК здійснюється значною частиною за рахунок секреції ними широкого спектра цитокінів та ростових факторів, модифікація клітин за допомогою генетичних конструкцій, кодуєчих гени цих білків, дозволяє посилити паракринні ефекти трансплантованих клітин і підвищити їх терапевтичні властивості. Можливість використання СК та їхніх похідних у якості переносників терапевтичних генів із тривалістю їхньої експресії, що відносно регулюється, представляє величезний інтерес для лікування різних захворювань людини. Ушкоджуючі фактори вогнища запалення негативно впливають на життєдіяльність введених МСК [16], імовірно створюючи обмеження для повноцінної реалізації їх терапевтичного потенціалу. Тому перспективною видається ідея одночасного застосування МСК і зниження рівня запалення. Одним із ключових протизапальних цитокінів вважають інтерлейкін – 10 (ІЛ-10). В окремих роботах показано ключову роль ІЛ-10 у попередженні

розвитку та лікуванні аутоімунних станів та аутоімунних захворювань ЦНС [17]. Він безпосередньо інгібує експресію прозапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, INF- γ , TNF- α , а також пригнічує презентацію антигенів антиген-презентуючими клітинами, зменшує активність цитотоксичних клітин кіллерів та нормальних кіллерів, моноцитів та макрофагів [18, 19]. ІЛ-10 бере участь в усуненні запалення динамічним чином, впливає на залучення у область ушкодження власних мультипотентних клітин, а також клітин-попередників, що забезпечують первинну репарацію тканини. Завдяки цьому він оптимізує зону терапевтичної реалізації власних і трансплантованих СК [20].

Нами було зроблено припущення, що одночасне застосування МСК та ІЛ-10 зможе взаємно посилити їх терапевтичний ефект. Беручи до уваги особливості і унікальні властивості МСК Вартонових драглів, нами проведено експериментальне комплексне вивчення ефективності застосування МСК при вогнищевих ураженнях ЦНС щурів з модельованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом у комбінації з введенням ІЛ-10, з метою створення нового імуногенетичного стану та корекції рухових порушень експериментальних тварин. МСК здатні тривало зберігати життєздатність у ЦНС тварин і мають тропність до вогнищ ураження, що, на нашу думку, може бути корисним у випадку трансфекції у МСК генів, кодуєчих синтез ІЛ-10.

Застосування генетично модифікованих стовбурових клітин, які забезпечують локальну доставку терапевтичного трансгена безпосередньо в орган-мішень, здатне забезпечити високий терапевтичний ефект при одночасному зниженні кількості та сили прояву побічних ефектів лікування .

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”, № 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 центральній нервовій системі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом.
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 де- і ремієлінізації 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 де- і ремієлінізації на тлі експериментального алергічного енцефаломієліту і ксеногенної трансплантації 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 інтерлейкіна 10 на поведінкові реакції, рухову активність експериментальних тварин та клінічний перебіг ЕАЕ (тест «відкрите поле», 5-ти 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 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 появляються 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-пристосувальні 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

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є особистим науковим дослідженням автора. Спільно з науковим керівником роботи д-ром мед. наук Пічкун Л.Д. визначено мету, завдання роботи, проаналізовано результати дослідження. Автор самостійно проведено аналіз літератури, патентоспроможність теми дослідження, приймав участь в експериментах по оптимізації моделі ЕАЕ з хронічним рецидивуючим перебігом, проводив експериментальні дослідження – субокципітальне введення МСК та в/в - ІЛ-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 2017р.), VI з'їзді нейрохірургів України (Харків 14–16 червня 2017 року).

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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні патогенетичні механізми процесу демієлінізації в ЦНС та можливості його корекції

Проблема демієлінізуючих захворювань, насамперед, розсіяного склерозу (РС), є однією з найбільш актуальних у неврології. На сьогоднішній день у світі налічується понад 3 млн. хворих на РС [21]. Захворювання може виникнути в осіб будь-якого віку (як правило, у віці 15–40 років), має ремітуючий первинно- або вторинно-прогресуючий перебіг, спричиняє стійку інвалідизацію, порушення професійного функціонування та втрату соціальної активності. Жінки хворіють частіше, проте, у чоловіків зазвичай переважає несприятлива, прогресивна форма РС [6, 22, 23].

На думку Е.И. Гусева і співавторів [24], РС — невиліковне аутоімунне захворювання нервової системи, етіологія якого дотепер не визначена. РС прийнято вважати мультифакторним захворюванням, в ініціюванні якого важливу роль відіграють вірусна інфекція, спадкова схильність, яка реалізується через полігенну систему, відповідальну за формування імунної відповіді, особливості метаболізму, а також дотепер не визначені географічні фактори [22, 24, 25].

На користь вірусної етіології РС свідчать епідемічні спалахи захворювання, зв'язок його дебюту або загострення з перенесеною вірусною інфекцією, можливість моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), виявлення вірусів і противірусних антитіл у крові та спинномозковій рідині (СМР) хворих.

Результати епідеміологічних досліджень свідчать про значне збільшення частоти виявлення РС, що пов'язано не тільки з покращенням діагностики, а й підвищенням захворюваності, особливо серед дітей і підлітків. Ці

спостереження свідчать про неабияку роль у виникненні РС екологічних чинників (поряд з інфекційними та ін.) [21, 23, 26].

На різних етапах патогенезу РС суттєву роль відіграє поєднання запалення, демієлінізації, дегенерації аксонів. Енцефалітогенними субстанціями при РС можуть бути пептиди, глікопротеїни мієліну, білки теплового шоку, білок S100b та інші білки ЦНС [27 - 30].

Нейродегенеративні зміни при РС відзначають не тільки у демієлінізованих аксонах і мієлінутворюючих олігодендроцитах, а й нервових волокнах з відносно збереженим мієліном, нейронах і гліальних клітинах на певній відстані від вогнищ демієлінізації. Нейродегенеративні зміни клінічно проявляються прогресуванням неврологічних порушень, за даними магніторезонансної томографії (МРТ) відзначають прогресуючу локальну (у вогнищах запалення і демієлінізації) та дифузну атрофія речовини мозку [31].

Існує припущення, що при РС ушкоджуються не лише нервові клітини, а й порушуються контакти між ними [32]. Нейродегенеративні зміни при РС виникають під впливом субстанцій (цитокінів, протеаз, NO^- , продуктів перекисного окислення ліпідів тощо), які виділяють імунокomпетентні клітини, мікроглія, макрофаги та інші активовані клітини, а також внаслідок підвищення концентрації кальцію й ушкодження нейрофіламентів [5, 25, 33]. Безпосередній патогенний вплив вірусу або іншого, поки що невизначеного зовнішнього цитотоксичного чинника, стимуляція апоптозу олігодендроцитів і нейронів також спричиняють демієлінізацію і некроз.

Існує кілька ефекторних механізмів імунної відповіді з антигеннеспецифічними складовими (фагоцитоз імунних комплексів і фрагментів мієліну; індукція апоптозу під впливом фактору некрозу пухлини (ФПН) і Fas-лігандів тощо) [5, 15, 23, 25]. Лімфоїдні клітини, які справляють цитотоксичний ефект на клітини-мішені, різняться за походженням, популяційним складом, рецепторним апаратом. Цитоліз клітин-мішеней під впливом антигенспецифічних цитотоксичних Т-лімфоцитів може відбуватися за участі ТсR-рецептора. Клітини-мішені зв'язуються з ТсR-рецепторами на

мембрані Т-лімфоцитів за обов'язкової участі молекул головного комплексу гістосумісності (ГКГС), що супроводжується утворенням кон'югата, викидом перфторинів і призводить до порушення цілісності мембрани мішені. Одночасно всередину клітини-мішені потрапляють гранзими, які взаємодіють з відповідними субстратами та врешті спричиняють її апоптоз [34 – 36]. Якщо роль гранзимів незначна (без'ядерні мішені) або чутливість до апоптотичного сигналу низька (зазвичай генетично зумовлена), відбувається осмотичний лізис мішені. Зазначені механізми притаманні різним субпопуляціям цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD4 і CD8). Антигенспецифічні CD4 Т-лімфоцити “розпізнають” мішень за участі молекул II класу ГКГС, CD8 Т-лімфоцити — за участі молекул I класу ГКГС. Роль цих ефektorів у руйнуванні мієліну й олігодендроцитів (припускають, що олігодендроцити містять чужорідні антигени — вірусні або власні, модифіковані) залежить від наявності на олігодендроцитах антигенів системи ГКГС. У тестах *in vitro* дотепер не виявлена чутливість олігодендроцитів людини до цитотоксичних CD4 лімфоцитів [32, 37, 38].

Антигенспецифічні цитотоксичні Т-лімфоцити можуть спричиняти цитоліз клітин-мішеней без участі TcR-рецепторів з подальшою експресією на їх мембрані різних молекул, у тому числі Fas-рецепторів і Fas-лігандів [36, 38]. Гіперекспресію молекул апоптозу вважають механізмом, що спричиняє загибель клонів антигенспецифічних Т-лімфоцитів, які виконали свою функцію, підтримує нормальний баланс субпопуляцій лімфоцитів в імунній системі. Не виключено, що під час антигензалежної активації Fas-ліганд Т-кілера може взаємодіяти з Fas-рецептором сусідньої клітини-мішені, що спричиняє її апоптоз без участі TcR-рецептора, перфторинів і гранзимів. На сьогоднішній день важко адекватно оцінити патогенетичну роль Fas-ліганд-залежного цитолізу при захворюваннях ЦНС. Доведено, що за будь-якого інфекційного процесу (йдеться про ситуацію, коли антигени збудника і ЦНС не є подібними) активовані Т-кілери потрапляють у забар'єрні органи, у тому числі ЦНС, відсутність антигенної специфічності не дозволяє їм ініціювати запальний або аутоімунний процес у мозку; подальша доля

таких клітин — рециркуляція або апоптоз після взаємодії з апоптозіндукуючими (гліальними) клітинами ЦНС. Однак у пацієнтів при аутоімунних захворюваннях відзначають генетично зумовлену низьку чутливість лімфоцитів до апоптозіндукуючого сигналу. За такої ситуації існують передумови для Fas-ліганд-залежного цитолізу олігодендроцитів Т-лімфоцитами без антигенної специфічності. Проте, подібні процеси навряд мають патогенетичне значення при РС, оскільки Т-кілерів без антигенної специфічності потрапляє у ЦНС в сотні разів менше, ніж, наприклад, при моделюванні ЕАЕ [30, 36]. Ймовірно, Fas-ліганд-залежний цитоліз може спричинити більш тяжкий перебіг основного процесу, натомість самостійне його патогенетичне значення незначне.

Вважають, що НК-клітини також здатні розпізнавати (без попередньої сенсibilізації) та спричиняти лізис чужорідних, вірусінфікованих і трансформованих клітин. При цьому цитоліз опосередкований системою перфоринів, гранзимів, Fc-рецепторами до IgG, меншою мірою — Fas-лігандом [39]. На користь цього свідчить те, що частина Т-клітин, реактивних по відношенню до основного білка мієліну, за довгострокового культивування індукуює лізис олігодендроцитів людини, але без участі антигенів головного комплексу гістосумісності. Ці клітини-ефектори характеризуються експресією поверхневих антигенів природних кілерів, зокрема CD56. Певний час олігодендроцити людини вважали стійкими до дії гетерологічних і цитотоксичних лімфокін-активованих кілерів, пізніше *in vitro* було показано, що після активації IL-2 CD3 лімфоцити спричиняють лізис гетерологічних людських олігодендроцитів, а НК — мікроглії і астроцитів [40].

Дослідження *in vitro* чутливості олігодендроцитів до НК-лізису моделюють ситуацію, яка виникає при РС. Клітини з фенотипом природних кілерів виявлені в паренхімі мозку і СМР тварин при ЕАЕ. Підвищений рівень IL-2 і розчинного рецептору до IL-2 виявлений в крові та СМР пацієнтів при РС з клітинними інфільтратами в ділянках бляшок. Активація запалення в ЦНС пов'язана з вивільненням у ділянках запалення додаткових цитокінів, зокрема, IL-12, IL-15, ФПН, інтерферонів (ІНФ), хемокинів, які спричиняють

не лише активацію NK-клітин, а й посилення експресії лігандів на клітинах-мішенях (внутрішньоклітинних молекул адгезії ICAM, CD48, CD58), які сприяють взаємодії з природними кілерами, збільшуючи їх чутливість до NK-опосередкованого лізису [35, 41].

Цитоліз клітин-мішеней імуніцитами може здійснюватися за участі специфічних антитіл. При РС значну роль відіграє антитілозалежна клітинна цитотоксичність (АЗКЦТ) — цитоліз клітин-мішеней під впливом клітин-ефекторів за умови, що з мембраною клітин-мішеней зв'язане специфічне антитіло, а в клітинах-ефекторах наявні рецептори до Fc-фрагмента Ig відповідного класу. З антитілами до IgG зв'язуються, у першу чергу, NK і макрофаги, меншою мірою — нейтрофіли; в якості клітин-ефекторів виступають еозинофіли, які зв'язуються з Fc-рецепторами IgA і IgE. Молекулярний механізм АЗКЦТ подібний до такого у цитотоксичних Т-лімфоцитах (перфорини, гранзими, індукція апоптозу), макрофагах і нейтрофілах (протеази і ферменти перекисного окислення ліпідів); в еозинофілах виявлені два токсичних білки: великий основний протеїн (major basic protein) і катіонний протеїн еозинофілів (eosinophil cationic protein). Цей механізм особливо цікавий при вивченні патогенезу деяких форм РС у рамках концепції мімікрії антигенів мієліну і деяких мікроорганізмів (вірусів, хламідій тощо).

Гуморальний механізм комплементзалежного лізису клітин-мішеней у ЦНС: специфічне антитіло (продукт клону антигенспецифічних В-лімфоцитів) потрапляє в орган-мішень і зв'язується з специфічним антигеном; наявність у мікрооточенні достатньої кількості комплементу спричиняє порушення цілісності мембран клітин і їх лізис (можливий осмотичний лізис).

Фагоцитоз уламків мієліну макрофагами і їх розщеплення у лізосомах шляхом перекисного окислення ліпідів або анаеробними протеазами (катепсин) до низькомолекулярних катаболітів вважають неспецифічним ефекторним механізмом імунної системи, що має патогенетичне значення при РС [23, 42].

Вважають, що гіперчутливість сповільненого типу має місце при загостренні РС, опосередкована Т1-лімфоцитами і активованими макрофагами. Т-лімфоцити

пам'яті активуються при взаємодії з специфічним антигеном, проте, їх деструктивні можливості обмежені. Однак γ -ІНФ, який продукується внаслідок такої взаємодії, є потужним активатором моноцитів і макрофагів. Основна функція фагоцитів — видалення загинувших клітин, проте, вони можуть також спричиняти ушкодження незмінених клітин. Окрім γ -ІНФ, Т-лімфоцити пам'яті продукують інші цитокіни, що сприяє місцевій стимуляції моноцитів. Ймовірно, за таким механізмом цитотоксичності відбувається імунозалежне руйнування мієліну та олігодендроцитів при РС, зумовлене протиінфекційним імунітетом і мімікрією мікробних антигенів і складових мієлінової оболонки [43, 44]. Повторне проникнення інфекційного агента в організм хворого може спричинити активацію клітин пам'яті і посилення місцевого запалення в органі-мішені.

Усі зазначені ефекторні механізми імунної системи можуть брати участь у руйнуванні мієліну та олігодендроцитів людини при РС, проте, дотепер патогенез цього захворювання остаточно не з'ясований. Очевидно, у патогенезі РС існують як імунозалежні, так і імунонезалежні механізми. Щодо імунонезалежних механізмів демієлінізації: існує концепція метаболічного дефекту мієліну, зумовленого сигнальною трансдукцією, післятрансляційними змінами білків і порушеннями фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару. Тому коректніше говорити про участь ефекторних механізмів імунної системи в імунозалежному руйнуванні мієліну й олігодендроцитів.

Виділяють 5 типів порушень структури мієліну при РС, різних за механізмом виникнення [2, 45, 46]. Одним з наріжних каменів цієї класифікації є оборотність патологічних змін, зумовлена збереженням і функціонуванням частини олігодендроцитів.

Для порушень І типу характерна демієлінізація, яка практично не супроводжується загибеллю олігодендроцитів. Характерна деструкція мієліну у вогнищах і по краях бляшок, іноді — зменшення (до 30%) кількості олігодендроцитів, зрідка у них виявляють апоптотичні зміни. Спостерігають швидко та повну ремієлінізацію волокон. За такої ситуації первинне ушкодження мієліну спричинене впливом вільнорадикальних сполук, ФНП- α ,

лімфотоксину, комплементу. Ремієлінізація можлива за рахунок збережених клітин-попередників.

Для порушень II типу характерні демієлінізація в поєднанні з некрозом олігодендроцитів, відсутність ремієлінізації, що, ймовірно за все, свідчить про загибель клітин-попередників олігодендроглії. Не виключені імуноспецифічні реакції проти антигенів, які експресуються зрілими олігодендроцитами та їх попередниками. Найбільш ймовірними антигенами-мішенями вважають цереброзид і сульфатид. Дискутуються експресія поки що невиявленого антигену вірусної етіології, а також цитотоксична дія NO^+ .

Порушення III типу характеризуються первинною демієлінізацією, яка супроводжується поступовим зменшенням кількості олігодендроцитів від периферії до центра вогнища ушкодження. Олігодендроцити гинуть одночасно, переважно за типом апоптозу, ремієлінізацію нервових волокон не спостерігають. Одним з механізмів загибелі олігодендроцитів є активація Т-клітин і перехресне реагування з білками теплового шоку, які експресуються на олігодендроцитах. Не виключений дефіцит нейротрофічних факторів (НТФ) (зокрема, інсуліноподібного фактора росту).

Порушення IV типу виявляють, зазвичай, за гострого перебігу РС (типу Марбурга), вони характеризуються одночасною деструкцією астроцитів, олігодендроцитів, мієліну та аксонів. Найбільш виражені реакції з боку макрофагів, мікроглії, що експресують активні сполуки (NO^+ , O^{2-} , H_2O_2 , цитокіни тощо). Відзначають порушення міжклітинного матриксу внаслідок активації металопротеїназ у вогнищах демієлінізації.

Для порушень V типу (за первинно-прогресивного перебігу захворювання) характерні первинне ураження олігодендроцитів, вторинна демієлінізація, відсутність ремієлінізації і ознак запалення. Загибель олігодендроцитів відзначають по краях бляшок, а не в центрі вогнищ демієлінізації. Причинами первинної загибелі олігодендроцитів можуть бути персистуюча вірусна інфекція та порушення метаболізму олігодендрогліоцитів, а також оксидативний стрес і активація керамід-сфінгомієліназного шляху [2].

Таким чином, сучасні уявлення про демієлінізуючий процес при РС не обмежуються суто імунopatологічними механізмами. Навряд чи коректно відносити РС до справжніх аутоімунних захворювань. Аутоімунними вважають лише такі захворювання, за яких лімфоцити, що запускають деструкцію, розпізнають справжні власні антигени. Що є пусковим механізмом РС? Накопичено багато даних про роль вірусних та інфекційних чинників в поєднанні з дефектами імунної системи хворого. Між інфекційним агентом і антигенами тканин організму часто, якщо не завжди, існують перехресно-реагуючі епітопи. Проте, ушкодження тканин за такої ситуації некоректно називати аутоімунним. Хоча дотепер немає єдності у поглядах дослідників на природу РС. Деякі автори вважають його суто аутоімунним захворюванням [4, 15, 22, 24, 39].

Для ЦНС, як і решти систем організму, характерна фізіологічна регенерація структурних компонентів на молекулярному і клітинному рівні. Під час онтогенезу відбувається систематичне відновлення мієліну. Морфологічно РС характеризується мультифокальною втратою мієліну, деструкцією олігодендроцитів, порушенням їх регенерації, ушкодженням аксонів. Наявність спонтанної ремієлінізації підтверджено результатами експериментальних досліджень з використанням морфологічних, нейрофізіологічних та інших методів. При РС ендогенні процеси в тканині мозку «неповноцінні», демієлінізація аксонів переважає над їх ремієлінізацією.

Мієлінізація — формування навколо аксонів переривчастої закрученої мембрани специфічної ламелярної структури (чергування гідрофобних ліпідних і гідрофільних білкових шарів), що забезпечує проведення нервового імпульсу, ізоляцію та трофіку нервового волокна. Мієлінізацію в ЦНС здійснюють олігодендроцити, у периферичній нервовій системі — шванівські клітини. Мієлінізація починається у другому триместрі вагітності. Попередники олігодендроцитів (препрогеніторні, прогеніторні гліальні клітини і проолігодендроцити) дисеміновані в білій і сірій речовині мозку, що розвивається, а також у мозку дорослих осіб. Проліферативна здатність попередників

олігодендроцитів поступово знижуються в процесі ембріогенезу, надалі, у тканині мозку дорослих вони перебувають у неактивному стані. Здатність до проліферації та міграції характерна лише для препрогеніторних і прогеніторних гліальних клітин. Клітини наступних стадій диференціювання — незрілі та зрілі олігодендроцити — не здатні ні до міграції, ані до проліферації [46]. Дані про фізіологічну репарацію мієліну вкрай обмежені. Диференціювання попередників олігодендроцитів *in vivo* визначають за наявністю на аксонах лігандів до рецепторів, які експресуються на олігодендроцитах та їх попередниках.

Процеси ремієлінізації в ЦНС вивчали на кількох експериментальних моделях: токсичних, вірусних, аутоімунних [24, 28, 47]. В токсичних моделях використовували хімічні речовини (купризон, етидіума бромід, лізолецитин та ін.), здатні руйнувати мієлінові оболонки, спричиняти ушкодження глії з утворенням вогнищ демієлінізації у місці ін'єкції. Демієлінізація у вірусних моделях у мишей спричинена вірусом мишачого енцефаломієліту Тейлора, що має хронічний прогресивний перебіг. Аутоімунні моделі демієлінізації у ЦНС — гострий і хронічний ЕАЕ, спричинені імунізацією тварин суспензією аутологічної або гетерологічної тканини мозку або енцефалітогенними компонентами мієліну. Ремієлінізацію спостерігали у всіх моделях експериментальної демієлінізації. Ознаками ремієлінізації вважали вогнища, з так званим «тіньовим мієліном», істотне зменшення невідповідності товщини мієлінової оболонки діаметру аксона; відновлення провідності по ушкодженій ділянці спинного мозку; позитивну імуногістохімічну реакцію на PLP, що відбиває рівень синтезу білків мієліну; наявність проліферуючих попередників олігодендроцитів у вогнищі демієлінізації [48, 49].

Відновлення мієліну при гострому ЕАЕ пов'язане з проліферацією і подальшим диференціюванням незрілих клітин олігодендроцитарного ряду. У репаративному процесі, крім олігодендроцитів різного ступеня диференціювання, беруть участь загальний попередники усіх клітин нервової тканини — нейрогенні стовбурові клітини (НСК) [43]. У постнатальному мозку попередники олігодендроцитів можуть мігрувати з субвентрикулярної

зони. Така міграція відбувається тільки при розпаді мієліну; в експерименті — при хронічному запаленні [49].

Є дані щодо можливості позитивного впливу на процес ремієлінізації аутоантитіл до компонентів мієліну. У вірусній моделі хронічної демієлінізації імунізація інфікованих тварин (мишей) гомогенатом спинного мозку або основним білком мієліну сприяла стимуляції ремієлінізації. Активація репарації мієліну може бути зумовлена прямим стимулюючим впливом на зрілі олігодендроцити або їх попередники аутоантитіл до антигенів мієліну, а також індукцією експресії ростових факторів мікро- або астроглією [23, 47, 50 - 52].

Патогенетичні механізми РС мають певні особливості. За ремітуючого перебігу захворювання яскраво виражені запальний і аутоімунний компоненти, за первинно прогресивного — вже на початкових етапах відзначають виражену дегенерацію аксонів. Нейродегенерація при РС спричинена демієлінізацією, ушкодженням аксонів при гострому вогнищевому запаленні, зменшенням калібру осьових циліндрів внаслідок порушення мієлін-аксональних взаємовідношень. Дифузні зміни є основною причиною інвалідизації хворих за первинно прогресуючого перебігу РС.

У наш час патогенетична терапія при РС основана, в першу чергу, на використанні 3 препаратів: β -ІНФ 1а (ребіф) і 1в (бетаферон), глатирамеру ацетату (копаксон), що дозволяє зменшити активність патологічного процесу. Клінічний ефект при застосуванні цих препаратів підтверджений позитивною динамікою за даними МРТ. β -ІНФ можна використовувати як за ремітуючого, так і вторинно прогресуючого перебігу РС з загостреннями. За вторинно прогресивних форм захворювання застосовують мітоксантрон (новантрон), глюкокортикоїди (пульс-терапія з використанням метилпреднізолону, АКТГ), β -ІНФ 1а (ребіф) і 1в (бетаферон), симптоматичну терапію.

Протизапальні препарати потенційно можуть впливати на деякі ланки процесу нейродегенерації. Найбільш обґрунтованим є нейропротекторний вплив препаратів тривалого використання, зокрема β -ІНФ, який проявляється

зменшенням вираженості запального та аутоімунного процесів, блокадою механізмів «первинної» аксонопатії; зменшенням активності процесу демієлінізації та подальшої дегенерації аксонів, тобто запобіганням «вторинної» аксонопатії; стимуляцією продукції клітинами нервової тканини і крові нейропротекторних чинників, що впливають на «виживання» і відновлення нервових клітин і волокон.

Перші два механізми добре вивчені в експерименті, третій — може бути певною мірою пов'язаний з продукцією НТФ, які відіграють важливу роль у природній нейропротекції і, не виключено, в «індукованій».

НТФ вважають найбільш перспективними нейропротекторами, що регулюють як вираженість, так і швидкість апоптозу. Нейротрофіни стимулюють диференціацію нейронів, індукують ріст дендритів і аксонів у напрямку клітин-мішеней, впливають на проліферацію і диференціювання олігодендроцитів, активність мієлінізації та ремієлінізації.

Залежно від нейрональної специфічності виділяють такі сімейства НТФ: 1) нейротрофіни або фактори росту нервів (ФРН); 2) фактори росту фібробластів (ФРФ); 3) трансформуючий ростовий фактор β (ТРФ- β).

Сімейство ФРН включає brain-derived neurotrophic factor (BDNF), нейротрофіни NT-3, NT-4, NT-5, NT-6 і ciliary neurotrophic factor (CNTF), які стимулюють ріст і диференціювання сенсорних і симпатичних нейронів в ембріогенезі; беруть участь у дозріванні специфічних груп периферичних і центральних нейронів; є індукторами синтезу цілої низки нейропептидів чутливих нейронів.

Сімейство ФРФ включає кислий ФРФ (acid FGF(aFGF, чи FGF-1)), основний ФРФ (basic FGF (bFGF, чи FGF-2)) та інші ФРФ (FGF-3, 4, 5, 6, 7). ФРФ впливають на різні типи клітин ЦНС, включаючи астроцити і більшість нейронів, разом з іншими нейротрофінами беруть участь у кортикогенезі, регулюють розподіл і диференціювання нейроектодермальних клітин.

Сімейство ТРФ- β об'єднує 5 структурно подібних ТРФ- β -білків, а також інгібіни, активіни та інші біологічно активні білки. Біологічні ефекти ТРФ- β

визначаються його властивостями ростового фактора, наприклад, збільшення продукції цього цитокіну відзначають при травмах мозку. З іншого боку, він пригнічує проліферацію астроцитів.

Усі НТФ вивчають як потенційні лікарські препарати, які можна застосовувати з метою контролю процесів дегенерації нейронів і нейропротекції [52].

Нейрохірургічні способи — один з сучасних підходів у лікуванні демієлінізуючих захворювань [34, 48, 49]. Введення у речовину мозку та лікворні простори (інтрапаренхімальне введення, в ліквор великої потиличної цистерни або поперекового відділу) лікарських засобів і клітин дозволяє уникнути проблем, що виникають за системного застосування нових препаратів: у кілька разів зменшити їх дози, забезпечити доставку у вогнища демієлінізації трофічних факторів, генних конструкцій і клітин, уникнути їх небажаного швидкого розпаду [43].

НТФ не здатні самотійно проникати через гематоенцефалічний бар'єр, основними шляхами їх введення є інтрапаренхімальний, внутрішньошлуночковий, внутрішньолікворний. Принципово іншим способом збільшення вмісту НТФ у ЦНС є перенос їх генів за допомогою вірусного вектору — шляхом прямого введення рекомбінантного вектора або непрямого — у складі трансплантованих клітин, інфікованих *in vitro* рекомбінантним вірусним вектором. Збільшенню концентрації НТФ у ЦНС сприяє трансплантація ембріональної нервової тканини [34, 48]. Нейротрансплантат містить ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), виділяє широкий спектр НТФ і стимулюючих факторів. Ембріональні НТФ можуть стимулювати проліферацію мультипотентних клітин-попередників у мозку дорослих осіб, диференціювання нейро- і гліобластів самих ембріональних трансплантатів [47]. За наявності нейродегенеративних змін визначають доцільність алотрансплантації нервової тканини у вогнища ушкодження нейронів, за загрози виникнення ушкодження нейронів — ефективність різних нейротрофічних факторів [47, 53, 54].

При нейрохірургічному лікуванні демієлінізуючих захворювань можливе

використання таких похідних ембріональної нервової тканини (ЕНК):

- нейротрофінів, які підсилюють продукцію клітинами ЦНС ФРН;
- цитокінів, наприклад, IL-6, рiсттрансформуючого фактора;
- екстрактів ЕНК (трофiн);
- кріоконсервованих ембріональних тканин, що містять ЕСК і клітини-попередники і сприяють ремієлінізації;
- кріоконсервованих клітин ембріональної нервової системи;
- стовбурових клітин ЦНС, які можуть диференціюватися у попередники і зрілі нейрони, стромальні клітини, підвищуючи репаративні можливості ЦНС [33, 46, 52, 55 – 62].

Застосування трофічних факторів і клітин ЕНТ при лікуванні демієлінізуючих захворювань людини нейрохірургічними методами доцільне та теоретично обґрунтоване. Проте, існує низка невирішених питань. Невивчений можливий вплив компонентів ЕНТ на імунопатогенез, активність аутоімуних реакцій; ці аспекти потребують додаткового вивчення, але такі дослідження поодинокі. За даними експериментальних досліджень, нейрохірургічне лікування (введення екстракту з ЕНТ) при ЕАЕ сприяло прискоренню відновлення рухових функцій у щурів; відзначали прискорення ремієлінізації аксонів, зміни в імунній системі, які свідчили про відновлення клітинного балансу та функціональної активності лімфоцитів [63].

У науковій літературі дискутується можливість лікування при РС з використанням білків ЦНС та їх аналогів, проте, такі методи терапії не тотожні застосуванню ембріональної тканини і стовбурових клітин.

В останні роки при лікуванні хворих з демієлінізуючими захворюваннями ЦНС і РС почали застосовувати імуномодельуючу терапію з використанням фетальних гемопоетичних і нейрогенних клітин (ФНК) [44]. Однак, вплив ФНК на апоптичні процеси в ЦНС и тімусі при РС і його експериментальній моделі (ЕАЕ) вивчені недостатньо [64]. В експерименті також апробуються методи клітинної терапії з використанням мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих з різних джерел [65]. Обґрунтуванням цьому є результати низки експериментальних

досліджень, в яких доведена здатність до міграції МСК, отриманих із жирової тканини, в демієлінізовані відділи мозку при ЕАЕ. Показано, що трансплантація МСК при ЕАЕ у мишей сприяє відновленню кількості ендогенних олігодендроцитів, які забезпечують ремієлінізацію ушкоджених нервових волокон [66]. На моделі ЕАЕ у щурів встановлено, що трансплантація МСК може також пригнічувати аутореактивні клони лімфоцитів, сприяти репарації мієлінової оболонки ушкоджених аксонів з відновленням неврологічних функцій [65]. Вважається доведеним, що мультипотентні МСК сприяють активації ендогенних механізмів репарації за рахунок секреції розчинних трофічних факторів. Цікавим є встановлений факт, що основні ефекти, які спостерігаються при трансплантації МСК, можуть бути відтворені при введенні кондиціонованої цими клітинами сироватки [67]. Останнім часом також встановлено, що аутологічна трансплантація МСК у хворих на РС дозволяє стабілізувати неврологічний статус і понизити ризик виникнення активних вогнищ демієлінізації. Окрім цього, застосування МСК при демієлінізуючих захворюваннях дозволить забезпечити імуномодуючий ефект без застосування імуносупресивної терапії [68].

Незважаючи на неповне розуміння етіопатогенезу аутоімунних захворювань, на сьогоднішній день визначена провідна роль багатьох цитокінів у патогенезі енцефаломієліта і РС [68]. Так, встановлено, що такі цитокіни, як фактор некроза пухлини, інтерлейкін-6 стимулюють продукцію прозапальних медіаторів, які приймають участь в ушкодженні нервової тканини [27, 69]. На відміну від інтерлейкіна-6, інтерлейкін-10 (IL-10) масою біля 35 кДа, який продукується Т-хелперами 2-го типу, активує моноцити-макрофаги і регуляторні Т-клітини. Окрім того, IL-10 інгібує продукцію Т-хелперів 1-го типу і прозапальних цитокінів, у тому числі гама інтерферон (IFN- γ), інтерлейкіни 2 і 12 (IL-2, IL-12) і фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α) [56].

Це стало обґрунтуванням можливості клінічного застосування IL-10 при аутоімунних захворюваннях [27, 70]. У багатьох лабораторіях досліджують і використовують трансдукцію МСК, отриманих із кісткового мозку, IL-10 за допомогою ретровірусного вектора MIG (MSCV-IRES-GFP) і вектора MIG-

IL10 [27, 71]. Але необхідно врахувати, що очікувані результати застосування трансфікованих таким чином МСК можуть бути непередбачувані у зв'язку з недостатньо вивченими можливими шляхами розповсюдження цих клітин в організмі і властивостями самого вірусу. Тому, на нашу думку, з огляду на перспективу застосування такого підходу у клінічній практиці, доцільніше досліджувати вплив трансфікованих геном IL-10 МСК на моделі ЕАЕ без використання вірусного вектора [72 - 74].

Таким чином, аналіз сучасних уявлень про патогенез запально-дегенеративних захворювань ЦНС і механізми відновлення ушкодженої нервової тканини, результати експериментальних досліджень і клінічні спостереження дозволяють вважати нейрохірургічні методи одним з перспективних способів лікування, що сприяє забезпеченню тканини мозку достатньою кількістю НТФ, відновленню кількості попередників олігодендроцитів, забезпечує доставку стовбурових нейрональних і прогеніторних клітин, зумовлює зменшення вираженості запалення у ЦНС у гострому періоді захворювання, пригнічення клітинної аутоімунної відповіді на мієлінасоційовані білки.

Розробка нових ефективних методів лікування з використанням відновних і замісних можливостей плюріпотентних стовбурових клітин різного походження забезпечить позитивний вплив на всі складові патогенезу цього захворювання.

Розробка і впровадження лікувальних стратегій повинна бути спрямована на забезпечення протизапальної дії, супресії деструктивного аутоімунитету, створення сприятливих умов для поновлення мієліноутворення у ЦНС хворих, мінімізацію ускладнень і досягнення максимального терапевтичного ефекту.

1.2. Особливості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини людини

Обрання найбільш оптимальних джерел отримання стовбурових клітин для використання з терапевтичною метою є одним із ключових етапів в

трансплантології. На сьогодні, в клітинній терапії використовують різноманітні клітини (як дорослого організму, так і ембріональні), особливе місце серед яких займають мезенхімальні стовбурові (мультипотентні стромальні) клітини (МСК). Це зумовлено, в першу чергу, їх імунокоригуючими властивостями, здатністю диференціюватись в декілька типів клітин, можливістю отримання великої кількості клітин за короткий термін та відносною простотою культивування. Опубліковано дані про виявлення та успішне виділення МСК практично з усіх тканин організму [75, 76], але основна увага приділяється таким джерелам клітин, як кістковий мозок, жирова тканина і провізорні ембріональні тканини (плацента, пуповина і т.д.). Описуючи культури МСК, найчастіше мають на увазі клітини, отримані з кісткового мозку або жирової тканини [77, 78]. Ці клітини належать до категорії дорослих стовбурових клітин і, відповідно, мають деякі обмеження щодо застосування у медицині, які пов'язані з особливостями реакції на них імунної системи реципієнта, навіть у випадках алотрансплантації. Незважаючи на спільну назву, МСК з різних джерел мають значні відмінності у доступності та безпечності [79, 80].

Вартонові драглі пуповини (пупкового канатика), на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, містять клітини, які збереглися з ранніх етапів ембріогенезу. Пуповина, як похідне жовткового мішка та алантоїсу, містить примітивну форму позазародкової мезенхіми – мукозну сполучну тканину (Вартонові драглі) [81], яка за своїм клітинним складом та будовою займає проміжне становище між ембріональною мезенхімою та дорослою сполучною тканиною [82]. В її клітинному складі переважають фібробластоподібні клітини, що активно синтезують глікозаміноглікани, та, за думкою деяких авторів, зберігають не мультипотентний (на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, які є мезенхімальними стовбуровими клітинами дорослого організму), а навіть плюрипотентний стовбуровий потенціал [83]. Є дані [84] про можливість експресії ними ембріональних маркерів Oct4 і Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1, SSEA-4). Вони мають дещо

відмінний від зрілого імунофенотип, що відкриває додаткові можливості для алотрансплантації [85, 86].

Отримання клітин з пуповини не створює морально-етичного конфлікту, процедура ізолювання МСК з пупкового канатика є досить простою. Розроблені і впроваджені ефективні методи кріоконсервації МСК [46].

В дослідях з тваринами після імуносупресії доведено, що внутрішньовенне або підшкірне введення таких клітин не приводить до їх відторгнення або критичного негативного впливу. На звичайних тваринах без імуносупресії показано, що принаймні однократна трансплантація ксеногенних клітин Вартонових драглів пуповини можлива без їх негайного відторгнення. Дані літератури засвідчують більш виражені імуносупресивні властивості МСК пуповини в порівнянні з аналогічними клітинами з інших джерел, що, поряд з іншими перевагами, свідчить про перспективність використання їх в регенеративній медицині.

На сьогоднішній день актуальними напрямками досліджень біології МСК з Вартонових драглів пуповини є розробка та удосконалення оптимальних методів виділення, ідентифікації і отримання достатньої для клінічного застосування кількості клітин зі збереженням їх нативних характеристик. Не вивченими залишаються питання якісного складу і зміни фенотипових характеристик клітин в умовах культивування. Незважаючи на вивчення окремих властивостей МСК з Вартонових драглів пуповини людини, відсутні роботи про можливість їх використання з терапевтичною метою перш за все на тваринах.

Тому розробка протоколу отримання МСК з Вартонових драглів пуповини людини, дослідження їх біологічних властивостей в умовах культивування, можливості їх застосування при модельному демієлінізуючому процесі є предметом даного дослідження..

1.3. Оптимізація моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з хронічним рецидивуючим перебігом

Незважаючи на багаторічні різнобічні дослідження патогенезу демієлінізуючих захворювань центральної нервової системи (ЦНС), і, зокрема, розсіяного склерозу (РС), їх лікування залишається невирішеною проблемою сучасної медицини. В той же час протягом останніх 15 років у цій галузі досягнуті значні успіхи: сформувалася концепція гетерогенності нозологічних форм цих захворювань, описані нові та атипові клінічні їх форми у центральних та периферичних відділах нервової системи, ідентифіковані нові антигени, розроблені і впроваджені у практику діагностичні панелі аутоантитіл, апробовані нові лікарські засоби для імунотерапії, досліджуються біомаркери демієлінізуючих захворювань нервової системи, розробляються програми їх патогенетичної терапії [1].

Поряд з тим, значна увага приділяється розробці альтернативних методів лікування демієлінізуючих захворювань ЦНС з використанням клітинної терапії фетальними та стовбуровими клітинами різного генезу. У зв'язку з цим особливу актуальність набуває наявність надійної експериментальної моделі, яка відтворює демієлінізуючий процес у ЦНС, подібний до такого при РС. У численних спостереженнях показано, що за клінічними проявами та гістологічною картиною експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ), який індукується антигенами мієліну та опосередковується Т-клітинами, має значну схожість з РС і може вважатись його модельним еквівалентом. Жодна з описаних моделей ЕАЕ не повторює всіх особливостей патоморфологічного перебігу РС. У зв'язку з цим проводяться подальші пошуки методів відтворення більш адекватних експериментальних моделей РС з розвитком хронічного демієлінізуючого процесу у ЦНС [3].

Відомо, що вивчення і моделювання ЕАЕ має багаторічну історію [87]. Після введення в клінічну практику антирабічних щеплень з'явилися перші повідомлення про випадки розвитку у пацієнтів гострого енцефаломієліту,

який пов'язували з їх токсичним впливом або сенсibilізуючими властивостями нервової тканини. При застосуванні нейротоксичних сироваток у піддослідних тварин іноді виникали паралічі кінцівок. Подібний ефект спостерігався після введення тваринам великої дози гомогенату з нормальної мозкової речовини. Виявилося, що нервова тканина має слабкі сенсibilізуючі алергійні властивості і розвиток паралічів кінцівок у тварин спостерігався лише після тривалої багаторазової імунізації [88].

Подібний ефект впливу на мозкову тканину виявлений після введення токсинів, чужорідних сироваток, інфікування вірусами [89]. Але рухові розлади виникали не у всіх тварин, що не дозволяло зробити однозначні висновки. В деяких дослідженнях також показана можливість індукції ЕАЕ у тварин введенням окремих фракцій мозкової тканини [89, 90], дендритних клітин [91], коклюшного токсину [90, 92]. Подальший пошук методу отримання адекватної моделі ЕАЕ пов'язаний із застосуванням очищеного мієліну, енцефалітогенних білків, поліпептидів [90, 93, 94], при використанні яких характер розвитку симптоматики захворювання у тварин був більш однотиповим.

Для розуміння патогенезу ЕАЕ важливе значення має також вивчення природи енцефалітогенного фактора та механізму дії стимуляторів, які підсилюють антигенні властивості мозкової тканини [95]. Так, встановлено, що біла речовина мозку є більш енцефалітогенною, ніж сіра, що пояснюється наявністю мієліну у білій речовині [96].

Обнадійливі результати при моделюванні ЕАЕ були отримані після застосування повного ад'юванту Фрейнда (АФ), який є водно-масляною емульсією з інактивованими клітинами *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, або містить інактивовані клітини *Mycobacterium tuberculosis*, мінеральну олію, деривати ланоліну та емульгатор [88]. При введенні тваринам АФ з антигеном значно зростає продукція антитіл до останнього. Показано, що одночасне введення АФ з суспензією мозкової тканини ЦНС як гомологічного, так і гетерологічного походження, значно прискорює розвиток ЕАЕ у тварин [89, 97]. Такий підхід дозволяє вивчати процеси де- і ремієлінізації у ЦНС та

імунологічні зміни при демієлінізуючих захворюваннях нервової системи [89, 98, 99].

З метою моделювання ЕАЕ найчастіше енцефалітогенну емульсію вводять внутрішньошкірно в подушечки пальців ступні тварин [97]. При цьому важкість перебігу ЕАЕ залежить від кількості введеної мозкової речовини, складу стимулятора і співвідношення його інгредієнтів, а також від взаємодії між компонентами енцефалітогенної емульсії та шляхів інюкуляції.

Характерним для ЕАЕ є гострий перебіг з високою летальністю експериментальних тварин, яка може сягати 50-70% [3, 87, 89, 99, 100].

Інкубаційний період становить від 8 до 30 діб. Захворювання швидко прогресує та характеризується такими клінічними проявами як схуднення тварин, зменшення рухливості, розвиток парезів і паралічів кінцівок, порушення координації рухів та функції тазових органів [101]. При хронічному ремітуючому перебігу ЕАЕ у тварин відзначається випадіння волосся, розвиваються трофічні виразки на кінцівках [89, 102]. При патоморфологічному дослідженні спостерігається переважання ознак демієлінізації нервових волокон над запальними змінами.

Наведені дані літератури дають підстави стверджувати, що гострий ЕАЕ у тварин не є цілком адекватною моделлю демієлінізуючих захворювань з хронічним перебігом подібно РС людини [97, 102]. При цьому, жодна з існуючих моделей ЕАЕ не відтворює РС з хронічним перебігом та ремітуючим характером клінічної картини. Крім того гістологічні особливості відрізняються при різних методах індукції демієлінізуючого процесу у нервовій тканині, а клінічні ознаки захворювання не завжди корелюють з патоморфологічними змінами – досить часто у тварин при відсутності клінічних симптомів виникають множинні вогнища запалення у ЦНС. У зв'язку з цим необхідні подальші пошуки експериментального підбору адекватної дози АФ і відповідно концентрації інактивованих туберкульозних бактерій для отримання удосконаленої моделі ЕАЕ. Особливого значення набуває наявність надійної моделі ЕАЕ в розробці

нових сучасних підходів до лікування демієлінізуючих захворювань ЦНС з використанням клітинної терапії.

Представлений нами короткий огляд літератури засвідчує, що на сьогоднішній день, комплексне застосування класичної патоморфології і сучасних методів молекулярної нейробіології, цитохімії і цитоморфології, сприяло вивченню і розумінню ряду механізмів у патогенезі демієлінізуючих процесів ЦНС. Незважаючи на це, багато аспектів цих станів залишаються не вивченими і потребують залучення до лікування альтернативних ефективних можливостей стовбурових клітин, із забезпеченням мінімізації ускладнень і досягнення максимального ефекту. Важливим при цьому є також використання уніфікованих відтворюваних, якісних, етично прийнятних моделей патологічних станів. Дотримання цих умов у подальшому дозволить об'єктивно оцінити клінічну ефективність нових методів лікування і визначити показання до застосування інноваційних методик лікування демієлінізуючих уражень ЦНС із застосуванням клітинної терапії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Методика виділення, визначення біологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів пуповини в умовах культивування

2.1.1 Виділення МСК

Виділення МСК і дослідження їх характеристик проведені співробітниками Інститута молекулярної біології НАН України під керівництвом академіка НАМН України, чл.-кор. НАН В.А. Кордюма згідно договору про співпрацю (№115 від 07.04.2017). Пупковий канатик максимально відмивали від крові, на 20-30 хвилин вміщували в нове поживне середовище Ігла або ДМЕМ з антибіотиками – пеніцилін і стрептоміцин по 1000 од/мл та 1000 мкг/мл, відповідно, антимікотиком (Амфотеріцин Б, 50 од/мл). Усі маніпуляції проводили у стерильних умовах. Перед початком обробки з пупкового канатика вилучали судини – одну вену та дві артерії та відокремлювали Вартонові драгли, які подрібнювали ножицями до найменш можливого розміру 0,1-0,5 см та вміщували в культуральний флакон на 25 см² або 75 см² з теплим (37°C) ростовим поживним середовищем альфа-MEM (BioWest, Іспанія), 10% фетальної сироватки ВРХ (HyClone, США), 2мМ L-глютаміну (Sigma, США) та 10 нМ FGF («ІнтерфармБіотек», Україна). Культивування проводили у СО₂-інкубаторі (37°C, 5% СО₂). Через 7-14 днів отримували з експлантів клітини та перші клони, які вирощували до досягнення 70% моношару культурального флакону. Поживне середовище змінювали один раз на 3 дні. Щоденно проводили спостереження за станом клітин в інвертованому світловому мікроскопі LEICA DMIL на збільшенні ×80. Всі морфометричні аналізи виконували за допомогою програми Image J.

Клітини в клонах являють собою матеріал нульового пасажу поза організмом. Для пасажування клітин за стандартною методикою використовували розчини 0,02% Версену та 0,25% трипсину у співвідношенні

1:1. Клітини висівали із розрахунку 10^4 клітин на см^2 , доводячи клітини до 2 пасажу в культурі, після чого їх характеризували за морфологією, поверхневими маркерами та використовували для подальшого введення піддослідним тваринам (проводили дослідження впливу МСК на експериментальних моделях).

2.1.2 Методи морфологічних досліджень МСК

Для вивчення морфології клітин у культурі застосовували методику забарвлення за допомогою гематоксиліну та еозину, адаптовану для використання у культурах клітин. Забарвлення клітин у чашках Петрі проводили за кімнатної температури (22°C). Перед забарвленням з чашок видаляли культуральне середовище, клітини фіксували 4% розчином формаліну протягом 10 хв. об'ємом 2 мл формаліну на чашку. Для відмивки від фіксатора використовували забуферений фізіологічний розчин (по 4мл на чашку). Для забарвлення використовували водний розчин гематоксиліну Бьомера та водний розчин еозину. Гематоксилін об'ємом 2мл додавали у чашку та витримували 10 хв. Відмивку проводили проточною водопровідною водою, додаючи 4мл води на чашку. Повторювали відмивку 4 рази. Далі додавали у кожную чашку по 1,5 мл еозину. Витримували 3 хв. та одноразово відмивали водою, додаючи по 2мл у чашку. Важливою умовою вдалої візуалізації є постійне підтримання вологості у чашках, адже пересихаючі клітини деформуються та набувають нетипових ознак. Цитоплазма клітин забарвлювалась у рожево-бузковий колір, ядро – у синьо-фіолетовий.

Забарвлення МСК проводилось з використанням ряду класичних барвників, що зазвичай застосовуються у гістохімічній практиці та при дослідженні клітин крові – за Романовським-Гімза [103]; ядерний барвник толуїдиновий синій (водний розчин 1:1000), який крім того проявляє властивості метакромазії, забарвлюючи основну речовину хряща; основний барвник альціановий синій, котрий при значеннях рН від 3 до 5 забарвлював

не тільки нуклеїнові кислоти, але й кислі мукополісахариди [104]. Також було проведено оцінку тонкої будови клітин за допомогою флуоресцентної та конфокальної мікроскопії.

Перевіряли якість забарвлення під інвертованим світловим мікроскопом LEICA DMIL на збільшенні x100. Фотографії отримували за допомогою апарату Canon Power Shot A640.

Ядерні барвники. Для забарвлення ядерної ДНК використовували реагенти-інтеркалятори: Hoechst 33342, DAPI та Ethidium bromid. Hoechst 33342 та інші його варіанти є найбільш поширеними у сучасних цитологічних дослідженнях барвниками для візуалізації ДНК ядер у різних об'єктів [105]. Специфічність взаємодії Hoechst 33342 з ДНК пояснюється його розташуванням у малій борозні ДНК [106, 107], що обумовлює появу голубої люмінесценції в ядрах. Для забарвлення препаратів Hoechst 33342 використовували в концентрації 5 мкг/мл, інкубували протягом 3-5 хв при температурі 37°C. На конфокальному мікроскопі максимум збудження світіння Hoechst 33342 знаходився при 405 нм, а максимум емісії – при 420-480 нм. Таку ж високу специфічність відносно забарвлення ДНК проявляє і інший флуорохром – DAPI – діамідинофенолідол [108]. Забарвлення проводили протягом 3-5 хв. при 37 °C. Максимум збудження DAPI відповідав 350 нм, а максимум емісії – 470 нм. Етідіум бромід (Ethidium bromid) – зручний в роботі флуорохром, який використовувався в концентрації 2 мкг/мл при забарвленні протягом 2-5 хв. Збудження флуоресценції у етідіум броміда 488 нм, випромінювання – 560 нм.

2.1.3 Визначення експресії поверхневих маркерів

FACS-аналіз експресії маркерів MCK (CD105, CD90, CD73 , CD34) як мінімальних критеріїв для визначення мезенхімальних стовбурових клітин згідно з рекомендаціями Міжнародного товариства клітинної терапії [109] виконували на сортері «BD FACSAria» із застосуванням програмного забезпечення «BD FACS Diva» у відділі клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут

генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Більш ніж 95 % клітин 2-го пасажу були позитивними за вказаними маркерами.

МСК 2-го пасажу трансфікували плазмідною, що містить кДНК-овий варіант гена IL-10 і маркерний ген зеленого флуоресцентного білка (GFP) під регуляцією конститутивного промотора ранніх генів цитомегаловірусу. Трансфекцію проводили за допомогою трансфекційного реагенту Turbo Fect (Termo Scientific) за протоколом фірми-виробника. Через 24 години після початку трансфекційної процедури МСКТ відкріплювали від субстрату за допомогою розчину трипсину і ЕДТА, ресуспендували у фосфатному буфері в об'ємі 100 мкл і вводили експериментальним щурам субокипітально у кількості 1 млн клітин на тварину. Паралельну пробу аналізували методом проточної цитофлуориметрії на FACS Aria і визначали відсоток трансфікованих клітин за маркерним білком GFP. Ця величина становила 20%.

2.2 Оптимізація моделювання експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом

Дослідження проведені на 32 безпородних статевозрілих щурах-самицях вагою 200-230 г розведення віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України». Всі процедури з дослідними тваринами виконували у відповідності з міжнародними правилами і нормами European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC та згідно принципів «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» от 21.20.2006 [110, 111].

ЕАЕ індукували за стандартною методикою [96] шляхом одноразового введення підшкірно у подушечки задніх кінцівок по 2 мл суспензії, яка містила гомогенат спинного мозку дорослих щурів, гомогенізований у фізіологічному розчині і емульгований у співвідношенні 1:1, 1:2, 1:3 з повним АФ Sigma (США), що містить 2 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis*). ЕС вводили в подушечки задніх

кінцівок. Для стандартизації клінічного перебігу та вираженості трофічних розладів у щурів ЕАЕ моделювали з ретельним контролем кількості введеної ЕС та однаковим місцем інокуляції в обидві задні кінцівки.

Тварин поділили на 4 експериментальні групи: інтактні тварини ($n=12$); щури з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ ($n=8$); тварини з ЕАЕ, індукованим подвійною ($n=6$) та потрійною ($n=6$) дозою АФ. У останніх двох групах тварин проведені лише патоморфологічні дослідження поперекового відділу спинного мозку на 35-у і 60-у добу спостереження, поведінкові реакції цих дослідних тварин спостерігати не вдалося у зв'язку з різким погіршенням їх загального стану і смертю половини тварин з кожної групи. У тварин з подвійною дозою вже на 12-у добу відмічалися численні парези задніх лап та хвоста, болісність лап, наявність трофічних язв, що перешкоджало їх обстеженню у «відкритому полі».

Дослідження поведінкових реакцій за тестом «відкрите поле» інтактних щурів і щурів першої групи проводили на 12-у добу (початок виявлення патологічних неврологічних симптомів) [44, 97] згідно [112, 113] протягом 10 хвилин за показниками горизонтальної (перетин центральних та периферійних квадратів) та вертикальної локомоторної активності (вставання на задні лапи – вертикальні стійки), дослідницької активності (заглядання у нірки), емоційної активності (грумінг і дефекація (кількість болюсів)). За допомогою програмно-комп'ютерного комплексу дослідження поведінкових реакцій тварин реєстрували: латентний період (LP), кількість епізодів за перші 5 хвилин (n_1), кількість епізодів у наступні 5 хвилин (n_2), загальну кількість епізодів за 10 хвилин спостережень (n_s), тривалість епізодів за перші 5 хвилин (T_1), тривалість епізодів у наступні 5 хвилин (T_2), загальну тривалість епізодів (T_s), середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хвилин (t_1), середню тривалість окремого епізоду у наступні 5 хвилин (t_2) та середню тривалість окремого епізоду за 10 хвилин спостережень (t_s).

Статистичну обробку отриманих кількісних показників проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і Statistica-6.1. Вірогідність відмінностей оцінювали з використанням непарного

непараметричного U критерію Манна-Уїтні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

Забір тканини поперекового потовщення спинного мозку експериментальних тварин проводили на 35-у і 60-у добу експерименту після внутрішньочеревинного передозування засобів для наркозу. Для світлової мікроскопії виділені фрагменти поперекового відділу спинного мозку фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну і проводили через стандартну парафінову заливку. З отриманих блоків на мікротомі Microm HM430 (Німеччина) готували серійні тонкі зрізи завтовшки 5-7 мкм, які фарбували класичними оглядовими барвниками – гематоксилін – еозином та гематоксилін – пікрофуксином. Для селективного дослідження тонкої цитоструктури нейронів сірої речовини спинного мозку застосовували також нейрогістологічний метод Ніссля (фарбування тіонином, Janssen Chimica). Гістологічні препарати досліджували на біокулярному мікроскопі NIKON (Японія) з наступною мікрофотодокументацією на цитоаналізаторі зображення IBAS-2000 (Німеччина) при збільшеннях мікроскопу $\times 400$ та $\times 800$.

На гістологічних препаратах спинного мозку піддослідних тварин з модельованим ЕАЕ оцінювали патологічні зрушення у гістоструктурі тканини спинного мозку: наявність та поширеність демієлінізації аксонів, запальної інфільтрації та ознак набряку, вираженість дистрофічних та некробіотичних змін у нервових клітинах. Для виявлення змін у складі нейрональної популяції сірої речовини спинного мозку тварин з модельованим ЕАЕ використали морфометричний метод процентного визначення нейронів з ознаками дистрофічних та некробіотичних змін, які підраховували у 10 полях зору на гістологічних препаратах. Цитоструктурні ознаки патології нейроцитів оцінювали згідно класичним критеріям за загальноприйнятою класифікацією [114]. Отримані результати наведені у вигляді вибірових середніх значень (середнє арифметичне, медіана), стандартної похибки вибіркового середнього арифметичного та інтерквартильного діапазону. Оскільки перевірка отриманих даних не підтвердила, що закон розподілу нормальний, для статистичної обробки результатів застосовували непараметричні методи варіаційної статистики: непараметричний

критерій Манна–Уїтні для порівняння 2 незалежних груп та ранговий дискримінантний аналіз, заснований на сумах рангів Фрідмана з використанням пакету програм MS Excel 2003 [115] і STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., <http://www.statsoft.ru>). Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка.

2.3. Дизайн дослідження

Дослідження проведено на 104 статевозрілих білих безпородних щурах-самицях виводку віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», вагою 230 ± 20 г, віком 3 міс. Тварини утримувалися з забезпеченням вільного доступу до їжі та води. Всі процедури виконували у відповідності з міжнародними правилами і нормами біоетики.

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 – 2,0 бали) з хронічним ремітуючим перебігом [80, 96, 99]. Саме хронічно ремітуюча форма ЕАЕ дозволяє більш детально вивчити вплив різних факторів на перебіг демієлінізуючого процесу та уникнути високої летальності експериментальних тварин, яка за даними деяких дослідників при гострому ЕАЕ доходить до 30 - 60% [99].

Тварин з модельованим ЕАЕ розподілили на декілька груп (табл. 2.1.), яким з експериментальною метою внутрішньовенно (рис. 2.1.) або субокципітально вводили у різних поєднаннях інтерлейкін-10 (IL-10) та МСК Вартонових драглів пуповини людини. При трансплантації МСК, кожній тварині вводили 1×10^6 клітин 2-го пасажу ксеногенних МСК у 100 мкл фізіологічного розчину. При лікуванні IL-10 кожній тварині вводили 1 мкг рекомбінантного білку (IL-10) у фосфатному буфері загальним об'ємом 100 мкл (Табл.2.3). У групі щурів №4 інтерлейкін- 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.



Рис.2.1. Введення інтерлейкіну 10 у хвостову вену щура

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 поверхневих вен, який суттєво полегшує внутрішньовенне введення суспензії.

Таблиця 2.1

Розподіл тварин у експерименті

Група	Кількість тварин	Групи тварин у залежності від проведених маніпуляцій
1	28	Група порівняння (ЕАЕ)
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	Інтактні щури

Оперативні втручання здійснювали за загального знеболення, що досягали шляхом внутрішньочеревного введення суміші розчинів ксилазіну (“Sedazin”, “Biovet”, Польща; 15 мг/кг) і кетаміну (“Calypsol”, “Теден Ріхтер А.О.”, Угорщина; 70 мг/кг).

Для субокципітального введення суспензії МСК на 17 добу після індукції ЕАЕ задню поверхню шиї та потилицю тварин 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 (1×10^6 нативних клітин).

2.4. Методика дослідження виживання мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини людини в центральній нервовій системі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом після їх субокципітального введення

МСК Вартонових драглів пуповини людини 2-го пасажу вводили 6 тваринам на піку захворювання на 17-у добу після індукції ЕАЕ субокципітально у ліквор великої потиличної цистерни у кількості 1×10^6 . Групою порівняння були тварини з ЕАЕ. Забір матеріалу для досліджень (поперекове потовщення, стовбур мозку в області великої потиличної цистерни, ліквор, півкулі головного мозку) проводили на 5 і 8 добу після трансплантації.

Етап роботи проведено співробітниками Інститута молекулярної біології та генетики НАН України під керівництвом академіка НАН В.А.Кордюма. Геномну ДНК екстрагували з клітин спинно-мозкової рідини за допомогою методу висолювання відповідно до [116], з головного і спинного мозку тканин - з використанням методу [117]. ДНК, отриману із тканин щура групи порівняння (ЕАЕ), використовували як негативний контроль, а ДНК МСК було використано в якості позитивного контролю. Концентрація ДНК і чистота були визначені за показником оптичної щільності з використанням спектрофотометра Thermo Scientific Nano Drop 2000 UV Vis. (США).

Для ідентифікації клітин людини використовували ПЛР-аналіз зі специфічними до альфа-сателітних послідовностей ДНК людини праймерами. Стандартизовану ПЛР виконували відповідно до [118].

Всі аналізи були виконані у двох повторах. В кожній реакції використовували однакову кількість геномної ДНК-матриці. Продукти реакції були візуалізовані за допомогою електрофорезу в 1,2% агарозному гелі.

Чутливість ПЛР-аналізу становила приблизно 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.

2.5. Дослідження поведінкових реакцій та клінічного перебігу ЕАЕ у щурів після інтратекального введення МСК і інтерлейкіна-10

2.5.1. Методика дослідження поведінкових реакцій тварин

Оцінка функціонального стану ЦНС тварин є необхідною складовою при проведенні експерименту з вивченням негативного впливу ЕАЕ на нервову систему. Одним із методів оцінки стану нервової системи є дослідження поведінкових реакцій, які базуються на вивченні орієнтовно-дослідницької реакції тварин. Групи тварин представлено в табл. 2.3. Поведінкові реакції щурів досліджуються у тесті «відкрите поле», який є найбільш поширеним та широко застосовується для вивчення поведінки гризунів в стресогенних умовах, дозволяє оцінити вираженість і динаміку окремих поведінкових елементів, рухову активність, стратегію дослідницького запам'ятовування обстановочних стимулів, рівень емоційно-поведінкової реактивності тварини.

Експериментальна установка «відкрите поле» – це велика квадратна камера (90x90 см) з чорними, непрозорими пластиковими стінками висотою 49 см, підлога зроблена з чорного, непрозорого пластика та розкреслена на 36 квадратів розмірами 15x15 см, з яких виділяли периферійні, прилеглі до стінок установки (20 штук) та центральні (16 штук), і має 16 отворів (діаметром 1 см) (імітація

«нірок»). Для освітлення пристрою використовували денне світло. Щурів розміщували в центр «відкритого поля» і протягом 10 хв досліджували горизонтальну локомоторну активність (перетин центральних і периферійних квадратів), вертикальну локомоторну активність (вертикальні стійки), дослідницьку активність («заглядання в нірки») та емоційну активність (грумінг та дефекація за кількістю фекальних болюсів).

Поведінкові реакції щурів груп досліджували за тестом „відкрите поле” тричі: на 12-у, 15-у та 24-у добу після індукції ЕАЕ. Перше та друге тестування дослідних тварин проводили для вивчення ступеню розвитку ЕАЕ у тварин, третє тестування проводилось на 7-му добу після субокципітального введення МСК (або МСКТ) для вивчення впливу лікування на поведінкові реакції тварин з ЕАЕ згідно [112, 113].

Адаптивну поведінку тварин оцінювали за тестом „відкрите поле” протягом 10 хвилин (за перші 5 хвилин, за другі 5 хвилин та за 10 хвилин дослідження – сумарний показник) по показниках горизонтальної (перетин центральних та периферійних квадратів) та вертикальної локомоторної активності (вставання на задні лапи – вертикальні стійки), дослідницької активності (заглядання у нірки), емоційної активності (грумінг і дефекація (кількість болюсів)). За допомогою програмно-комп'ютерного комплексу по дослідженню поведінкових реакцій тварин реєстрували: латентний період (LP), кількість епізодів за перші 5 хвилин (n_1), кількість епізодів за другі 5 хвилин (n_2), загальну кількість епізодів за 10 хвилин спостережень (n_s), тривалість епізодів за перші 5 хвилин (T_1), тривалість епізодів за другі 5 хвилин (T_2), загальну тривалість епізодів (T_s), середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хвилин (t_1), середню тривалість окремого епізоду за другі 5 хвилин (t_2) та середню тривалість окремого епізоду за 10 хвилин спостережень (t_s).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і Statistica–6.1. Вірогідність відмінностей оцінювали з використанням непарного непараметричного U критерію Манна-Уїтні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

2.5.2. Методика дослідження клінічного перебігу ЕАЕ

Клінічний перебіг ЕАЕ щурів оцінювали за бальною шкалою (табл.2.2.) [119].

Таблиця 2.2.

Шкала тяжкості ЕАЕ

Бали	Прояви
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

Експериментальні групи тварин представлено в табл. 2.1. Клінічні спостереження за тваринами проводили щоденно протягом 35 діб. Для кожної тварини окремо 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. У подальшому тварин обстежували 2 рази на тиждень до 60 доби. Отримання ІЛ-10, МСК з Вартонових драглів пуповини людини, визначення їх проліферативної активності, життєздатності і вивчення фенотипових характеристик проводили і надавали для проведення експериментів співробітники ДУ «ІГРМ НАМН» та Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

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:

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

а прискорення приросту (спаду) обчислювали за формулою:

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

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

Для більшої наочності динаміки клінічного стану експериментальних тварин на графіках за допомогою стандартного програмного пакету 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 і STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., <http://www.statsoft.ru>) [120], графічне представлення результатів – MS Excel 2003.

2.6. Методика дослідження морфологічних змін тканини спинного мозку на клітинному і субклітинному рівнях у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом під впливом мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна-10

Дослідження ультраструктурних змін спинного мозку виконано на 23 самицях нелінійних білих щурів вагою 200-220 г розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» у відповідності з міжнародними правилами і нормами. ЕАЕ моделювали згідно методики, описаної в підрозділі 2.3, із хронічним ремітуючим перебігом середнього ступеня тяжкості.

Сформовано 6 груп тварин (табл. 2.1.). 18 щурам з ЕАЕ внутрішньовенно чи субокципітально вводили у різних поєднаннях ІЛ-10 та МСК, трансфіковані геном ІЛ-10 згідно [72] та нетрансфіковані МСК. Кожній тварині вводили 1

млн. ксеногенних МСК у 100 мкл фізіологічного розчину. При лікуванні ІЛ-10 кожній тварині вводили 0.1 мкг ІЛ-10 у фосфатному буфері загальною кількістю 100 мкл. У 4 групі щурів для субокципітального введення МСК разом з інтерлейкіном 10, цитокін добавляли до 1 млн. клітин безпосередньо перед їх введенням у концентрації 1 мкг / мл, при цьому об'єм суміші залишався незмінним – 100 мкл.

Клінічні спостереження за тваринами проводили до 60 доби. Забір матеріалу для світлової і електронної мікроскопії проводили на 35 і 60 добу експерименту. Для цього внутрішньочеревно вводили токсичну дозу тіопенталу натрію, проводили забір фрагментів спинного мозку 1-2 мм³ і фіксували. Для світлової оглядової мікроскопії проводку препаратів виконували за загально прийнятими методиками. Для вивчення загальної морфології клітин застосовували класичну гістологічну методику забарвлення за допомогою гематоксиліну та еозину. Перед забарвленням тканину спинного мозку фіксували 4% розчином формаліну протягом 10 хвилин. Для відмивки від фіксатора використовували забуферений фізіологічний розчин. Для забарвлення використовували водний розчин гематоксиліну Бьомера та водний розчин еозину. Відмивку проводили проточною водопровідною водою, додаючи саплером по 4 мл води на чашку. Повторювали відмивку 4 рази. Перевіряли якість забарвлення під інвертованим світловим мікроскопом LEICA DMIL на збільшенні $\times 80$.

З метою оцінки зрушень з боку нейрональної популяції у сірій речовині спинного мозку тварин з модельованим ЕАЕ під впливом ІЛ-10 та МСК у більшості дослідів визначали процентний кількісний вміст нейронів з цитоструктурними ознаками дистрофічних та некробіотичних патологічних змін, включаючи необоротно (деструктивно) змінені нейроклітини (клітини-тіні) серед загальної кількості нейронів, підрахованих в середньому у 10 полях зору на гістологічних препаратах, виведених на монітор цитоаналізатора зображення (IBAS 2000 Німеччина) при стандартних збільшеннях мікроскопу ($\times 125$). Цитоструктурні ознаки патології нейронів оцінювали згідно

класичним критеріям патоморфологічних змін нейроцитів за загальноприйнятою класифікацією типів патології нервових клітин.

Для вивчення процесів де- і ремієлінізації нервових волокон з допомогою електронної мікроскопії фрагменти тканини поперекових відділів спинного мозку фіксували в суміші 4% параформальдегіда, 2,5% глутаральдегіда і 4% сахарози на 0,1 молярному фосфатному буфері рН=7,4 з наступною дофіксацією в 1% розчині чотирьохокису осмію [122], зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу і оксіпропілена і заливали в суміш епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками електронної мікроскопії [123]. Ультратонкі зрізи товщиною 70 нм виготовлялись на ультратомі LKB [Швеція]. Для підвищення контрасту забарвлювалися за [124] і продивлялися в електронному мікроскопі ПЕМ 100-1 фірми («SELMI», Україна) за прискорювальної напруги 75 кВ. Для прицільного ультратомування і поглибленішої оцінки одержаних даних з епоксидних блоків виготовлялись напівтонкі зрізи товщиною 100-150 нм, забарвлювалися метиленовим синім-піронином і продивлялися в світлооптичному мікроскопі Ахіорфот фірми («OPTON», Німеччина).

Оцінка ступеня демієлінізації, що спостерігалась в мієлінізованих нервових волокнах поперекового відділу спинного мозку, проводилась із застосуванням розробленого нами морфометричного критерію - коефіцієнта відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осьового циліндра [125] за допомогою морфометричної обробки поперечних напівтонких зрізів на комп'ютерному аналізаторі зображень САІ-01АВН фірми «SELMI» [Україна] з використанням програмного забезпечення «Kappa 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 [120, 126]. Реалізація процедури Хольма-Бонферроні виконана засобами MS Excel 2007.

Усереднені величини представляли у вигляді $M (25\%; 75\%) (n)$, де M – медіана; $(.)$ – інтерквартильний діапазон.

Статистичний аналіз і графічне представлення результатів виконували з використанням пакета програм STATISTICA 6.1.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ
ХАРАКТЕРИСТИКА МСК ВАРТОНОВИХ ДРАГЛІВ ПУПОВИНИ

3.1. Морфологічна характеристика культур МСК з Вартонових драглів пуповини при культивуванні.

В результаті проведених досліджень були отримані культури МСК, що цілком відповідають типовим для цього типу клітин морфологічним характеристикам. Оскільки Вартонові драглі пуповини містять не тільки МСК, а й міофібробласти, фібробласти, макрофаги та інші резидентні клітини, під час отримання матеріалу нульового пасажу спостерігалась присутність різних за морфологією клітин - від округлих до фібробластоподібних (рис. 3.1).

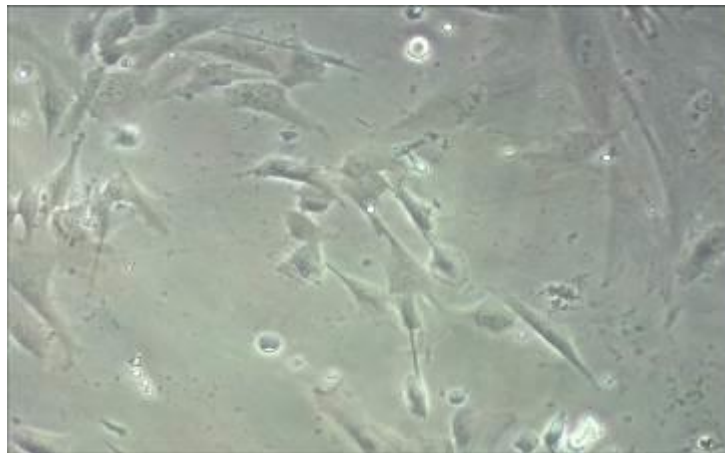


Рис. 3.1. Суспензійна культура клітин Вартонових драглів пуповини. Нульовий пасаж. Фазово-контрастна мікроскопія. 20x10

При цьому було виявлено: субпопуляцію маленьких (діаметром 10-15мкм) з гомогенною цитоплазмою, низьким (приблизно 0,25) ядерно-цитоплазматичним співвідношенням (ЯЦС), невеликим, розташованим у центрі ядром з 4-8 ядерцями, клітин без відростків, та субпопуляцію більш крупних фібробластоподібних клітин (40-70 мкм у діаметрі) з гетерогенною цитоплазмою, ще більш низьким ЯЦС, центрально розташованим ядром з 2-4 ядерцями. Ці клітини мали невелику

кількість довгих відростків. Зустрічались і клітини з одним тонким відростком та ексцентричним ядром. Крім того, спостерігались клітини більш округлої форми (діаметром 15-30 мкм) зі зміщеними ядрами з 2-5 ядерцями та підвищеною гранулярністю у навколоядерній області, а також великою кількістю коротеньких відростків, що здатні формувати щільний моно шар. Ці морфологічні характеристики відповідають літературним відомостям та є класичними для МСК людини. Якість культури клітин визначається кількістю наявних у ній веретеноподібних клітин.

При подальшому пасажуванні МСК в культурі спостерігається переважання веретеноподібних клітин (зростає процент клітин веретеноподібної форми), культура стає однорідною, і на рівні 2 пасажу практично всі клітини в культурі мають характерну веретеноподібну форму. Розмір клітин збільшується, їх довжина сягає 100-150 мкм (рис. 3.2.).

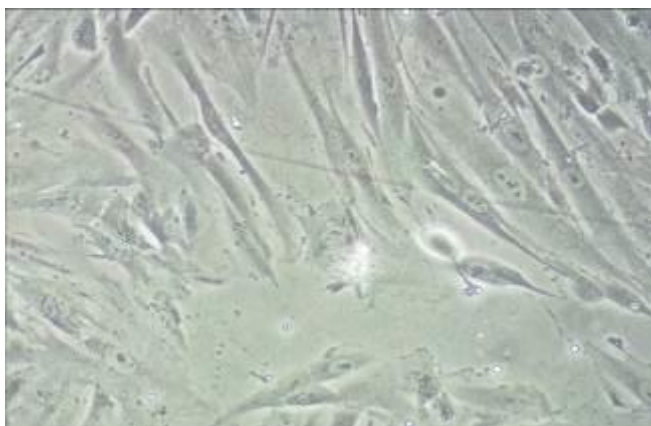


Рис. 3.2. Суспензійна культура клітин Вартонових драглів пуповини. Другий пасаж. Фазово-контрастна мікроскопія. 20x10

Таким чином, під час пасажування відбувається процес переходу від гетерогенної культури 0 пасажу, до найбільш гомогенної культури 2 пасажу. Починаючи з 3 пасажу з'являються клітини атипової форми та старіючі клітини, хоча цей процес стає більш вираженим після 5-6 пасажів. На більш пізніх пасажах зустрічались випадки спонтанної адипогенної та хондрогенної диференціації у моношарі. Це явище описується у літературі рідко, проте, робота з великою вибіркою культур дозволила нам його спостерігати [80, 121]. Воно вважається

ознакою деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу. Крім того, поява включень жиру може бути пов'язаною з жировою дистрофією, яка спостерігається в пізні строки культивування, хоча 3-й пасаж не може вважатись «пізнім». Проте, в будь-якому разі, такі клітини не можуть бути використані в подальших клінічних роботах.

Спонтанне формування адипоцитів і поява ліпідних крапель в цитоплазмі МСК у ряді випадків відзначалися вже на третьому пасажі. Дрібні ліпидовмісні вакуолі розташовувалися по всій цитоплазмі клітини, накопичуючись більш щільно у перинуклеарній зоні. На четвертому-п'ятому пасажах кількість адипогенних клітин значно зростала. Збільшувалися розміри вакуолей і гранул ліпідів, навколо ядер МСК формувалися щільні скопичення ліпідів, які виявляються нільським червоним. Форма МСК при цьому варіювала від великих округлих або трикутних клітин до дуже видовжених, неправильної форми, з кількома витягнутими тяжами цитоплазми, або типових веретеноподібних.

Відповідно наших спостережень за змінами морфології культур при пасажуванні, можна констатувати факт кардинальної фенотипової зміни клітин у культурі, що унеможлиблює подальше їхнє використання у клінічній практиці. Це узгоджується з результатами попередніх досліджень [72].

Найоптимальнішими для трансплантації етапами є перший та другий пасажі, проте кількість клітин на 1 пасажі виявляється недостатньою для застосування на великій групі тварин або при клінічному застосуванні на людині. В той же час, пасажування МСК до 2 пасажу дає можливість отримати достатню кількість клітин, які ще зберігають морфологічні характеристики, притаманні МСК, і є достатньо однорідними.

3.2 Особливості проліферації МСК в культурі

Згідно літературних даних, з одного сантиметру пуповини можна отримати від 10^3 до 10^5 клітин. Наші спостереження показали, що цей показник значно варіює у залежності від конкретного зразка. Сумарна

кількість клітин, що може бути отримана з певного зразка пуповини 15-25 см з урахуванням тривалого пасажування протягом 2 пасажів сягає 10^{10} .

В результаті процедури отримання клітин із зразка пуповини близько 15 см довжиною (найбільш частий варіант) можна нарахувати до 10^6 округлих клітин, що містять ядро. Проте, кількість власне МСК можна оцінити лише після першого пересіву культури.

Час подвоєння популяції (ЧПП) також відрізняється на етапах різних пасажів, проте існують деякі відмінності і у межах одного пасажу, при розгляді культур клітин, що були отримані із різних зразків пуповини. На значення ЧПП також впливає стадія росту культури: у $\log$ чи $\log$ -фазі. Вважається, що при постійному пересіві культури у $\log$ -фазі, подвоєння популяції відбувається швидше. Найбільше часу для подвоєння потребують клітини у період після виділення з пуповини – на 0 пасажі (у середньому – $82,86 \pm 4,78$ годин.). Дуже важливим моментом на цьому етапі є обрання часу першого пересіву. Потрібно накопичити певну кількість клітин (від 10^5), проте не пропустити настання $\log$ -фази та не перетримати клітини до $\log$ -фази, адже тоді ЧПП не буде знижуватись і клітини старішатимуть та будуть гинути. На 1-2 пасажах ЧПП сягає $53,28 \pm 8,9$ та $45,57 \pm 4,04$ годин. Найнижчим є ЧПП на 3 пасажі ($28,43 \pm 5,44$ години). Після 3 пасажу подвоєння популяції знову уповільнюється та становить у середньому $35,14 \pm 3,44$ годин на 4 пасажі й 34 ± 7 години на 5 пасажі (рис. 3.3.). Таким чином, МСК на рівні 5-го пасажу отримували приблизно через місяць культивування

Згідно з літературними даними, показники ЧПП клітин матриксу пуповини значно варіюють: від 11 до 87 годин. Це протиріччя може бути пов'язаним з гетерогенністю пуповини як джерела мезенхімальних клітин. Протягом роботи з великою кількістю зразків найбільш яскраво проявляються відмінності у характері росту культур клітин, що отримані від різних донорів.

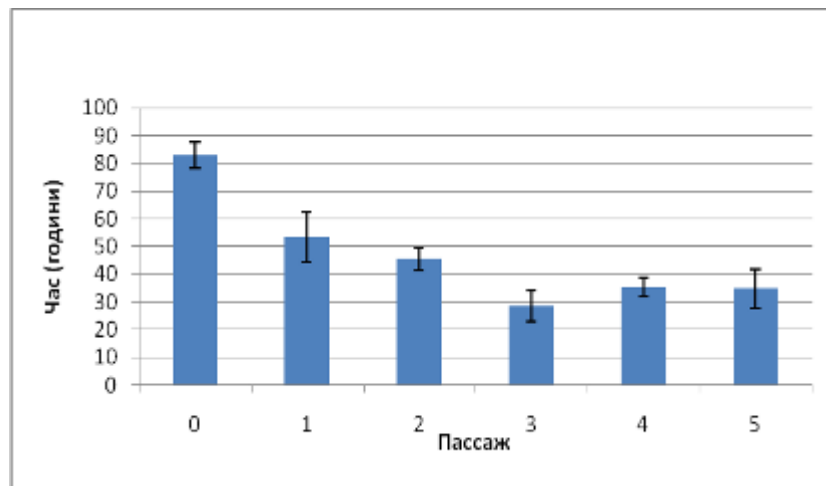


Рис. 3.3. Зміни часу подвоєння популяції МСК при культивуванні (від 0 до 5 пасажу)

3.3 Характеристика МСК з Вартонових драглів пуповини за поверхневими маркерами

Згідно рекомендацій Міжнародного товариства з клітинної терапії, клітини можуть бути віднесені до МСК, якщо вони експресують принаймні 3 поверхневих маркери – CD73, CD90, CD105 та негативні - CD34 і CD45.

Дослідженнями співробітників Інституту молекулярної біології і генетики НАН України було показано, що як свіже виділений клітинний матеріал, так і матеріал 1 та 2 пасажів в культурі відповідають цим критеріям.

В подальшому при пасажуванні експресія поверхневих маркерів мезенхімальними клітинами Вартонових драглів пуповини має тенденцію змінюватись [80]. Аналіз 6 пасажів в культурі виявив, що на етапі 6 пасажу вони сягають найменших середніх значень. Разом з тим, найбільш високою експресією позитивних маркерів характеризуються клітини 2 пасажу, що підтверджує їх найвищу гомогенність, виявлену за морфологією. Спостерігається тенденція зниження інтенсивності експресії маркерів CD105 та CD90 від 1 до 6 пасажів, проте ці зміни не є статистично значущими ($p > 0,05$), через наявність значних відмінностей у експресії в межах одного пасажу (рис.3.4).

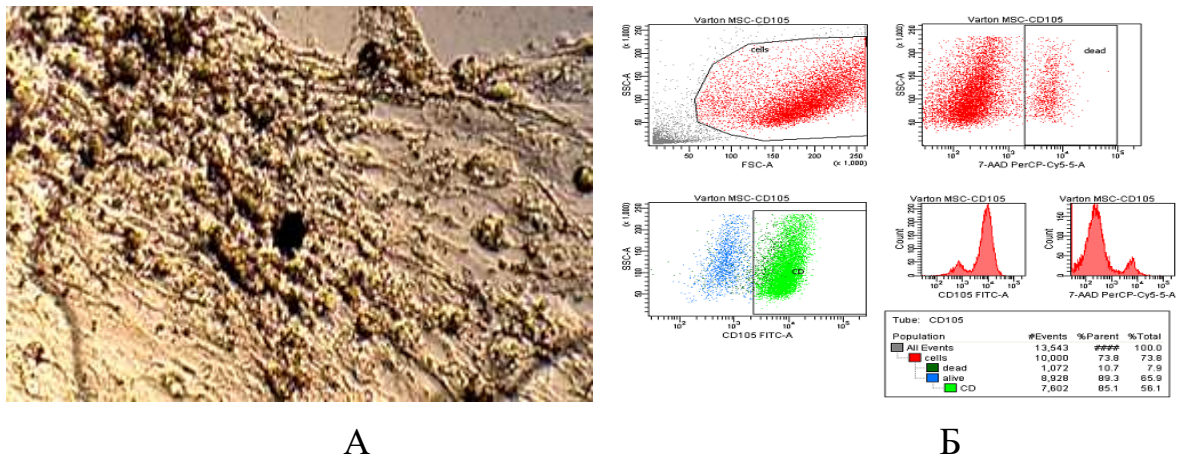


Рис. 3.4. А – імуногістохімічне виявлення CD105 - позитивних клітин в культурі Вартонових драглів пуповини 2 –го пасажу. 20x10. Б – експресія позитивного CD105 маркера за даними FACS – аналізу

Популяція клітин 0 пасажу є найбільш гетерогенною за ступенем експресії CD90 (min=8%, max=97,8%), а популяція клітин 3 пасажу – за ступенем експресії CD105 (min=5,5%, max=75%). Це може вказувати на індивідуальні відмінності між зразками пуповини. Найбільш стабільною є експресія маркеру CD73 (від min=70,1% на 6 пасажі до max=99,3% на 1 пасажі), вона найменше змінюється під час пасажування, а у межах одного пасажу розкид значень є найменшим (рис. 3.5). Варто зазначити, що культури, які характеризувались більшою гомогенністю та вираженою фібробластоподібною формою клітин, демонстрували й вищі показники експресії позитивних поверхневих маркерів. Основним негативним маркером МСК прийнято вважати CD34 (позитивний маркер гемопоетичних стовбурових клітин). Згідно з результатами наших досліджень, рівень CD34+ клітин у всіх пасажах був наближений до 0. Лише на 0-му пасажі спостерігалось до 0,6% позитивних за цим маркером клітин, що може бути пов'язано з наявністю невеликої кількості гемопоетичних клітин у матриксі пуповини людини. Проте ці клітини погано адгезуються до пластику і при пасажуванні елімінуються.

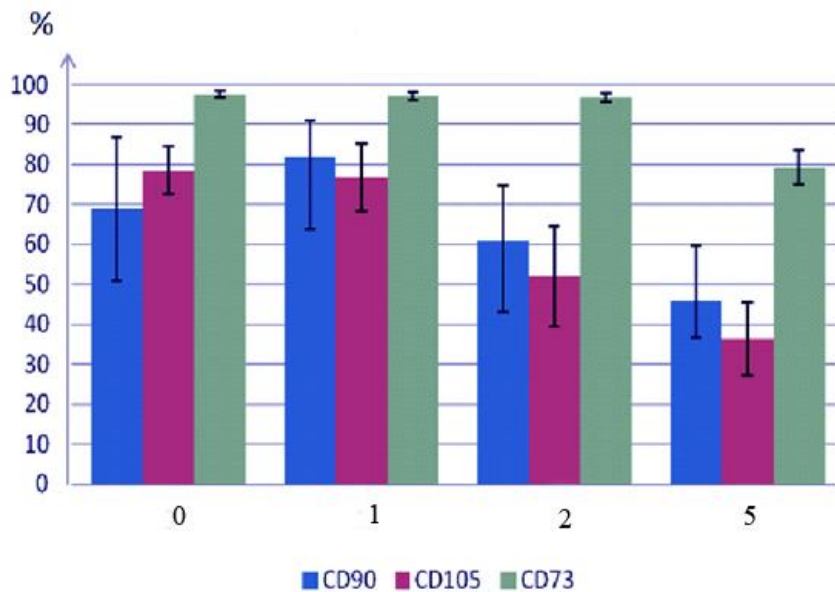


Рис. 3.5. Відсоток МСК, позитивних за поверхневими маркерами у пасажах (середні значення). Ось Х – кількість пасажів, ось Y – відсотки клітин, позитивних за кожним маркером.

Таким чином, характеристики МСК, які планується використовувати для експериментальних досліджень на тваринах з ЕАЕ, відповідають протокольним. Культивування до 2-го пасажу МСК Вартонових драглів пуповини людини забезпечує отримання значної кількості клітин, придатних для подальшого використання на тваринах, а в перспективі, і в клінічній практиці.

Відповідно до FACS аналізу (Fluorescence-activated cell sorting), більше 90% МСК-ВДл другого пасажу, підготовлених для трансплантації, були позитивними по CD73, CD90 і CD105 маркерам і негативними по CD 34 (<2%). Життєздатність клітин, визначена за допомогою забарвлення трипановим синім, становила >95%.

Застосований підхід охоплює всі етапи процесінгу матеріалу пуповини, обґрунтовує можливість подальшого використання клітин не вище 2-го пасажу в культурі і адаптований до отримання необхідної кількості клітин (40 млн) в обмежені (1 місяць) строки.

3.4. Виживання МСК Вартонових драглів пуповини у ЦНС щурів з ЕАЕ після їх субокципітального введення

Для дослідження механізмів дії і повної характеристики клітин, які трансплантуються в умовах патології, необхідне розуміння їх поведінки і подальшої долі *in vivo*. Поодинокі дослідження [72] виживання МСК у ЦНС щурів засвідчують, що клітини, принаймні протягом 5 діб, виявляються у лікворі і місцях ушкодження ЦНС щурів з ЕАЕ навіть без імуносупресії. Ми дослідили виживання клітин на 2, 5 і 10 добу після субокципітального введення щурам з ЕАЕ. Досліджували виживання і розподіл субокципітально введених МСК Вартонових драглів у щурів з ЕАЕ після трансплантації клітин на піку захворювання.

Аналіз ПЛР засвідчив, що альфа-сателітні послідовності ДНК людини виявляються на 2 і 5 добу експерименту у лікворі, спино-мозковій рідині і грудному відділі, що співпадає з літературними даними [72]. На 10 добу тварин з ЕАЕ позитивних у ПЛР - аналізі нами не виявлено (табл.3.1.).

Таблиця 3.1.

Результати виявлення ДНК СК людини методом ПЛР після ксенотрансплантації у тварин з ЕАЕ на 2, 5 і 10 доби

	2 доба n = 3	5 доба n = 3	10 доба n = 2
Півкулі головного мозку	1	0	0
Стовбур мозку в області ін'єкції	3	2	0
Спинно-мозкова рідина	3	2	0
Спинний мозок грудного відділу	3	2	0
Спинний мозок поперекового потовщення	1	0	0

Примітка. Цифрами представлено кількість тварин, які були позитивні в ПЛР-аналізі

Аналіз подальших морфологічних досліджень засвідчив переважання ушкоджень при ЕАЕ у грудному відділі спинного мозку. Тому виявлення трансплантованих МСК у цій області може засвідчувати про міграцію клітин по лікворним шляхам та наявність явища хоумінгу, що може мати велике практичне значення при виборі тактики лікування патології ЦНС. Стовбурові клітини, які вводяться інтратекально, в умовах деструктивного аутоіmunітету можуть швидко інактивуватися чи гинути, їхній відновний вплив за таких умов може бути не достатнім. У цих випадках можливі два шляхи вирішення проблеми: усунення лабораторних ознак аутоіmunітету перед власне лікуванням, що можна досягнути за допомогою гемопоетичних СК, які здатні індукувати спосіб індукції толерантності до нейроентигенів [43].

Другим шляхом є застосування клітин з низькою імуногенністю, на які не реагує імунна система і які здатні корегувати аутоіmunні явища.

Таким чином, очевидно, створюються умови для ефективного відновного впливу МСК на перебіг ЕАЕ і стан мієлінових оболонок нервових волокон спинного мозку щурів, що і встановлено у наших дослідженнях .

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ОПТИМІЗАЦІЇ МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ З ХРОНІЧНИМ РЕЦИДИВУЮЧИМ ПЕРЕБІГОМ

При тестуванні поведінкових реакцій щурів після індукції ЕАЕ одинарною дозою АФ 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 (вірогідне 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 , ts), вірогідне зниження дослідницької активності (збільшення латентного періоду – LP – в 2 рази ($p<0,031$) та зменшення тривалості – T_s – в 2,4 рази ($p<0,047$) і середньої тривалості заглядань у нірки – ts – в 2,6 разів ($p<0,004$) (табл.4.1).

Таблиця 4.1

Результати дослідження поведінкових реакцій інтактних та піддослідних щурів після індукції ЕАЕ одинарною дозою АФ ($M \pm m$)

Активність	Показники	Інтактні, $n=12$	ЕАЕ, $n=8$
Горизонтальна активність Периферійні квадрати	n_1	$67,75 \pm 5,4$	$39,88 \pm 4,19$ $p<0,0015^*$
	n_2	$50,25 \pm 4,04$	$26,5 \pm 5,02$ $p<0,004^*$
	ns	$118 \pm 7,31$	$66,38 \pm 8,73$ $p<0,0002^*$
Вертикальна активність	LP	$44,74 \pm 10,13$	$10,39 \pm 1,98$ $p<0,0001^*$
Дослідницька активність (нірки)	LP	$202,41 \pm 47,44$	$398,5 \pm 77,51$ $p<0,031^*$
	T_s	$9,09 \pm 1,67$	$3,75 \pm 1,64$ $p<0,047^*$
	ts	$2,8 \pm 0,3$	$1,09 \pm 0,42$ $p<0,004^*$

Позначення: LP – латентний період; n_1 – кількість епізодів за перші 5 хв.; n_2 – кількість епізодів за другі 5 хв.; ns – загальна кількість епізодів; T_s – загальна тривалість епізодів за 10 хв. спостережень; ts – середня тривалість окремого епізоду за 10 хв. спостережень, p^* – вірогідні відмінності при порівнянні груп тварин.

Також спостерігали тенденцію до підвищення емоційної активності (збільшення тривалості епізодів грумінгу – T1, T2, Ts при зменшенні кількості епізодів грумінгу – n1, n2, ns.

Результати цих досліджень показали, що у щурів з модельованим ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ, на 35-у добу спостереження при гістологічному дослідженні поперекового відділу спинного мозку у білій речовині виявлені структурні ознаки процесу демієлінізації мієлінової оболонки у переважній більшості аксонів з утворенням навколо них циркулярних спустошень [96]. При цьому більшість аксонів набула витонченого та деформованого вигляду (рис.4.1). Подібні деструктивні зміни мієлінових оболонок спостерігалися також навколо нервових волокон у складі корінців. Місцями спустошення навколо залишкових аксонів зливалися між собою, утворюючи ділянки відокремлених структур. Серед клітин гліального компоненту білої речовини виявлялися лише поодинокі дифузно розташовані дистрофовані олігодендроцити та астроцити із пікнотизованою цитоплазмою при відсутності візуалізації ядер.

У сірій речовині спинного мозку щурів на 35-у добу дослідження виявлені лише окремі нейрони із збереженою типовою цитоструктурою, наближеною до нормальної (рис. 4.2.).

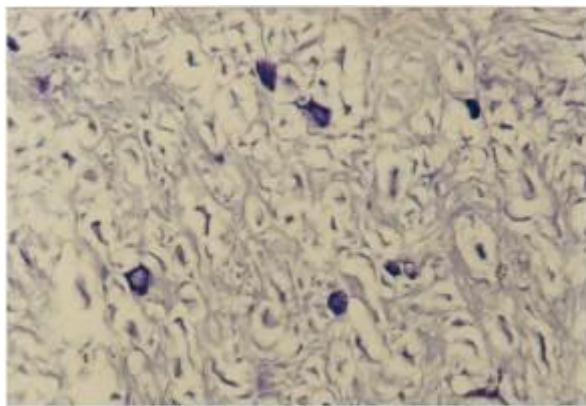


Рис. 4.1. Біла речовина спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ. 35-а доба забарвлення тіоніном x 800

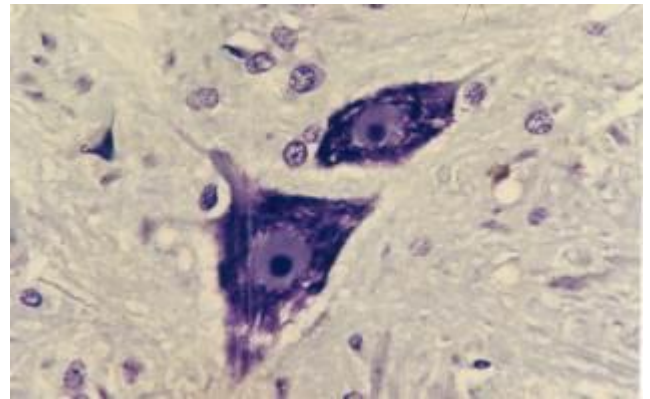


Рис. 4.2. Нейроцити із відносно збереженою структурою у сірій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ 35-а доба. Забарвлення тіоніном. x 800

У більшості нейроцитів ($52,64 \pm 3,69\%$) реєструвалася ущільненість тигроїдної субстанції з підвищеним забарвленням, що відбиває порушення тінкторіальних властивостей рибонуклеїдного комплексу цитоплазми внаслідок патологічного підвищення проникності клітинних мембран. У деяких нейроцитах з'явилася тотальна гомогенізація тигроїдної субстанції та лізис ядер з руйнуванням оболонки при відсутності візуалізації ядерця (рис. 4.3.). Деякі некробіотично змінені нейроцити набули вигляду клітин-тіней. На всьому протязі зрізів спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованих одинарною дозою АФ, у цей строк спостерігалися також явища перицелюлярного та периваскулярного набряку.

На 60-у добу дослідження у тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованих одинарною дозою АФ, у порівнянні з попереднім строком у білій речовині визначалося помітне збільшення пошкоджених демієлінованих аксонів з перетворенням їх у витончені гомогенізовані структури, оточені поширеними спустошеннями внаслідок деструкції мієлінових оболонок (рис. 4.4.).

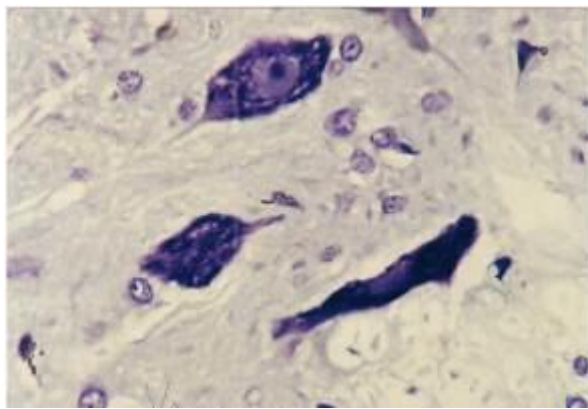


Рис. 4.3. Дистрофовані нейроцити у сірій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ. 35-а доба. Забарвлення тіоніном. х 800

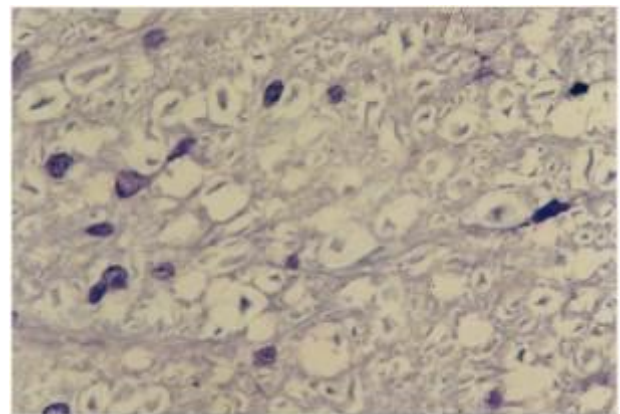


Рис. 4.4. Посилення ознак демієлінізації аксонів у білій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим одинарною дозою АФ. 60-а доба. Забарвлення тіоніном. х 800

У дистрофованих гліюцитах виявлені пікноморфні гіперхромні ядра. У сірій речовині спинного мозку в цей строк вміст патологічно змінених нейроцитів порівняно з попереднім строком становив у середньому $52,78 \pm 4,31\%$, тобто помітно не змінився. Але у таких нейроцитах визначалося

поглиблення некробіотичних ознак у вигляді ішемії, тигролізу, каріолізу з утворенням клітин-тіней (рис.4.5.). Судини капілярного типу із стазом формених елементів оточені зонами периваскулярного набряку або невеликими вогнищевими крововиливами.

Таким чином, у динаміці спостереження на 60-у добу у тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованих одинарною дозою АФ, ступінь патологічних змін у білій та у сірій речовині цих щурів помітно посилюється. Виявлені цитоструктурні зміни на 35-у та 60-у добу дослідження відображують суттєві порушення внутрішньоклітинних метаболічних процесів внаслідок розвитку демієлінізації нервових волокон і є причиною функціональних розладів діяльності ЦНС піддослідних тварин зі зміною поведінкових реакцій.

Патоморфологічний аналіз гістоструктури спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованих подвійною дозою АФ на 35-у добу, у порівнянні з використанням одинарної дози АФ, виявив більш поширений процес демієлінізації аксонів у білій речовині з утворенням периаksonальних спустошень майже на всьому просторі досліджених зрізів спинного мозку. Це супроводжувалося поглибленням ступеня пошкодження аксонів з трансформацією їх у некротизовані гомогенні структури у вигляді тіней (рис. 4.5.). З боку гліального компоненту спостерігалось зменшення вмісту клітин, які виявляли ознаки дистрофії – зморщення цитоплазматичних тіл, редукцію відростків, пікноз та гіперхроматоз ядер (рис.6). У сірій речовині спинного мозку цих щурів у нейроцитах виявлені дистрофічні та некробіотичні зміни із збільшенням вмісту клітин-тіней ($63,44 \pm 5,35\%$) (рис.4.6). Нейроцити із відносно збереженою структурою виявлялися поодинокі. Наявність дрібних крововиливів навколо судин капілярного типу засвідчує посилення судинної проникності.

Таким чином, за даними патоморфологічного дослідження поперекового відділу спинного мозку щурів з індукованим подвійною дозою АФ ЕАЕ на 35-у добу визначається значне поширення демієлінізуючого процесу та збільшення вмісту нейроклітин з дистрофічно-некробіотичними змінами.

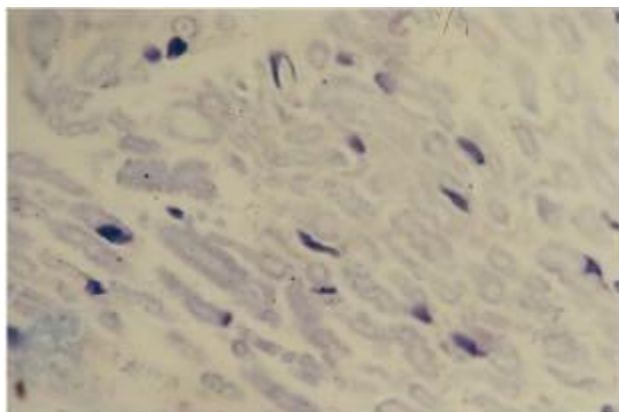


Рис. 4.5. Деструктивні зміни у білій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим подвійною дозою АФ. 35-а доба. Забарвлення тіоніном. х 800

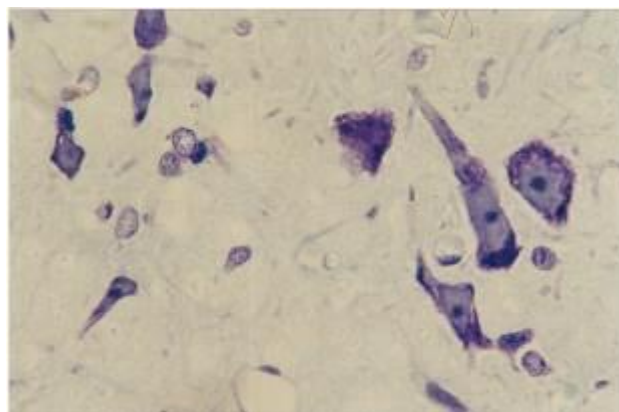


Рис. 4.6. Патологічно змінені нейрони у сірій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим подвійною дозою АФ. 35-а доба. Забарвлення тіоніном. х 800

При застосуванні потрійної дози АФ для моделювання ЕАЕ у гістоструктурі спинного мозку тварин з ЕАЕ на 35-у добу зареєстровано ще більше посилення деструктивних змін як у білій, так і у сірій речовині у порівнянні з використанням подвійної дози АФ. У білій речовині спинного мозку спостерігалися ділянки майже тотальної деструкції як аксонів, так і їх оболонок (рис. 4.7). У сірій речовині це супроводжувалося помітним збільшенням вмісту нейроцитів з дистрофічними та некробіотичними змінами в середньому до $72,52 \pm 2,46\%$ з переважанням серед них клітин - тіней (рис. 4.8).

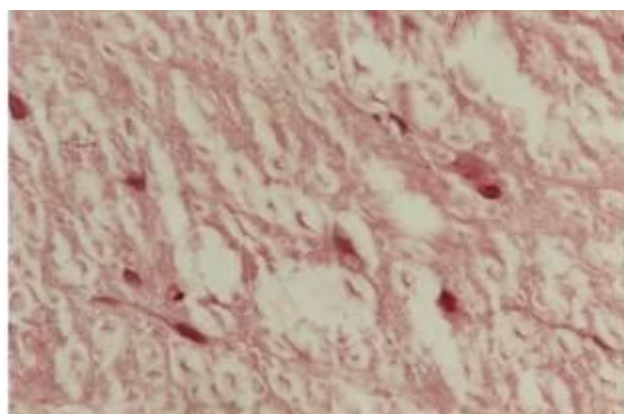


Рис. 4.7. Субтотальна демієлінізація білої речовини спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим потрійною дозою АФ. 35-а доба. Забарвлення гематоксилін-еозином. х800

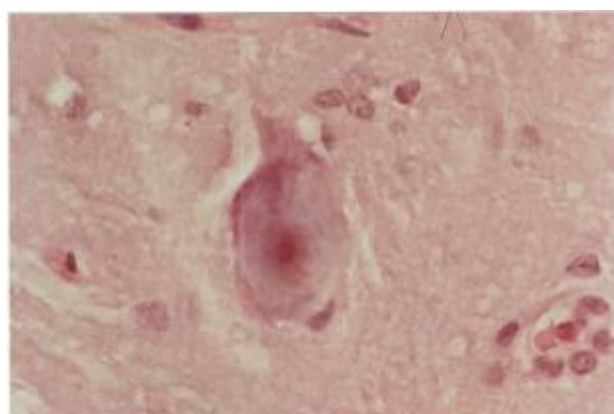


Рис. 4.8. Тканина спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим потрійною дозою АФ. 35-а доба. Забарвлення гематоксилін-еозином. х800

Навколо дрібних судин капілярного типу спостерігалися множинні вогнищеві крововиливи.

Таким чином, застосування подвійної та потрійної доз АФ для індукції ЕАЕ у щурів обумовлює поступове поширення і збільшення процесу демієлінізації аксонів у білій речовині та вмісту пошкоджених нейроцитів у сірій речовині спинного мозку, що засвідчує дозозалежність ефекту. У табл. 4.2 наведені результати морфометричної оцінки вмісту патологічно змінених нейроцитів у сірій речовині поперекового потовщення спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим різними дозами АФ.

Таблиця 4.2

Узагальнені результати визначення кількісного вмісту патологічно змінених нейронів у сірій речовині поперекового відділу спинного мозку щурів з ЕАЕ, індукованим різними дозами АФ (35-а доба)

Експериментальні групи у залежності від дози введенного АФ	Кількість патологічно змінених нейронів спинного мозку, % М (25%; 75%)
Група І. ЕАЕ (1 доза АФ)	52,27 (45,0;63,64)
Група ІІ. ЕАЕ (2 дози АФ)	54,45 (50,00;78,95)
Група ІІІ. ЕАЕ (3 дози АФ)	74,17 (65,52;78,38) * p=0,037

М (25%; 75%), де М - медіана; (.) - інтерквартильний діапазон.

* - статистично значуще між групами І ЕАЕ та ІІІ ЕАЕ.

Морфометричний аналіз патологічних змін у спинному мозку щурів з ЕАЕ, індукованим зростаючими дозами АФ, на 35-у добу (табл.4.2.) показав статистично значуще поступове збільшення вмісту пошкоджених нейроцитів у групах тварин, яким індукували ЕАЕ подвійною та потрійною дозами АФ. Це супроводжувалося поступовим поширенням ступеня демієлінізуючого процесу аксонів у білій речовині спинного мозку та його корінцях у відповідних групах дослідів. При застосуванні потрійної дози АФ кількість патологічно змінених нейронів статистично значуще підвищилася в 1,4 рази у порівнянні з першою

групою щурів. Різниця у цих показниках між першою групою та другою групою тварин, яким індукували ЕАЕ подвійною дозою АФ складала 1,04 рази і була статистично незначущою. Крім того, статистично значущої різниці між другою та третьою групами відмічено не було, незважаючи на те, що показник між ними збільшувався в 1,36 рази. Цей аналіз показує більшу інформативність урахування якісних цитологічних ознак пошкодження нейроклітин.

Узагальнюючи отримані результати, важливо зауважити, що на нашому матеріалі у тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ не зареєстровані прояви запальної реакції незалежно від тестованої дози АФ. Очевидно, запальна інфільтрація при ЕАЕ обмежується м'якими мозковими оболонками, а ознаки демієлінізації аксонів розвиваються у білій речовині спинного та головного мозку. Навіть при значній внутрішньоадвентиціальній запальній інфільтрації окремих судин мозку процес демієлінізації в цих ділянках часто не виявляється.

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 цих піддослідних тварин відтворюється при використанні потрібної дози АФ. Цей процес супроводжується появою дистрофічно-деструктивних змін у більшості нейроцитів сірої речовини спинного мозку. Але ступінь захворювання у таких тварин настільки тяжкий, що унеможлиблює спостереження за ними в тесті «відкрите поле». Таким чином, по результатах проведених досліджень, можна зробити висновок про достатність використання однієї дози АФ для отримання ефективної моделі експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом у щурів протягом 35 діб.

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЙ І ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ ПІД ВПЛИВОМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ МСК

5.1. Результати дослідження клінічного перебігу ЕАЕ після ксенотрансплантації МСК та у їх поєднанні з інтерлейкіном -10

Дослідження перебігу ЕАЕ засвідчило, що інкубаційний період до перших проявів ЕАЕ склав 10 діб. Вважається, що при ЕАЕ спостерігається спонтанне видужання тварин. Така особливість є характерною для легкого перебігу ЕАЕ, при хронічному ремітуючому перебігу ЕАЕ у групі спостереження спонтанного одужання не настає.

У тварин всіх досліджуваних нами експериментальних груп виявлено середню важкість стану (1,5 – 2,07 бали) на піку захворюваності (17 – 19 доба) і хронічний ремітуючий перебіг захворювання тварин з ЕАЕ.

Динаміку клінічного стану щурів, яким з лікувальною метою субокципітально вводили ксеногенні МСК, та щурів групи порівняння приведено на рис.5.1.

Вже через 7 діб після введення клітин було візуально відмічено прискорення поновлення м'язового тону кінцівок експериментальних тварин, покращення рухів та сили м'язів кінцівок і хвоста. Воно спостерігалось вже у ранні терміни та було динамічнішим, ніж у щурів групи порівняння. На 18 добу від індукції ЕАЕ стан статистично незначуще погіршувався (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,2$) з $1,1\pm0,13$ балів у групі порівняння до $1,5\pm0,14$ балів у групі після введення МСК. У цій групі тварин пік клінічних проявів ЕАЕ зміщувався на 20 добу. Далі відбувався поступовий статистично значущий (критерій Вілкоксона; $p=0,001$) регрес клініки ЕАЕ з $1,4\pm1,3$ балів на 22 добу до $0,07\pm0,07$ балів з повним клінічним одужанням на 32 добу.

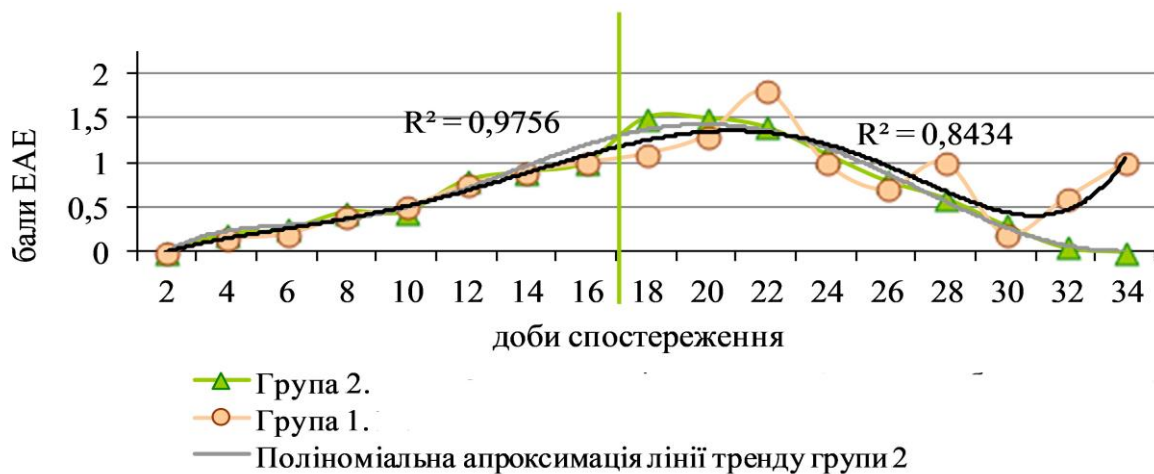


Рис.5.1. Динаміка клінічного стану щурів після субокципітального введення МСК (група 2) та групи порівняння (група 1)

Отже, у щурів з ЕАЕ субокципітальне введення ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин супроводжується поступовим поліпшенням стану та прискоренням одужання, з тимчасовим статистично незначущим погіршенням стану тварин відносно групи порівняння безпосередньо після введення клітин. При цьому, 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% (Додат.1).

Ми також досліджували вплив на клінічний перебіг ЕАЕ внутрішньовенного введення ІЛ-10 (на 10 добу після індукції) з наступним введенням інтерлейкіну ІЛ-10 субокципітально майже на піку захворювання [128]. Динаміку клінічного стану щурів після введення ІЛ-10 дворазово та щурів групи порівняння приведено на рис.5.2.

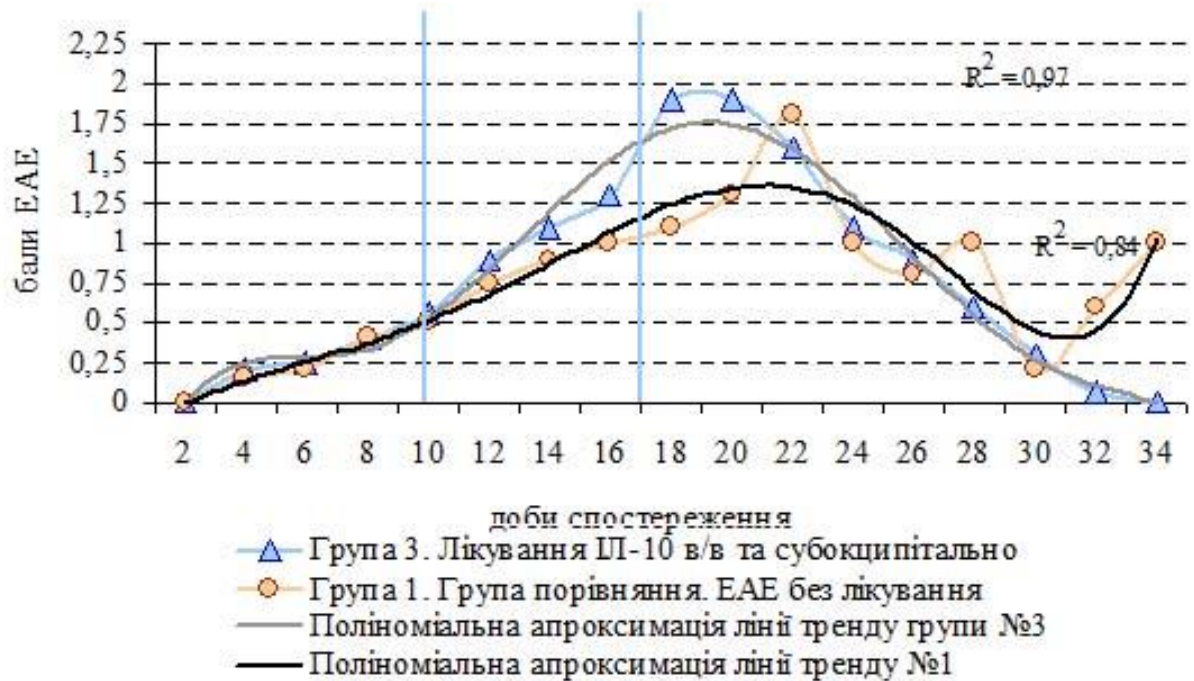


Рис.5.2. Динаміка клінічного стану щурів з ЕАЕ під впливом внутрішньовенного (10 доба) та субокципітального (17 доба) введення ІЛ-10 (група 3)

Після внутрішньовенного введення ІЛ-10 спостерігається незначне статистично незначуще погіршення стану щурів у порівнянні з групою 1 (з 0,75 у групі порівняння до 0,9 балів). Після подальшого (на 17 добу) субокципітального введення ІЛ-10 спостерігається статистично значуще погіршення стану відразу після другого етапу лікування (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,01$). Проте, таке погіршення стану триває лише декілька діб та на 22 добу експерименту тяжкість перебігу у групі 3 — $1,6 \pm 1,3$ бали — вже дещо, проте незначуще (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,8$), менша за тяжкість у групі порівняння, в якій у цей термін спостерігається пік клінічних проявів ЕАЕ — $1,8 \pm 1,3$ бали. Далі у групі 3 виявлено поступовий регрес клініки ЕАЕ до повного клінічного одужання на 32 добу. При цьому в динаміці відновного процесу відмічено рівномірний помірний спад (динамічні ряди), починаючи з 22 доби (-0,3 бали) і аж до 32 доби (-0,3 бали), де прискорення спаду становило -83,3% (додат.1).

Загалом, з 22 доби від індукції ЕАЕ, перебіг захворювання у групах 2 та 3, яким вводили МСК або ІЛ-10, має майже однаковий характер та призводить до повного клінічного одужання тварин до 32 доби. Ми спостерігали статистично незначуще погіршення клінічного стану щурів з ЕАЕ групи 3 після двохетапного введення ІЛ-10 (критерій Вілкоксона; $p=0,06$) та статистично значущий регрес клініки ЕАЕ, починаючи з 22 доби (критерій Вілкоксона; $p=0,001$ на 32 добу, відносно 22 доби дослідження) та одужання у цій групі тварин у порівнянні з групою щурів 1 (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,03$ на 32 добу).

Також ми дослідили вплив ІЛ-10, введеного внутрішньовенно на 10 добу після індукції ЕАЕ, та субокципітального уведення ІЛ-10 з МСК (під захворювання) на перебіг ЕАЕ. Динаміку клінічного стану щурів групи 4 і групи порівняння представлено на рис. 5.3. та в Додат.1.

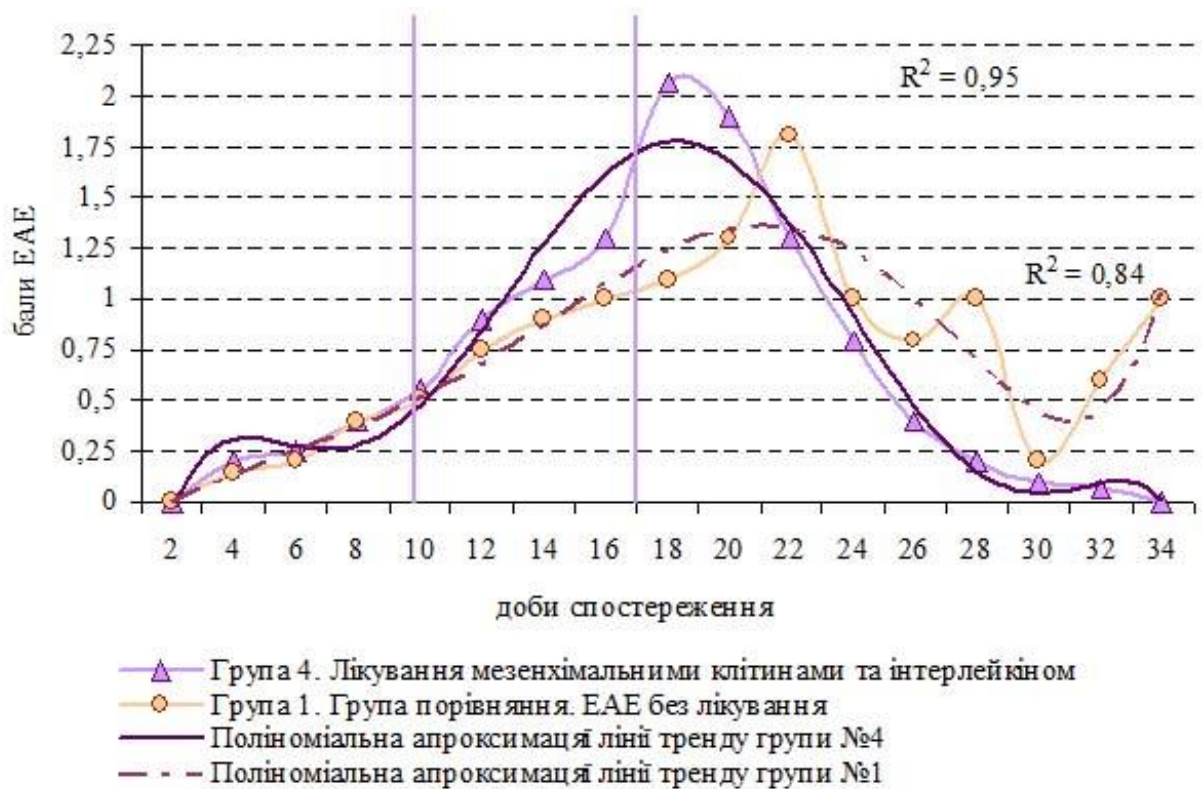


Рис. 5.3. Динаміка клінічного стану щурів групи 3 (лікування трансфікованими мезенхімальними клітинами, субокципітально)

Загалом, перебіг ЕАЕ до піку клінічних проявів у групі 4, яка отримала двоетапне лікування інтерлейкіном-10 та МСК, подібний до перебігу ЕАЕ у групі 3, яка отримала двоетапне лікування лише ІЛ-10. Але після 17 доби у групі 4 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; $p=0,004$), що, очевидно, можна пояснити великою кількістю клітин, які потрапляють у ліквор потиличної цистерни щурів, та впливом наркозу. Проте, одужання тварин, які отримали інтерлейкін-10 та МСК, відбувалося 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 – (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,08$), відносно групи 2 $0,7 \pm 0,13$ – різниця також виявилася незначущою (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,2$). У нашому дослідженні простежується сучасна тенденція у клітинній терапії – більша ефективність комбінованого застосування засобів із різним механізмом дії, наприклад, стовбурових клітин у комбінації з цитокінами. Так лікування ЕАЕ у щурів групи 4 внутрішньовенним введенням ІЛ-10 з наступним введенням МСК та ІЛ-10 супроводжувалося тимчасовим статистично значущим погіршенням стану тварин у порівнянні з групою 2 – до $2,07 \pm 0,17$ балів відносно $1,4 \pm 0,14$ балів у групі 2 (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,02$) та статистично незначущим погіршенням стану тварин (у порівнянні з групою 3) після субокципітальної трансплантації. Слід брати до уваги, що тварин, під час кожного введення клітин чи інтерлейкіну, наркотизували, що, на тлі клінічних проявів ЕАЕ, також призводило до погіршення клінічного стану щурів. Регрес симптоматики ЕАЕ у групі щурів 4 статистично незначуще швидший, ніж у групі 2, яким вводили тільки МСК, та групі 3, яким вводили ІЛ-10.

Ми також вивчили вплив на ЕАЕ субокципітального введення трансфікованих МСК (група дослідження 5). На рис.5.4. приведено динаміку клінічного стану щурів, яким у ліквор великої потиличної цистерни

трансплантували трансфіковані МСК, та щурів групи порівняння. Після субокципітального введення трансфікованих МСК щурам з ЕАЕ на 17 добу від початку експерименту, спостерігається статистично незначуще погіршення стану відразу після лікування (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,8$) з $1,1\pm0,13$ балів у групі порівняння до $1,6\pm0,14$ балів у групі після введення МСКТ.

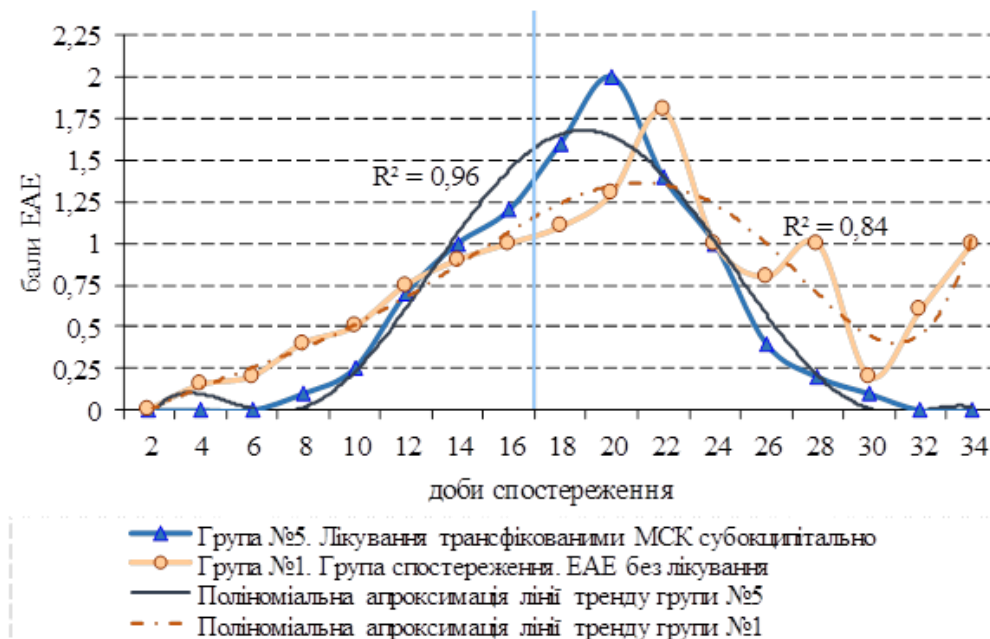


Рис. 5.4. Динаміка клінічного стану щурів групи 5 (лікування трансфікованими мезенхімальними клітинами, субокципітально)

Таке погіршення стану триває лише декілька діб і на 22 добу експерименту тяжкість перебігу у цій групі тварин, вже нижча ($1,4\pm0,14$ бали) за тяжкість у групі спостереження, в якій настає пік клінічних проявів ЕАЕ ($1,8\pm0,25$ бали) при статистично незначущій різниці (критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,2$).

Далі спостерігається швидкий регрес клініки ЕАЕ 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). При цьому тварини у цій групі реагували на лікування різноманітно – були тварини, які одужали швидше, були також такі тварини, у яких за відсутності клінічних проявів ЕАЕ спостерігалися трофічні розлади у кінцівках.

Також, для унаочнення особливостей перебігу ЕАЕ у різних групах був проведений 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% (Додат.1.).

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 з одноетапним лікуванням, навіть не зважаючи на статистично значуще погіршення стану тварин після субокципітального введення МСК та інтерлейкіну на 18 добу. 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 (рис. 5.5).

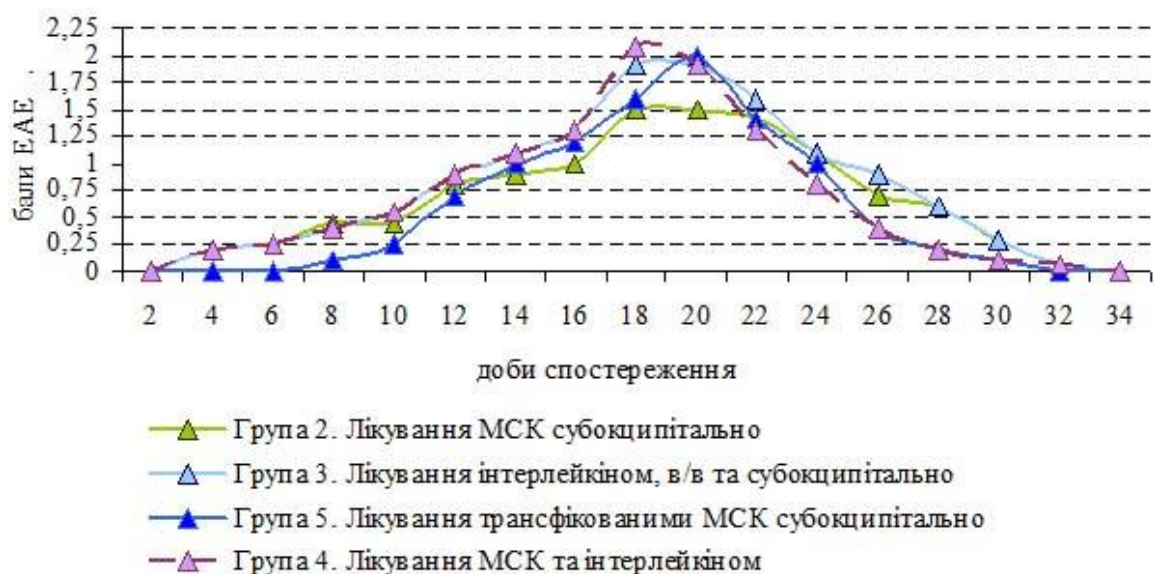


Рис. 5.5. Порівняння динаміки клінічного стану щурів експериментальних груп

Такий результат цілком узгоджується з швидким одужанням тварин на 29 добу у групі 4 (критерій Вілкоксона; $p=0,0009$ 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% (Додат.1), 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 лікування інтерлейкіном і стовбуровими клітинами.

При порівнянні динамічних рядів групи 5, яким вводили МСКТ, і групи 4, яка отримала МСК і ІЛ-10, слід відмітити, що в цілому, обидві лінії на рис.5.3. і рис.5.4. відображають позитивну динаміку відновного процесу з повним клінічним одужанням експериментальних тварин у цих групах до 32 доби. Так, групи 5 і 4 (Додат.1) 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 % (Додат.1).

Отже, при любых схемах введення МСК сприяють повному одужанню тварин з ЕАЕ 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. Проте показники є статистично незначущими.

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.

Аналізуючи отримані результати слід зазначити, що ЕАЕ є модельним аутоімунним захворюванням ЦНС, при якому патогенетичну роль відіграють антигенспецифічні Th1-лімфоцити. Енцефалітогенними при ЕАЕ є різні білки ЦНС, у першу чергу, ОБМ [99].

Антигенспецифічні Th1-лімфоцити продукуються у відповідь на імунізацію, долають гематоенцефалічний бар'єр, проникають у ЦНС, продукують прозапальні цитокіни, ініціюють аутоімунне запалення та руйнують тканину ЦНС. Антигенспецифічні В-лімфоцити продукують аутоантитіла різних класів до ОБМ та інших нейроспецифічних білків [99, 129]. Антитіла також можуть сприяти руйнуванню мієліну [130]. У той же час, дослідження на експериментальних тваринах індукції та існування мікрохимеризму засвідчує важливу роль CD 4, CD 25 та CD 8 Т-клітин, їх перехресний баланс в імунній відповіді [131, 132]. Тривала толерантність між реципієнтними та донорськими клітинами без фармакологічної супресії може існувати за умов, наприклад, попереднього введення внутрішньовенно CD 34+ (гемопоетичних) клітин, або трансплантації МСК. При цьому реципієнт отримує інтенсивні імуносупресорні агенти й до реакцій “трансплантат проти хазяїна” [129]. Деякі дослідники трактують зміну імунної відповіді у реципієнтів із мікрохимеризмом, викликаним донорськими клітинами, як індукцію взаємної імунологічної нереактивності [44]. МСК пригнічують імунні реакції реципієнта [56], при цьому імуносупресивна дія МСК забезпечується клітинно-контактною взаємодією та продукцією розчинних молекул (цитокінів) [133, 70].

Виходячи з цього, в роботі ми дослідили вплив ІЛ-10, введеного внутрішньовенно на 10 добу після індукції ЕАЕ, та субокципітального введення ІЛ-10 з МСК (пік захворювання) на клінічний перебіг ЕАЕ. Отримана нами модель відповідає хронічній рецидивуючій формі ЕАЕ, що дозволяє детально вивчати вплив різних факторів на клінічний перебіг захворювання і уникнути летальності експериментальних тварин. Застосування протизапального ІЛ-10 і МСК у різних комбінаціях сприяє повному клінічному одужанню тварин до 32 доби експерименту відносно групи порівняння, де спонтанного клінічного одужання не настає [134].

Аналіз динамічних рядів засвідчує більшу ефективність лікування у групі тварин 4, яким на 10 добу внутрішньовенно вводили ІЛ-10, а на 17 добу – МСК та ІЛ-10, навіть не зважаючи на статистично значуще тимчасове погіршення стану тварин після субокципітального введення МСК та інтерлейкіну. Такий результат цілком узгоджується з швидким клінічним регресом симптоматики тварин групи 4 на 29 добу після моделювання ЕАЕ.

5.2. Вплив нативних мезенхімальних стовбурових клітин та трансфікованих геном інтерлейкіну-10 на поведінкові реакції щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті

При дослідженні у «відкритому полі» (перше тестування) у щурів на 12-ту добу після індукції ЕАЕ (група 1) порівняно з інтактними тваринами (група 6) виявлено статистично значуще зменшення горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів периферійних квадратів $p1$ ($p=0,0015$), $p2$ ($p=0,004$), ns ($p=0,0002$); вертикальної локомоторної активності – статистично значуще зменшення латентного періоду LP ($p=0,0001$) та тенденція до зменшення кількості вертикальних стійок $p2$, 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 Ts ($p=0,047$) і середньої тривалості «заглядань у нірки»

ts ($p=0,004$)). Також спостерігали тенденцію до збільшення емоційної активності – незначне збільшення тривалості епізодів грумінгу T1, T2, Ts при зменшенні кількості епізодів грумінгу n1, n2, ns та збільшення кількості фекальних болюсів (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

**Показники поведінкових реакцій інтактних щурів і щурів з ЕАЕ
на 12-ту добу експерименту**

Активність	Показник	Величина показника в групах ($M \pm m$)		p
		Гр.6 (n=12)	Гр.1 (n=8)	
Горизонтальна активність (периферійні квадрати)	n1	$67,75 \pm 5,4$	$39,88 \pm 4,19$	0,0015
	n2	$50,25 \pm 4,04$	$26,5 \pm 5,02$	0,004
	ns	$118 \pm 7,31$	$66,38 \pm 8,73$	0,0002
Вертикальна активність	LP	$44,74 \pm 10,13$	$10,39 \pm 1,98$	0,0001
Дослідницька активність («нірки»)	LP	$202,41 \pm 47,44$	$398,5 \pm 77,51$	0,031
	Ts	$9,09 \pm 1,67$	$3,75 \pm 1,64$	0,047
	ts	$2,8 \pm 0,3$	$1,09 \pm 0,42$	0,004

Примітка. p – статистично значущі відмінності показників в експериментальних групах

Друге тестування у «відкритому полі» проведене на 15-ту добу після індукції ЕАЕ і на 7-му 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 (табл.5.2) спостерігали тенденцію до зменшення горизонтальної локомоторної активності при статистично значущому збільшенні латентного періоду – LP перетину центральних ($p=0,028$) та периферійних ($p=0,028$) квадратів статистично значуще підвищення емоційної активності – збільшення тривалості T2 ($p=0,01$), Ts ($p=0,028$) та середньої тривалості епізодів грумінгу t2 ($p=0,005$). Також відзначено тенденцію до зменшення показників вертикальної локомоторної активності та збільшення дослідницької активності.

При дослідженні у «відкритому полі» щурів групи 3 порівняно з групою 1 виявлене статистично значуще збільшення латентного періоду – LP перетину центральних квадратів ($p=0,002$), тенденцію до зменшення кількості перетинів центральних і периферійних квадратів (горизонтальна локомоторна активність) та статистично значуще збільшення вертикальної локомоторної активності (збільшення середньої тривалості вертикальних стійок t2 ($p=0,029$), ts ($p=0,029$)). Також спостерігали зменшення показників дослідницької активності та зміни показників емоційної активності (тенденція до збільшення за перші 5 хвилин та зменшення за другі 5 хв дослідження). При тестуванні у «відкритому полі» щурів групи 4 порівняно з групою 1 відзначали зміни показників горизонтальної локомоторної активності (статистично значуще збільшення латентного періоду LP перетину центральних квадратів ($p=0,028$) та тенденцію до збільшення кількості перетинів центральних і периферійних квадратів) та тенденцію до збільшення вертикальної локомоторної активності (за другі 5 хв дослідження) і дослідницької активності, а також зниження емоційної активності (грумінгу – за перші 5 хв дослідження та зменшення кількості фекальних болюсів).

Таблиця 5.2

**Показники поведінкових реакцій щурів з індукованим ЕАЕ за різних
варіантів введення МСК та ІІ-10**

Активність	Показник	Величина показників в групах (M±m)			
		Гр.1 (n=8)	Гр.2 (n=8)	Гр.3 (n=7)	Гр.4 (n=4)
Горизонтальна активність (центральні квадрати)	Lp	1,16 ± 0,07	6,32 ± 3,12 p_{2,1} = 0,028	2,21 ± 0,57 p_{3,1} = 0,002	2,19 ± 0,69 p_{4,1} = 0,028
Горизонтальна активність (периферійні квадрати)	Lp	9,59 ± 6,05	11,58 ± 4,13 p_{2,1} = 0,028	129,06 ± 80,36	10,45 ± 3,63
Вертикальна активність	t2	3,4 ± 0,31	3,2 ± 0,27	5,91 ± 1,17 p_{3,1} = 0,029	3,19 ± 0,3
	ts	2,84 ± 0,22	3,02 ± 0,21	4,74 ± 0,72 p_{3,1} = 0,029	2,91 ± 0,36
Емоційна активність (грумінг)	T2	32,63 ± 11,52	88,44 ± 14,34 p_{2,1} = 0,01	30,85 ± 9,33	47,51 ± 20,3
	Ts	72,62 ± 9,98	128,51 ± 16,6 p_{2,1} = 0,028	82,78 ± 8,68	80,91 ± 27,34
	t2	7,66 ± 2,46	16,58 ± 3,23 p_{2,1} = 0,005	9,1 ± 2,74	9,4 ± 2,6

Примітка. p_{2,1} – статистично значущі відмінності між групами 2 і 1, p_{3,1} – між групами 3 і 1, p_{4,1} – 4 і 1.

У щурів групи 5 при тестуванні у «відкритому полі» порівняно з щурами групи 1 (табл.5.3.) виявлено статистично значуще зменшення показників вертикальної локомоторної активності n1 (p=0,043) та підвищення емоційної активності Ts (p=0,034) та ts (p=0,012). Також спостерігали тенденцію до зміни показників горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів центральних квадратів та збільшення – периферійних квадратів, а

також зменшення показників дослідницької активності за перші 5 хвилин та збільшення – за другі 5 хвилин дослідження. При тестуванні у «відкритому полі» щурів групи 5 порівняно з групою 2 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 T1 ($p = 0,034$), t1 ($p = 0,034$)) та статистично значуще зниження емоційної активності (зменшення кількості епізодів грумінгу n_2 ($p = 0,034$), ns ($p = 0,016$) та зменшення тривалості епізодів грумінгу T2 ($p = 0,034$)). Також виявлено тенденцію до зниження показників вертикальної локомоторної активності.

У щурів групи 5 порівняно з тваринами групи 4 (табл. 5.3) 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.

Результати дослідження поведінкових реакцій щурів свідчили, що при індукованому ЕАЕ на 12-ту добу виникає статистично значуще зменшення орієнтовно-дослідницької діяльності (локомоторної та дослідницької активності) на тлі підвищення рівня емоційного напруження. Виявлені зміни поведінки щурів з ЕАЕ зумовлені суттєвими розладами діяльності головного мозку, найбільш вірогідно – дегенеративно-дистрофічними змінами ЦНС.

Таблиця 5.3

**Показники поведінкових реакцій щурів після
введення МСКТ та інших груп**

Активність	Показник	Величина показника в групах (M $\pm$ m)			
		Гр.1 (n=8)	Гр.2 (n=8)	Гр.4 (n=4)	Гр.5 (n=10)
Горизонтальна активність (периферійні квадрати)	Lp	9,59 $\pm$ 6,05	11,58 $\pm$ 4,13	10,45 $\pm$ 3,63	4,66 $\pm$ 0,39 p_{5,2}<0,05
	n2	29,00 $\pm$ 7,49	24,63 $\pm$ 5,11	54,25 $\pm$ 18,10	46,00 $\pm$ 6,64 p_{5,2}=0,021
Вертикальна активність	n1	16,63 $\pm$ 2,31	12,63 $\pm$ 2,99	13,50 $\pm$ 4,86	9,90 $\pm$ 1,99 p_{5,1}=0,043
Дослідницька активність («нірки»)	Lp	479,81 $\pm$ 65,74	317,20 $\pm$ 58,90	432,99 $\pm$ 129,60	517,08 $\pm$ 58,48 p_{5,2}=0,027
	n1	0,25 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,38	0,50 $\pm$ 0,50	0,10 $\pm$ 0,10 p_{5,2}<0,05
	T1	0,41 $\pm$ 0,30	1,57 $\pm$ 0,70	1,19 $\pm$ 1,19	0,06 $\pm$ 0,06 p_{5,2}=0,034
	t1	0,41 $\pm$ 0,30	0,91 $\pm$ 0,32	0,60 $\pm$ 0,60	0,06 $\pm$ 0,06 p_{5,2}=0,034
Емоційна активність (грумінг)	n2	4,00 $\pm$ 1,00	5,75 $\pm$ 0,80	4,75 $\pm$ 1,75	3,10 $\pm$ 0,74 p_{5,2}=0,034
	ns	8,00 $\pm$ 0,91	10,38 $\pm$ 1,16	9,75 $\pm$ 2,17	7,10 $\pm$ 0,50 p_{5,2}=0,016
	T2	32,63 $\pm$ 11,52	88,44 $\pm$ 14,34	47,51 $\pm$ 20,30	43,81 $\pm$ 9,94 p_{5,2}=0,034
	Ts	72,62 $\pm$ 9,98	128,51 $\pm$ 16,60	80,91 $\pm$ 27,34	100,48 $\pm$ 6,28 p_{5,1}=0,034
	ts	9,20 $\pm$ 1,08	14,11 $\pm$ 3,24	7,50 $\pm$ 1,42	15,16 $\pm$ 1,87 p_{5,1}=0,012 p_{5,4}=0,014

Примітка. p_{5,1} – статистично значущі відмінності між групами 5 і 1, p_{5,2} – 5 і 2, p_{5,4} – 5 і 4.

При вивченні впливу МСК, ІЛ-10 та МСК в поєднанні з ІЛ-10 на поведінкові реакції щурів з індукованим ЕАЕ у «відкритому полі» доведено, що ІЛ-10 справляє менш виражений вплив, ніж МСК та МСК і ІЛ-10 [135]. Застосування МСКТ у щурів при індукованому ЕАЕ під час тестування у «відкритому полі» сприяло статистично значущому зменшенню вертикальної локомоторної активності та підвищенню емоційної активності, а також частково корегувало показники горизонтальної локомоторної активності, що наближалися до показників у інтактних тварин. При порівнянні впливу МСКТ і МСК на поведінкові реакції щурів встановлено, що МСКТ статистично значуще зменшували емоційну і дослідницьку активність тварин та позитивно впливали на показники горизонтальної локомоторної активності, що статистично значуще збільшувалися, наближаючись до таких в інтактних щурів. Результати дослідження показали, що МСКТ справляли більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів, ніж МСК.

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

Отже, результати дослідження свідчили про можливість корекції порушень поведінки щурів при індукованому ЕАЕ шляхом комбінованого застосування (МСК та ІЛ-10), відзначали послаблення негативного впливу емоційного стану, що супроводжувалося збільшенням орієнтовно-дослідницької активності та нормалізацією поведінкових реакцій тварин.

РОЗДІЛ 6

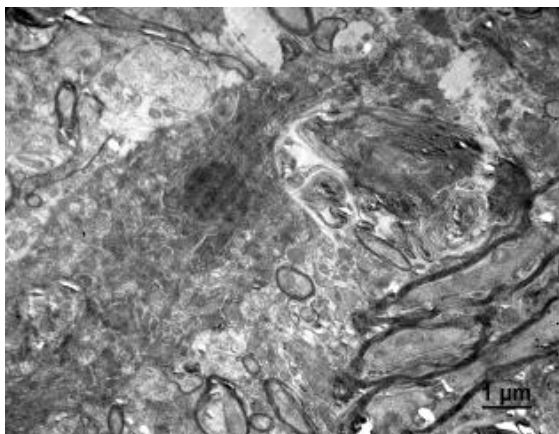
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ЕАЕ ПІД ВПЛИВОМ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ТА ІНТЕРЛЕЙКІНА 10

6.1. Ультраструктурні зміни спинного мозку щурів

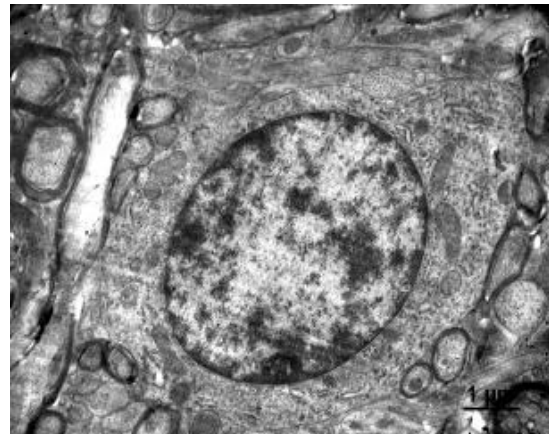
ЕАЕ (група порівняння) характеризується на електронно-мікроскопічному рівні деструктивними змінами клітин олігодендроцитів та поширеною демієлінізацією, що є основною морфологічною ознакою енцефаломієліту і, за даними світової літератури та попередніх досліджень лабораторії електронної мікроскопії є найвираженішою у спинному мозку експериментальних тварин на рівні поперекового відділу.

Олігодендроцити. На 35 добу в групі 1, в ділянках ураження найчастіше спостерігаються дегенеративні і деструктивні форми олігодендроцитів, що характеризуються різкою загальною осміофілією клітини, де ледве вирізняються контури ядра. На тлі осміофільної цитоплазми набухлі мітохондрії з втратою крист і різко розширений ендоплазматичний ретикулум (ЕПР) виглядають просвітленими. Такі зміни відносяться до передапоптичних. Деструктивно змінений олігодендроцит, як правило, оточений фрагментами дегенеруючих мієлінових волокон. Такі форми олігодендроцитів часто зустрічаються в групі порівняння аж до 60 доби експерименту (рис.6.1.а). Зміни з боку клітин олігодендроцитів експериментальних груп тварин у всі терміни дослідження носять поліморфний характер. Найчастіше зустрічаються реактивно змінені, і гіпертрофовані олігодендроцити. Цитоплазма олігодендроцитів як правило, огортає кілька аксонів, окремі – новоутворені аксональні колатералі. Реактивно змінені форми олігодендроцитів, поряд з деструктивними, частіше представлені в групі дослідження 3 (ЕАЕ+ІІ-10), і характеризуються порівняно електронно-

світлою цитоплазмою з розширеними канальцями і цистернами ЕПР і нечисленними набухлими мітохондріями і темним округлим або овальним ядром, заповненим як еу-, так глибокими гетерохроматину (Рис.6.2.а.). Гіпертрофовані олігодендрогліюцити в більшій мірі представлені в лікованих групах дослідження з використанням МСК. Ядро такої клітини овально-округлої форми, хроматин представлений як еу-, так і гетерохроматином, нерівномірно розподіленим по каріоплазмі. В окремих ядрах зустрічаються по 2 ядерця високоактивних типів – щільних або нуклеолонемних. Ядерно-цитоплазматичний індекс візуально зміщений у сторону цитоплазми. Канальці ендоплазматичного ретикулуму дещо розширені. В цитоплазмі та на канальцях гранулярного ЕПР розташовані численні рибосоми. В цитоплазмі подекуди зустрічаються лізосоми. Великі округлі або довгасті мітохондрії характеризуються дещо набухлими кристами (рис.6.1.б; 6.2.б).

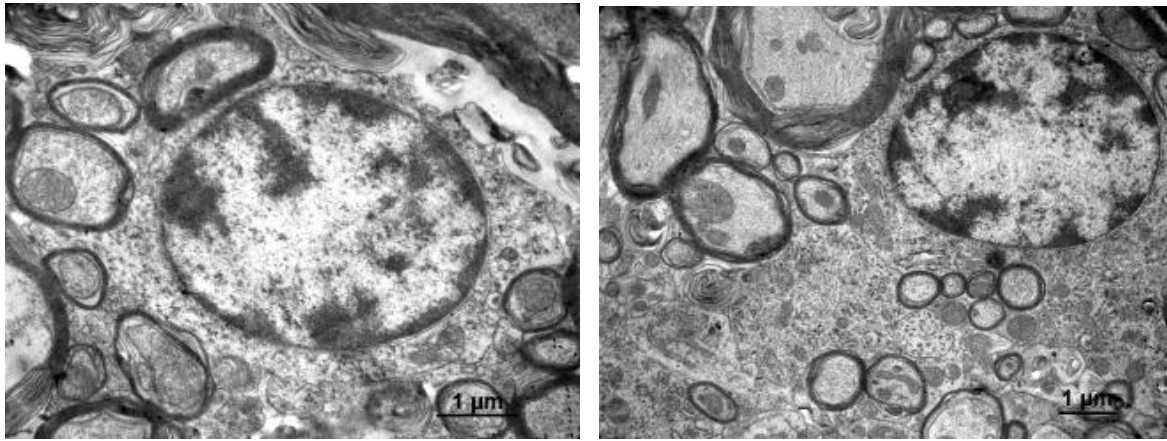


а



б

Рис. 6.1. Олігодендроглія. 60 доба. а. група 1. Апоптично змінений олігодендрогліоцит з фрагментами дегенеруючих мієлінових волокон; б. група 2. Олігодендрогліоцит з 2 ядерцями в каріоплазмі та численними рибосомами і мітохондріями в цитоплазмі, периферично – новоутворені аксональні колатералі; Електронні мікрофотографії: а x 5000; б x 6000



а

б

Рис. 6.2. Олігодендроглія. 60 доба. а. група 3. Просвітлена цитоплазма олігодендрогліюцита містить невелику кількість рибосом і нечисленні набухлі мітохондрії; б. група 4. Цитоплазма гіпертрофованого олігодендроцита огортає численні новоутворені аксональні колатералі. Електронні мікрофотографії: а х 8000; б х 6000

Олігодендроцити групи 5 ЕАЕ+МСК(Т) на 60 добу дослідження відрізняються численними набухлими мітохондріями з фрагментацією крист, аж до часткової вакуолізації органел. Це все дозволяє оцінювати стан таких олігодендрогліюцитів як компенсаторне функціональне напруження. Звертає на себе увагу і той факт, що кількість контактів окремих олігодендроцитів з мієліновими волокнами в площині зрізу в експериментальних групах тварин досягає 5 і більше (рис.6.1.б, 6.2. а, б; 6.3). Наявність таких клітин засвідчує можливість здійснення ними нормальної мієлінізації. Встановлені нами зміни будови олігодендрогліюцитів можуть відображати зміни їх метаболізму і перебудову їх білок-синтезуючого апарату, зокрема, ядра та ядерця, ЕПР, апарату Гольджі, а також мітохондрій.

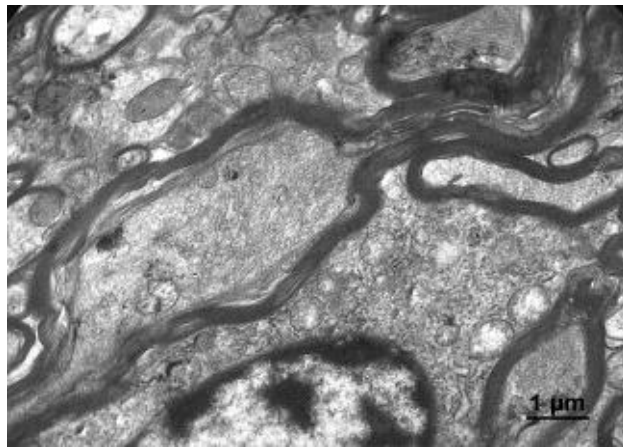


Рис. 6.3. Олігодендроглія. 60 доба. група 5. Набухлі мітохондрії з фрагментацією і частковою вакуолізацією крист та розширені каналці ЕПР в цитоплазмі олігодендрогліюцита. Електронна мікрофотографія x 6000

Де- і ремієлінізація. Електронно-мікроскопічне дослідження тканини спинного мозку щурів з ЕАЕ засвідчило поширену демієлінізацію осьових циліндрів на тлі помірного або значного периаksonального набряку. Внаслідок втрати частини цитоскелетних ультраструктур – мікротрубочок і нейрофіламентів, аксоплазма набуває часткового просвітлення. В той же час визначається різна ступінь набухання аксональних мітохондрій аж до повної їх вакуолізації. При цьому ушкодження мієлінової оболонки в даному експерименті характеризувалося вогнищевим розволокненням ламел, аж до часткового оголення осьового циліндру на тлі поширеного міжламелярного набряку; вогнищевим злипанням або частковим розщепленням і відшаруванням ламел з утворенням хвилястих або везикулярних форм. Периаksonально відмічена наявність великих вакуолей і фрагменти мієліноподібних структур (рис.6.4. а, б.).

Дослідження поперекового відділу спинного мозку тварин з індукованим ЕАЕ без лікування засвідчили, що і на 60 добу даного експерименту наростання ступеня вираженості демієлінізації не виявили. Значним залишалось розволокнення мієлінових оболонок. Зберігалось порушення

аксональних цитоскелетних структур, повна вакуолізація мітохондрій та помірний периаksonальний набряк (рис.6.4 а, б).

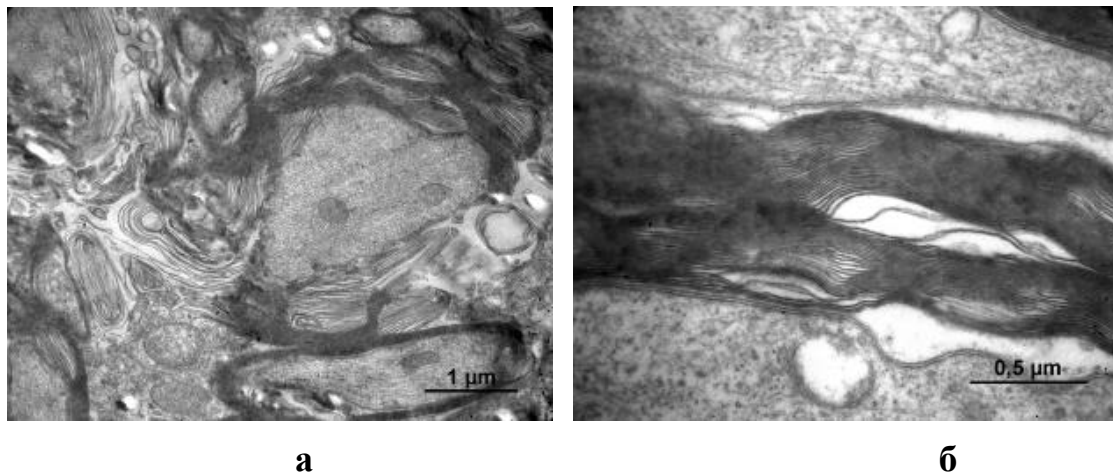


Рис. 6.4. Де- і ремієлінізація. Група 1. а. 35 доба. Мієлінові оболонки аксонів з розволокненням ламел, часткове оголення осевого циліндру. Периаksonально – наявність фрагментів дегенеруючих мієлінових структур; б. 60 доба. Розволокнення мієлінових оболонок, вакуолізація мітохондрій в аксоплазмі та помірний периаksonальний набряк мієлінізованих аксонів; Електронні мікрофотографії: а x 10000; б x 25000

Результати досліджень в експериментальних групах відносно групи порівняння на 35 добу засвідчують зменшення ступеня та площі демієлінізації з одночасним частковим зниженням інтраламілярного і майже повним – периаksonального набряку. Відмінності ультраструктури осевих циліндрів в експериментальних групах в основному були зумовлені зниженням ступеня набухання аксонів і нормалізацією стану внутрішньоаксональних мітохондрій. Так в аксоплазмі груп дослідження 2 (ЕАЕ+МСК) і 4 (ЕАЕ+МСК+ІЛ-10) поряд з набухлими мітохондріями з частковою фрагментацією та вакуолізацією крист, характерна поява новоутворених невеликих осміофільних органел зі щільними кристами (рис.6.5. а, б; 6.8. а,б.). В групі 5 ЕАЕ+МСК(Т) на 60 добу дослідження крім вищеописаних змін ультраструктури мієліну і мітохондрій ми виявили мітохондрії, кристи яких

були закручені в спіралеподібну структуру при збереженні утворюючих її подвійних мембран (рис. 6.6 а.б.).

Деякі автори розглядали такі структури як гіпертрофовані регенеруючі мітохондрії, інші дослідники вважали наявність таких структур доказом дистрофічних змін клітин, зокрема, в м'язах і нирках, де їх присутність корелювала зі зниженою активністю цитохромоксидази [65, 136]. Зниження активності цього ключового для мітохондрій ферменту, у свою чергу, може свідчити про те, що поява концентричних крист є морфологічною ознакою зниження енергетичних можливостей цих органел і клітини в цілому. Периаksonальний набряк більшості мієлінізованих волокон груп дослідження 2 ЕАЕ+МСК і 4 ЕАЕ+МСК+ІЛ-10, виявлявся на 35 добу дослідження і, в основному, зникав до 60 доби після початку експерименту.

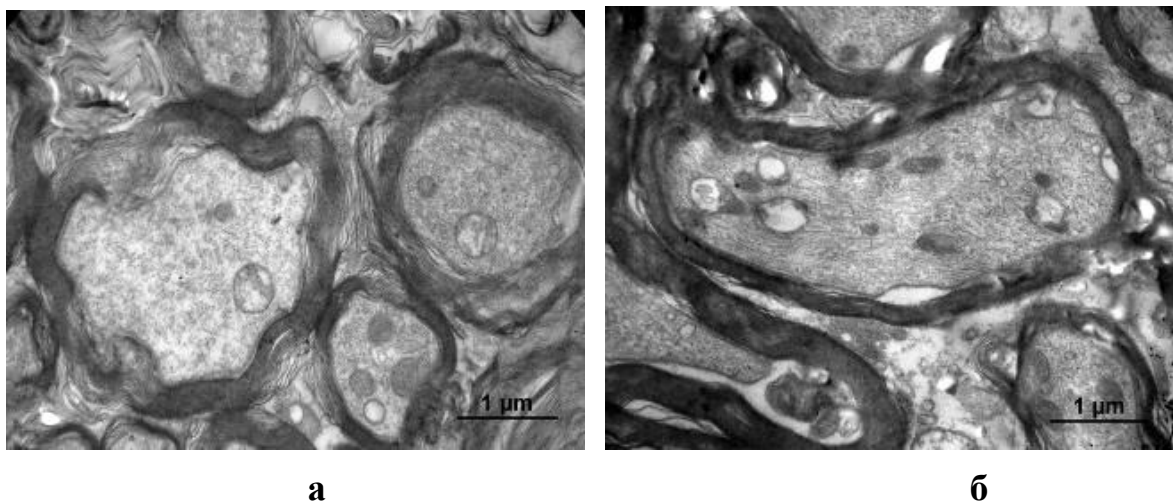
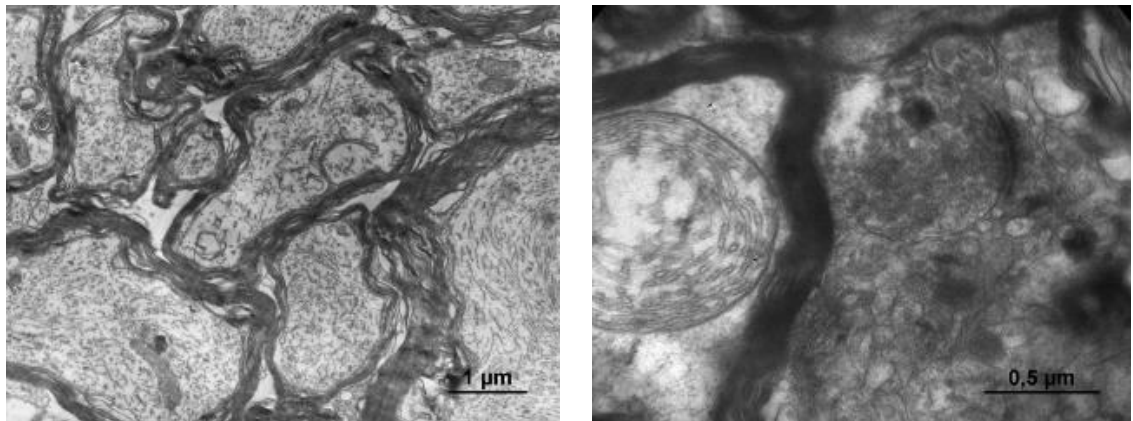


Рис 6.5. Де- і ре мієлінізація. 35 доба. а. група 2 (ЕАЕ+МСК). Вогнищеве розшарування ламел мієлінової оболонки аксонів; б. група 4 (ЕАЕ+МСК+ІЛ-10). Внутрішньоаксональні мітохондрії представлені органелами нормальної будови, поряд з набухлими формами з частковою вакуолізацією крист; Електронні мікрофотографії: а x 10000; б x 10000

До 60 доби відмічалася і нормалізація ультраструктур цитоскелету значної кількості аксонів стосовно всіх експериментальних груп, що ультраструктурно проявлялась у відновленні числа мікротрубочок і нейрофіламентів. Осібно стоїть група дослідження 3 ЕАЕ+ІЛ, де в жоден з термінів дослідження не було

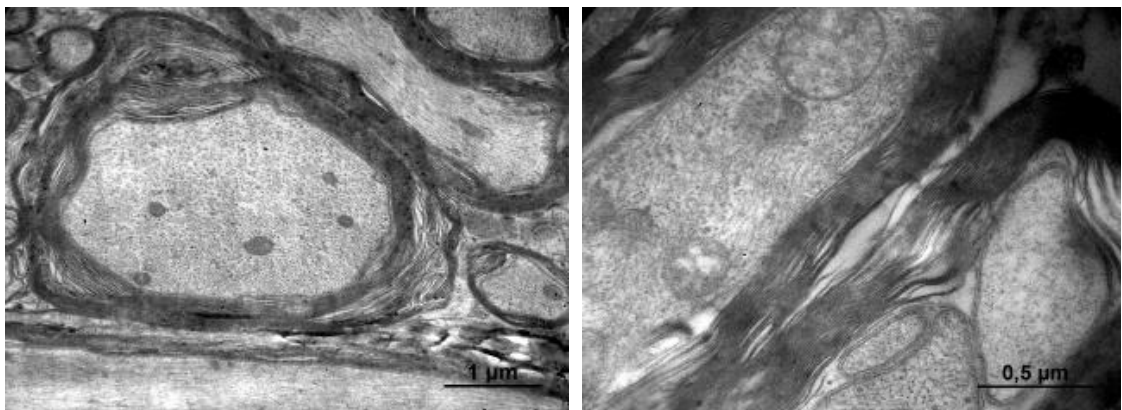
відмічено нормалізації структури мієлінових оболонок (рис. 6.7 а, б), а також група 5 ЕАЕ+МСКТ на 60 добу дослідження (рис.6.6 б).



а

б

Рис. 6.6. Де- і ре мієлінізація. Група 5 (ЕАЕ+МСКТ). а. 35 доба. Внутрішні витки мієліну, утворені відростками олігодендроцитів. б. 60 доба. Мітохондрії. Гігантська мітохондрія зі спіралеподібною структурою крист в аксоплазмі мієлінізованого аксона. Електронні мікрофотографії: а x 8000; б x 25 000



а

б

Рис 6.7. Де- і ре мієлінізація. Група 3 (ЕАЕ+ІЛ) а. 35 доба. Значне розшарування мієлінових оболонок мієлінізованого аксона; б. 60 доба. Набухлі мітохондрії з частковою фрагментацією та вакуолізацією крист; Електронні мікрофотографії: а x 10000; б x 25000

При цьому, мієлінові оболонки характеризувались ознаками суттєвого міжламелярного набряку з частковим порушенням впорядкованості ламел. Гістоархітектоніка мієлінізованих нервових волокон білої речовини

поперекових відділів спинного мозку в залежності від групи і терміну дослідження представлена вище і на рисунку 6.8.

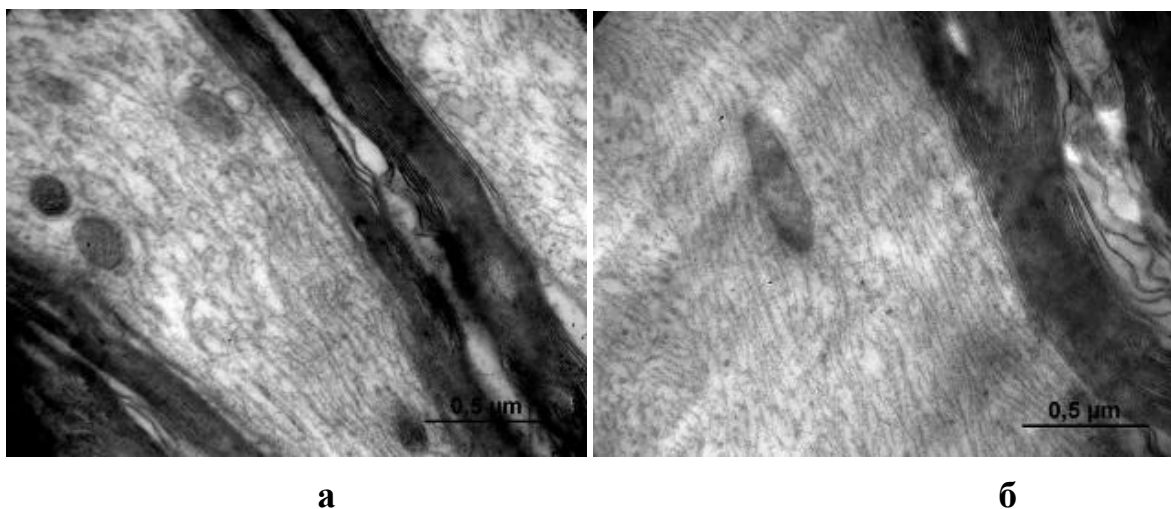
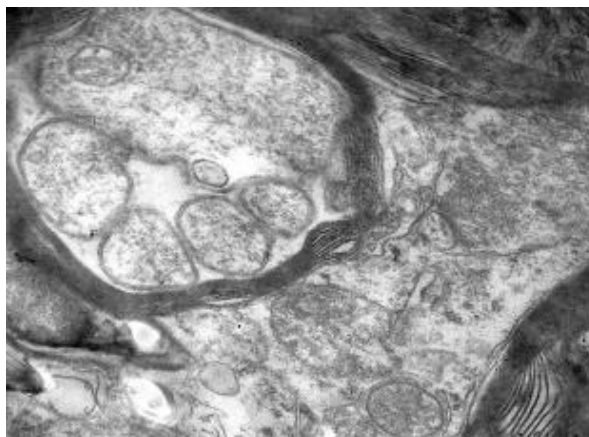


Рис. 6.8. Де- і ремієлінізація. Мітохондрії. 60 доба. а. Група 2 (ЕАЕ+МСК). Новоутворені невеликі мітохондрії зі щільними кристами; б. Група 4 (ЕАЕ+МСК+ІЛ-10). Нормалізація стану аксональних ультраструктур; Електронні мікрофотографії x 25 000

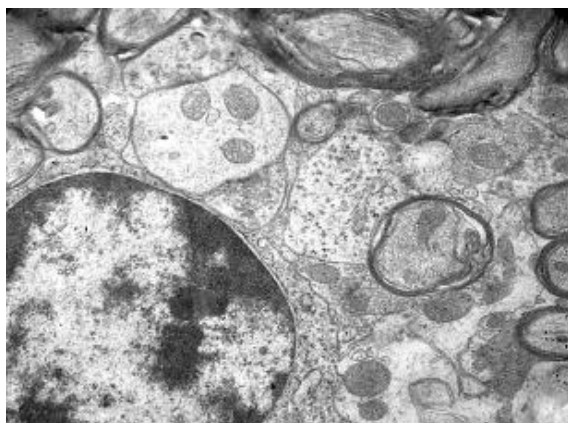
Структурні ознаки ремієлінізації нервових волокон у всіх групах дослідження починали з'являтися вже на 35 добу дослідження, при цьому новоутворена мієлінова оболонка вирізнялася наявністю тоншого, чим в контролі шару мієліну, що можна трактувати як ознаку ремієлінізації.

Ремієлінізація нервових волокон здійснювалась своєрідними відростками олігодендрогліоцитів в основному за рахунок утворення внутрішніх витків мієліну (рис. 6.5. а; рис. 6.6 а). Аксони в зоні 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 у всіх експериментальних групах дослідження.

Синапси. Серед синапсів сірої речовини спинного мозку в усіх групах і термінах дослідження присутні нехарактерні для норми набухлі просвітлені синапси з різко осміофільною активною зоною і сконцентрованими поблизу біля неї нечисленними синаптичними везикулами (рис. 6.9. а, б, в; рис. 6.10 а, б).



а



б



в x 10 000

Рис. 6.9. 60 доба. а – група 1; б і в – група 2. Синапси і фігури ремієлінізації – внутрішній виток мієліну. Електронні мікрофотографії: а x 15000; б x 8000; в x10000

Нарівні зі зменшенням числа змінюється розміщення синаптичних везикул в пресинаптичному закінченні, де останні утворюють невелику компакту групу біля пресинаптичної мембрани. Вважається, що зменшення кількості синаптичних везикул в пресинаптичному закінченні є морфологічним еквівалентом зменшення в мозку ряду трансмітерів. Наприклад, при порушенні метаболізму катехоламінів внаслідок ішемії мозку, число подібних синапсів збільшується. У деяких синапсах звертала на себе увагу фокальна плеїоконія майже не змінених мітохондрій, які заповнювали весь просвіт цих волокон (рис.6.9.). Інші (зокрема, в ділянках постсинаптичного закінчення), навпаки, були майже позбавлені всяких органел, в тому числі і мітохондрій (рис.6.10.а.).

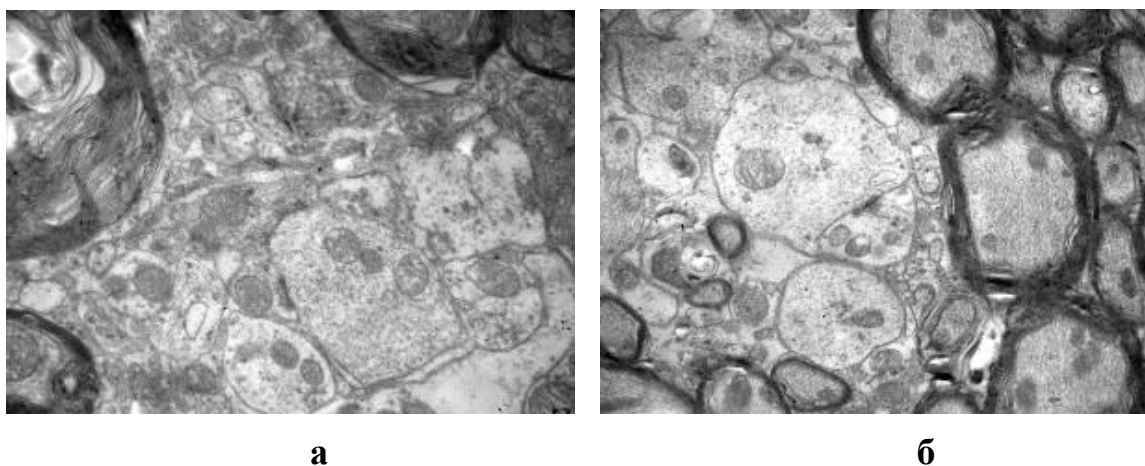


Рис. 6.10. 60 доба. Синапси і ознаки утворення внутрішніх витків мієліну у 3 (а) і 4 (б) групах тварин. Електронні мікрофотографії: а x 10 000; б x 10 000

Частіше, ніж в контролі, зустрічалися синапси з великими везикулами, в тому числі з щільною осміофільною серцевиною (рис.6.11.).

Таким чином, значна частина синапсів сірої речовини спинного мозку в експериментальних групах дослідження навіть до кінця експерименту не повертається до норми.

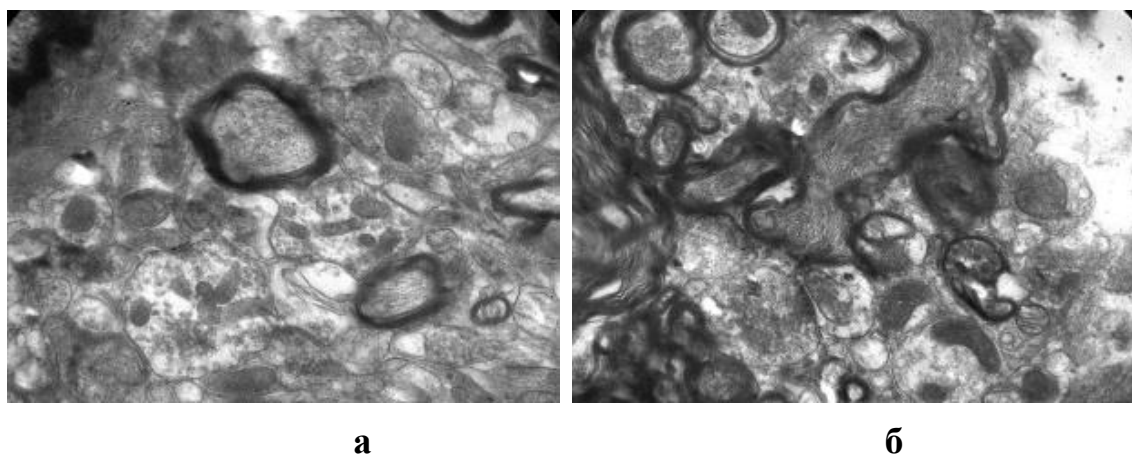


Рис. 6.11. Група 5 (ЕАЕ+МСКТ) а. 35 діб і б. 60 діб. Синапси з великими везикулами, в тому числі з щільною осміофільною серцевиною і ознаки утворення внутрішніх витків мієліну. Електронні мікрофотографії: а x 10 000; б x 10 000

Нейрони. При електронно-мікроскопічному дослідженні поперекового відділу спинного мозку у тварин 1 групи (ЕАЕ) з виразною закономірністю виявлялися нейрони з різко вираженою вакуолізацією цитоплазми (рис. 6.12.). На напівтонких зрізах, забарвлених метиленовим синім-піроніном на світлооптичному рівні нервова тканина поперекового відділу спинного мозку загалом мала спонгіозний вигляд.

Електронно-мікроскопічне дослідження засвідчило, що більшість вакуолей - це мітохондрії, які втратили кристи. Крім цього, визначалися і вакуолі іншого генезу: утворені розширеними канальцями ЕПР і гіперплазованими цистернами апарату Гольджі. Цитоплазма таких нейронів була нерівномірно осміюфільною, за рахунок того, що між вакуольний простір характеризувався досить високою електронною щільністю. Втрата крист мітохондріями може бути викликана активацією процесу перекисного окислення ліпідів та іншими метаболічними порушеннями як при ЕАЕ, так і в інших випадках напруженого функціонування нейронів і глії.

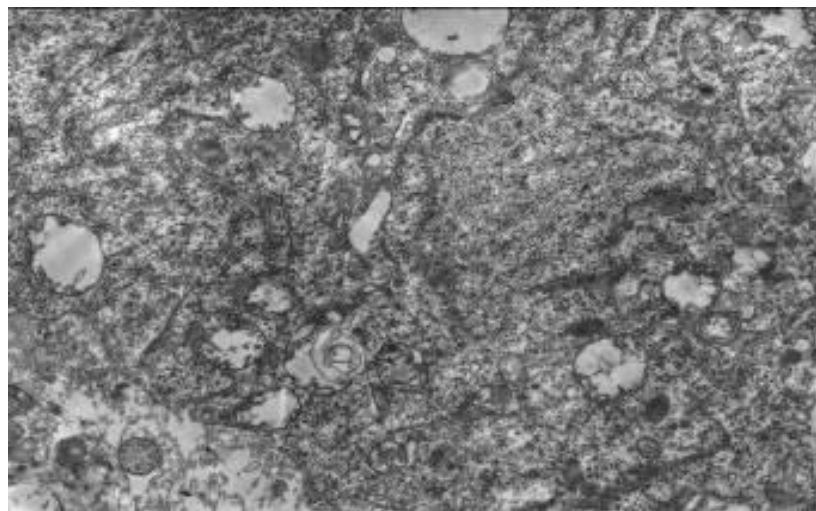
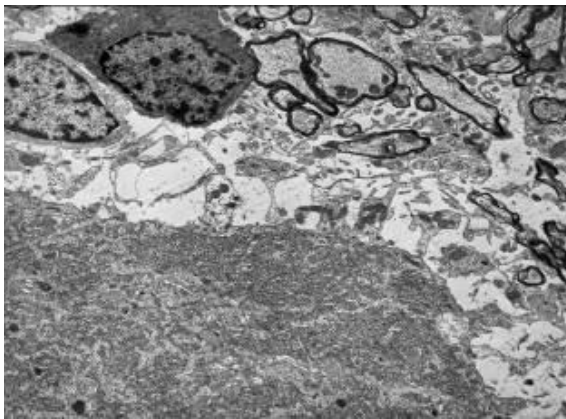


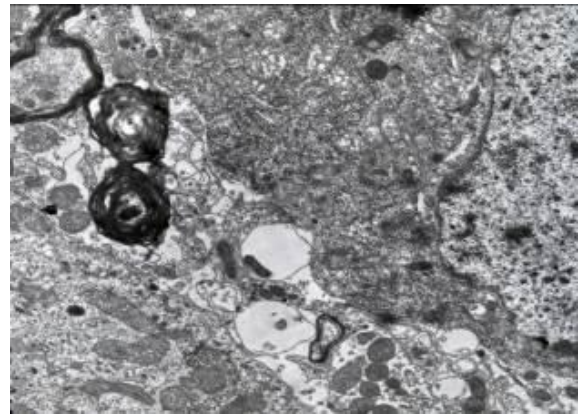
Рис. 6.12. Група тварин 1. 60 діб. Нейрони з різко вираженою вакуолізацією цитоплазми. Електронна мікрофотографія x 10 000

В експериментальних групах у всі терміни дослідження частина нейронів поперекового відділу спинного мозку також характеризується підвищеною щільністю ядра і цитоплазми і численними вакуолями різного генезу. В

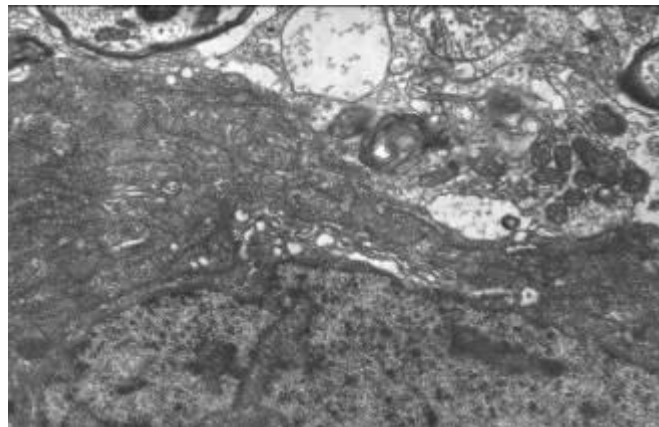
цитоплазмі таких нейронів інколи зустрічаються лізосоми, крім цього клітини, як правило, характеризуються високою концентрацією рибосом (рис. 6.13. а, б, в). Ядерний апарат нейронів спинного мозку загалом зберігає відносно нормальну будову з деякими ознаками гіперхромії. При цьому в ядрі часто зустрічаються функціонально активні великі нуклеолонемні ядерця. На підставі такої морфологічної картини ми розглядали ці нейрони не як дегенеруючі, а як нейрони, що знаходяться в стані надзвичайного напруження.



а



б



в

Рис. 6.13 60 діб. Цитоплазма нейронів групи 2 (а), 4 (б) та 5 (в) з великою кількістю рибосом. Електронні мікрофотографії: а х 6 000; б х 8000; в х 8000

В експериментальній групі тварин, яким вводили інтерлейкін, як і в групі порівняння, подекуди зустрічалися нейрони з руйнуванням не тільки мітохондрій, але і різкою вакуолізацією апарата Гольджі і ЕПР (рис. 6.14) та зі змінами ядерного апарату: ущільненням каріоплазми і відсутністю ядерців. Такі нейрони розглядали як такі, що знаходяться на початкових стадіях дегенерації по «темному типу» (не за рахунок вакуолізації або набряку).



Рис. 6.14 60 діб. Група 3. Зруйновані мітохондрії і виражена вакуолізація апарата Гольджі і ЕПР у цитоплазмі нейронів. Електронна мікрофотографія x 10 000

Для оцінки ступеню демієлінізації розраховували коефіцієнт відношення товщини мієлінової оболонки (МО) до діаметра осевого циліндра (ОЦ) на комп'ютерному аналізаторі зображень САІ-01АВН. Для статистичного аналізу впливу різних схем клітинної терапії на морфофункціональний стан мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з модельованим ЕАЕ використовували ДА Краскела-Уолліса, згідно з яким 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. При

цьому за даними міжгрупового порівняльного аналізу, ураховуючи поправку Хольма-Бонферроні, відносно групи з ЕАЕ на 35 добу спостерігається статистично значуща різниця між цією групою та всіма експериментальними групами, за винятком групи дослідження 33 (табл. 6.1., рис. 6.15).

Таблиця 6.1

Вплив різних видів клітинної терапії на морфо-функціональний стан мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з модельованим ЕАЕ

Параметри	Вид впливу / термін дослідження	35 доба	60 доба
Товщина мієлінової оболонки / діаметр осьового циліндра, коефіцієнт	Контроль	0,36 (0,34; 0,38)	0,36 (0,34; 0,38)
	Гр.1 (ЕАЕ)	0,55 (0,46;0,59) $p_{K-1}=0,0000$	0,53 (0,48;0,62) $p_{K-1}=0,0001$
	Гр.2 (ЕАЕ+МСК)	0,42 (0,37;0,45) $p_{1-2}=0,002$	0,41 (0,34;0,48) $p_{1-2}=0,0001$
	Гр.3 (ЕАЕ+ІЛ)	0,49 (0,39;0,57) $p_{K-3}=0,009$	0,50 (0,44;0,54) $p_{K-3}=0,004$ $p_{2-3}=0,02$
	Гр.4 (ЕАЕ+МСК+ІЛ)	0,37 (0,33;0,42) $p_{1-2}=0,0000$ $p_{3-4}=0,005$	0,34 (0,29;0,42) $p_{1-2}=0,0000$ $p_{3-4}=0,0001$
	Гр.5 (ЕАЕ+МСКТ)	0,37 (0,32;0,52) $p_{1-2}=0,0000$ $p_{3-5}=0,05$	0,49 (0,42;0,62) $p_{K-5}=0,004$ $p_{2-5}=0,02$ $p_{4-5}=0,00009$

Примітка. М (25%; 75%) (n), де М - медіана; (.) - інтерквартильний діапазон.

Так, в експериментальних групах спостерігалось статистично значуще зниження показника МО/ОЦ відносно групи 1 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 виглядає дещо гіршим – 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 периаksonального і міжламільярного 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 $p_{3-4}=0,005$; $p_{3-5}=0,05$). 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. На їх тлі виявляються ділянки впорядкованості ламел та нервові волокна з тонким шаром мієліну – прояви ремієлінізації аксонів.

Згідно з ДА Краскела-Уолліса для показника МО/ОЦ на 60 добу експерименту – $H(4, n = 160) = 56,26$; $p = 0,0000$; тобто групи дослідження, як і в попередній термін, статистично високозначуще різняться між собою. При цьому за даними міжгрупового порівняльного аналізу, зберігається статистично значуща різниця між групою порівняння та експериментальними групами. Так, показник МО/ОЦ для групи 2 відносно групи з ЕАЕ знижувався в 1,3 разу (з 0,53 (0,48;0,62) до 0,41 (0,34;0,48); критерій U-Манна-Уїтні, $p=0,0001$), а для групи 4 – в 1,6 разу (до 0,33 (0,29;0,42); критерій U-Манна-Уїтні, $p=0,0000$).

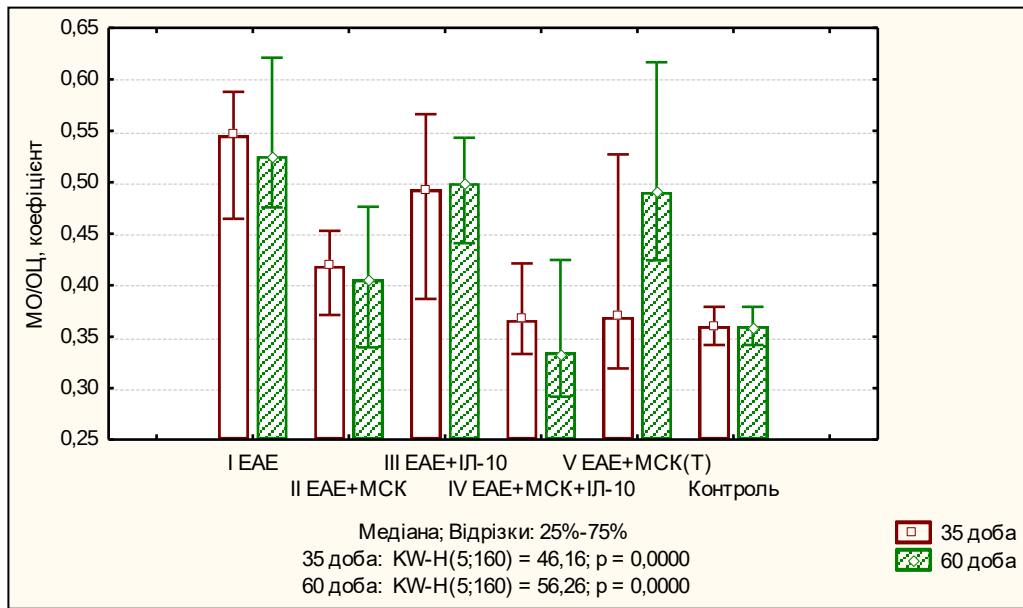


Рис. 6.15 Динаміка змін коефіцієнту відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра у білій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ під впливом різних схем введення МСК та ІЛ-10

Між групою порівняння та групами 3 і 5 показник МО/ОЦ знижувався всього в 1,1 разу (відповідно до 0,50 (0,44;0,54) і до 0,49 (0,42;0,62)), і статистично значущої різниці не виявляв. В цей термін дослідження, як і в попередній, наявні статистично значущі відмінності між групою 3 та іншими лікованими групами (критерій U-Манна-Уїтні, для груп 2 і 4 відповідно $p=0,02$, і $p=0,0001$), крім групи 5, що до 60 доби показала досить значне статистично значуще зростання показника МО/ОЦ відносно 35 доби – в 1,3 разу (критерій U-Манна-Уїтні, $p=0,001$).

На 60 добу експерименту, за даними міжгрупового порівняльного аналізу, зберігається статистично значуща різниця між групою порівняння (ЕАЕ) та експериментальними групами. 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, найвагомішим фактом, встановленим нами, є значне зменшення коефіцієнта МО/ОЦ в групах тварин з ЕАЕ, 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 зниження ступеня міжламелярного і периаksonального 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 речовини спинного мозку в експериментальних групах тварин.

6.2. Динаміка морфологічних змін спинного мозку щурів експериментальних груп на світлооптичному рівні

З метою об'єктивізації гістоструктурних зрушень, виявлених на серії гістологічних препаратів у білій речовині спинного мозку дослідних тварин з модельованим ЕАЕ - у експериментальних та контрольних (група порівняння) тварин - застосовано метод морфометричної оцінки з аналізом наступних напівкількісних показників ступеня поширеності процесу демієлінізації нервових волокон з виділенням варіантів:

1) тотальний тип демієлінізації – периаksonальні спустошення, як наслідок пошкодження мієлінових оболонок нервових волокон внаслідок демієлінізуючого процесу прослідковуються навколо 100% аксонів;

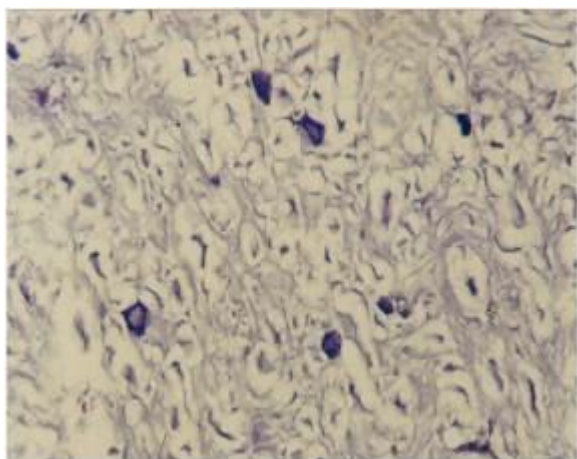
2) субтотальний тип демієлінізації - периаksonальні спустошення, як наслідок демієлінізуючого процесу з пошкодженням мієлінових оболонок аксонів, прослідковуються навколо біля 75% аксонів;

3) частковий тип демієлінізації - периаksonальні спустошення, як наслідок демієлінізуючого процесу руйнування мієлінових оболонок, прослідковуються навколо 50% або меншої кількості аксонів.

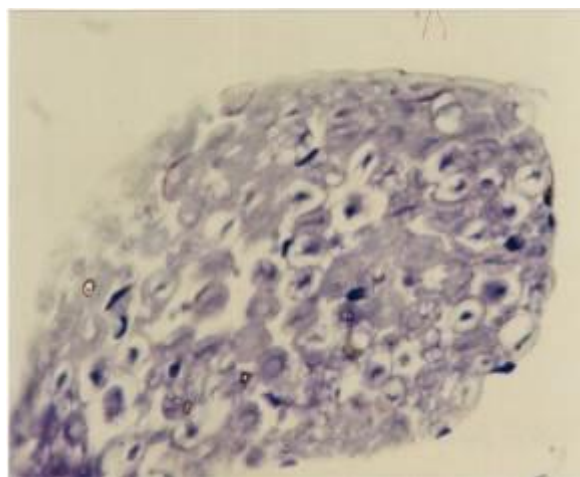
З метою оцінки зрушень з боку нейрональної популяції у сірій речовині спинного мозку тварин з модельованим ЕАЕ у більшості дослідів визначався процентний кількісний вміст нейронів з цитоструктурними ознаками дистрофічних та некробіотичних патологічних змін, включаючи необоротно (деструктивно) змінені нейроклітини (клітини-тіні) серед загальної кількості нейронів, підрахованих в середньому у 10 полях зору на гістологічних препаратах, виведених на монітор цитоаналізатора зображення (IBAS 2000 Німеччина) при стандартних збільшеннях мікроскопу (x 125). Цитоструктурні ознаки патології нейронів оцінювали згідно класичним критеріям патоморфологічних змін нейроцитів за загальноприйнятою класифікацією типів патології нервових клітин.

При гістологічному дослідженні білої речовини поперекового потовщення спинного мозку щурів з модельованим ЕАЕ (група порівняння) на 35 добу на реєструються структурні ознаки поширеного тотального процесу демієлінізації. Мієлінові оболонки аксонів внаслідок руйнування трансформувалися у циркулярні спустошення, які оточують здавлені, деформовані або зморщені аксони (рис. 6.16 а). Подібні деструктивні зміни спостерігаються також на зрізах нервових корінців (рис. 6.16. б).

Місцями такі спустошення навколо залишкових аксонів зливаються між собою, утворюючи ділянки досить поширених комірчастих структур. Серед клітин гліального компоненту у білій речовині виявляються лише поодинокі дифузно розташовані клітини олігодендроглії та астроглії у стані реактивної гіпертрофії (рис. (рис. 6.16. а).



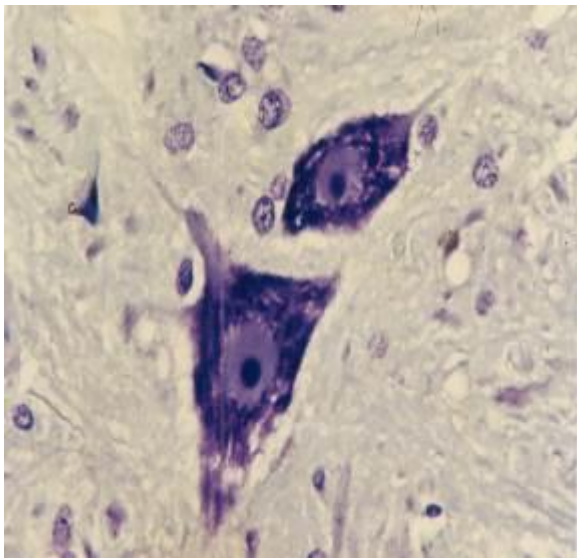
а



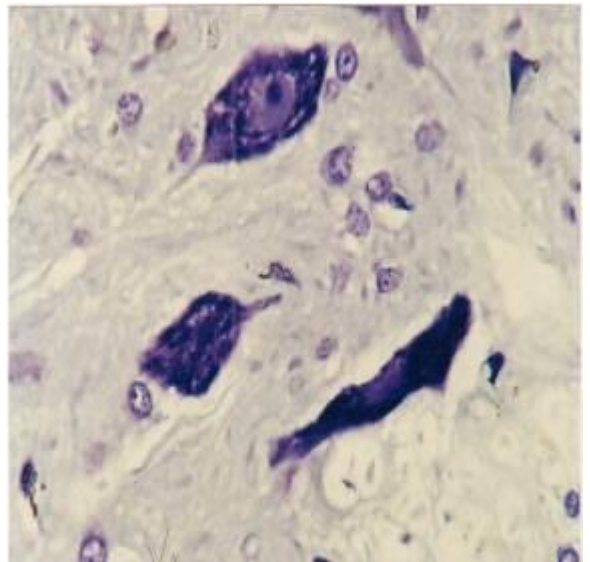
б

Рис. 6.16. Гістологічний зріз а. - спинного мозку; б. - нервового корінця щурів з модельованим ЕАЕ. 35 доба. Пояснення у тексті. Забарвлення тіоніном. х800

У сірій речовині спинного мозку цих тварин на 35 добу дослідження лише окремі нейрони виявляють типову цитоструктуру, наближену до нормальної (рис.6.17 а.). У 49,9% нейроцитів реєструються різні патологічні зміни. Зокрема виявляється нерівномірна ущільненість тигроїдної субстанції з підвищеним забарвленням, що відбиває порушення тінкторіальних властивостей рибонуклеїдного комплексу цитоплазми внаслідок порушення проникності клітинних мембран. У деяких нейроцитах спостерігається тотальна гомогенізація субстанції Нісля (тигроїдної) та лізис ядер з руйнуванням оболонки при відсутності візуалізації ядерця (рис.6.17.б.). Деякі некробіотично змінені нейроцити набули вигляду клітин-тіней. На всьому протязі зрізів спинного мозку контрольних щурів з модельованим ЕАЕ у цей строк спостерігаються також явища перичелюлярного та периваскулярного набряку.



а



б

Рис. 6.17. Гістологічний зріз сірої речовини спинного мозку тварин з ЕАЕ. 35 доба. а. - відносно збережена структура окремих нейроцитів; б. – деструктивно змінені нейрони. Забарвлення тіоніном. х 800

На 60 добу дослідження у тканині спинного мозку контрольних щурів визначається посилення структурних ознак тотальної демієлінізації аксонів білої речовини. Майже на всьому протязі досліджених препаратів спинного мозку та його корінців визначаються на поперекових зрізах деформовані аксони, оточені спустошеннями циркулярного вигляду, утворених внаслідок руйнування мієлінових оболонок. Частка пошкоджених аксонів набуває гомогенізованого вигляду тіней. Клітини глії дистрофовані з гіперхромними ядрами.

У сірій речовині спинного мозку у цей строк 56,6% нервових клітин виявляють різні цитологічні прояви патологічних змін – від ознак ішемії, тигролізу, каріолізу до утворення клітин-тіней (рис.6.18.).

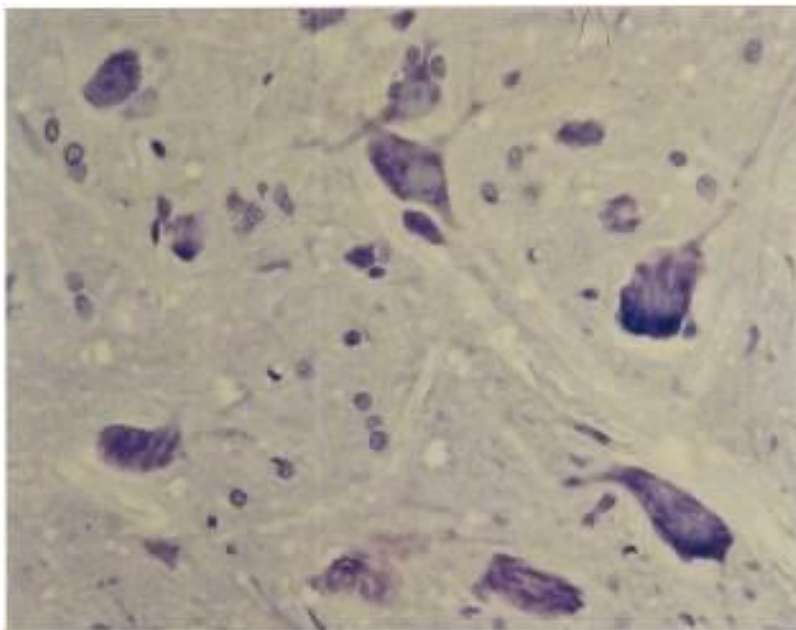


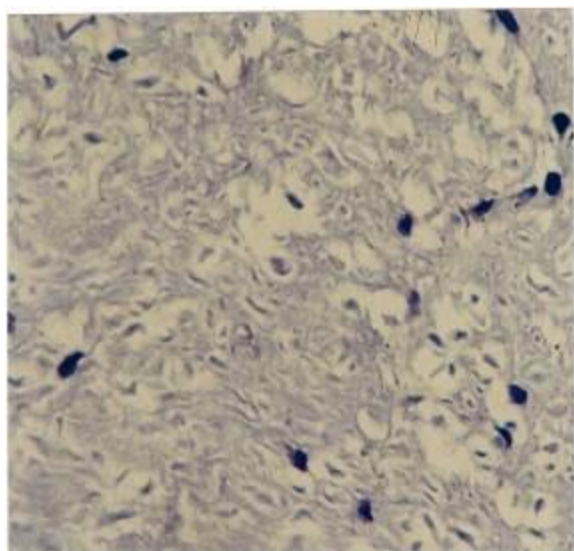
Рис.6.18 Дистрофовані та некробіотично змінені нейрони у сірій речовині спинного мозку тварин з ЕАЕ. 60 доба. Забарвлення тіоніном. x 400

Судини з ознаками стазу формених елементів оточені зонами периваскулярного набряку. Навколо деяких судин - невеликі вогнищеві крововиливи.

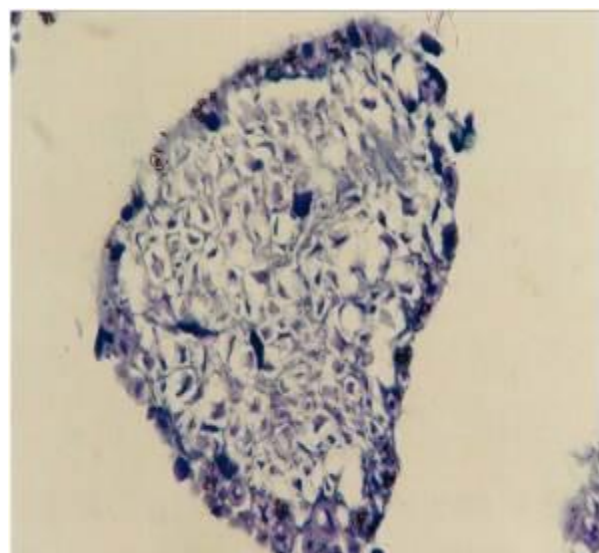
Таким чином, у динаміці спостереження на 60 добу у тканині спинного мозку щурів ступінь патологічних змін, обумовлених ЕАЕ, посилюється.

При гістологічному дослідженні зразків спинного мозку щурів з модельованим ЕАЕ, яким субокципітально вводили МСК, у порівнянні з контролем на 35 добу візуально виявляється помітне зменшення демієлінізації аксонів білої речовини та нервових волокон у корінцях (рис. 6.19. а; б).

Поряд з цим серед популяції моторних нейронів у ділянці передніх рогів спинного мозку експериментальних щурів реєструється більша збереженість загальної цитоструктури нейронів у порівнянні з контрольною групою (рис.6.20).



а



б

Рис. 6.19. Гістологічний зріз а. - спинного мозку; б. - нервового корінця щурів 2 гр.. (ЕАЕ+МСК). 35 доба. Пояснення у тексті. Забарвлення тіоніном. х 800

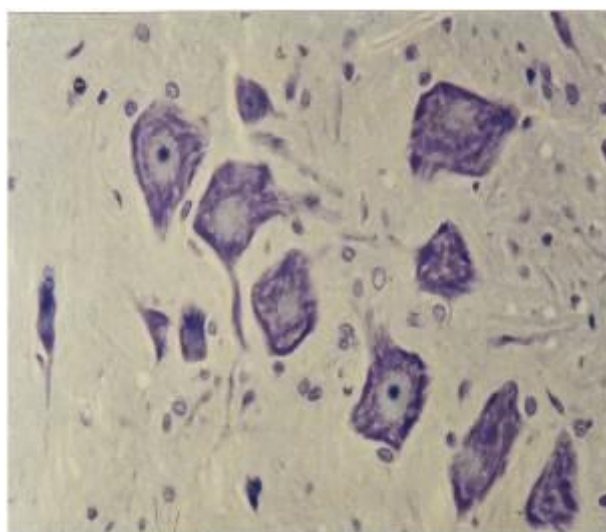


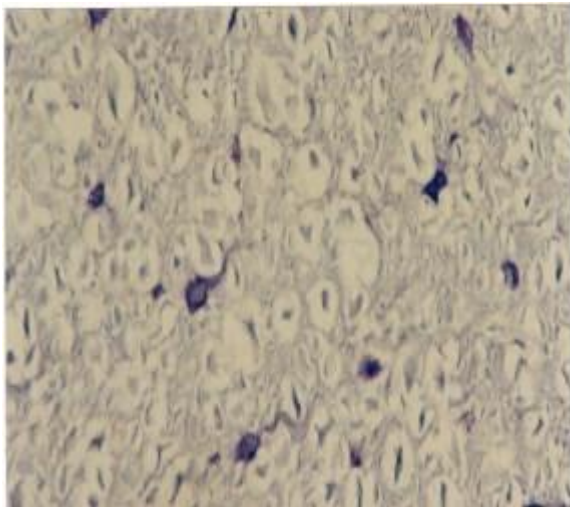
Рис.6.20. Гістологічний зріз сірої речовини спинного мозку тварин 2 групи. 35 доба. Переважання збережених нейронів у тканині сірої речовини. Забарвлення тіоніном. х 400

Відзначається також суттєве зменшення вмісту патологічно змінених нейроцитів, які складають 32,85% проти 49,97% у спинному мозку контрольних нелікованих щурів.

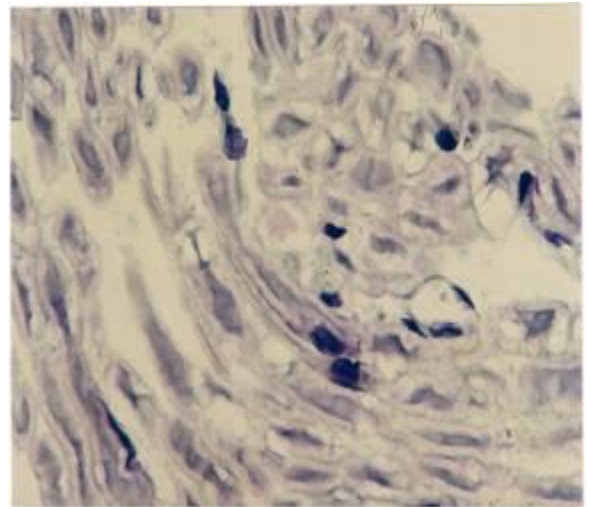
На 60 добу гістологічного дослідження тканини спинного мозку щурів II групи, у порівнянні з попереднім строком (35 доба), ступінь демієлінізації аксонів у білій речовині спинного мозку дещо посилюється, (рис.6.21. а).

Гліальні клітини виявляють ознаки реактивної гіпертрофії цитоплазматичних тіл. Подібні патологічні зміни спостерігаються на зрізах нервових корінців у вигляді набухання їх оболонок (рис.6.21. б).

Серед нейроцитів сірої речовини спинного мозку щурів цієї групи на 60 добу лише поодинокі нейроклітини зберігають ядро та малюнок хроматину і субстанції Ніссля. У переважній більшості нейроцитів спостерігаються ознаки дистрофії та некробіозу з утворенням клітин-тіней. У гліальних клітинах виявляються ознаки каріолізу, гіпохромії, гідропічної трансформації та зустрічаються клітини-тіні (рис.6.22.). При цьому частка патологічно змінених нейроцитів збільшується, досягаючи 56,65%.



а



б

Рис. 6.21. Гістологічний зріз а. - спинного мозку; б. - нервового корінця щурів гр.2 (ЕАЕ+МСК). 60 доба. Пояснення у тексті. Забарвлення тіоніном. х 800

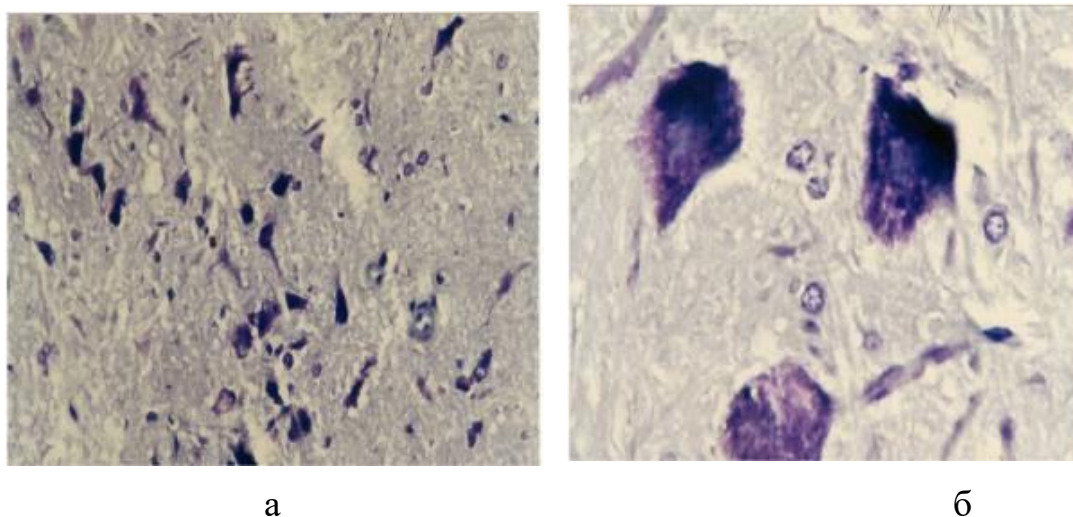


Рис. 6.22. Гістологічний зріз сірої речовини спинного мозку тварин 2 групи. 60 доба. а – переважання нейроцитів з некробіотичними змінами; б – дистрофовані нервові клітини спинного мозку. Забарвлення тіоніном. х 800

При гістологічному дослідженні на 35 добу тканини спинного мозку щурів III групи (ЕАЕ+ ІЛ в/в і субокципітально) виявлено, що структурний стан нервової тканини спинного мозку візуально виявляється більш збереженим у порівнянні з контрольною та II групою дослідних тварин. У білій речовині та у корінці спинного мозку реєструється зменшення демієлінізації порівняно з контрольними зразками (рис.6.23).

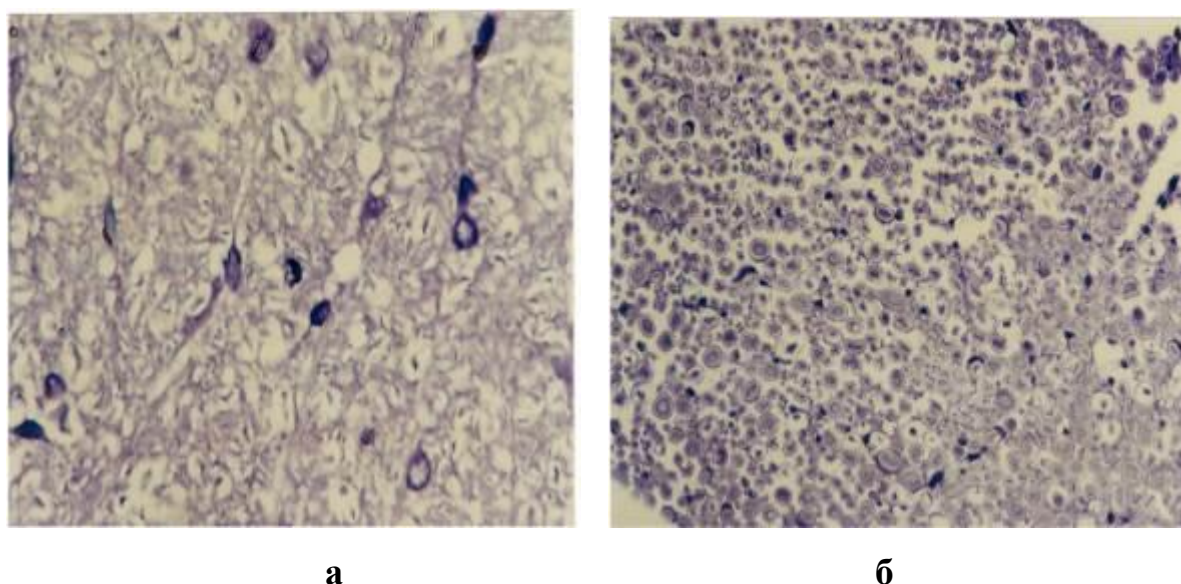
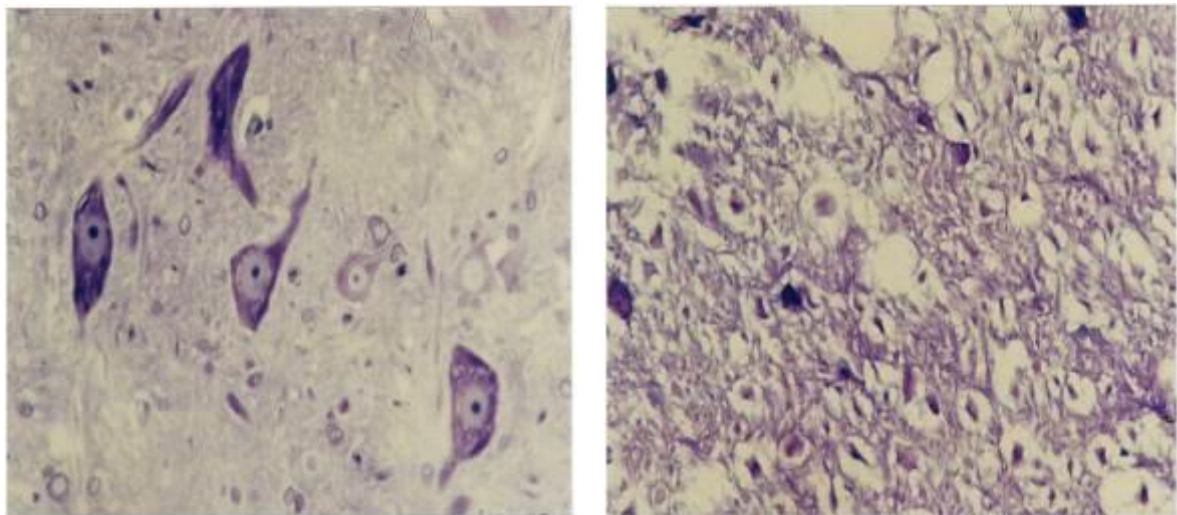


Рис. 6.23. Гістологічний зріз а - спинного мозку; б - нервового корінця щурів 2 групи (ЕАЕ+МСК). 35 доба. Пояснення у тексті. Забарвлення тіоніном. х 800

Зменшення ступеня демієлінізації у білій речовині спинного мозку на 35 добу супроводжується деяким зниженням вмісту патологічно змінених нейроцитів серед нейронів сірої субстанції спинного мозку. При цьому більше 50% нейроцитів містять ядра з чіткими ядерцями та добре виразним малюнком тигроїдної субстанції у цитоплазмі (рис.6.24. а).



а

б

Рис. 6.24. Гістологічний зріз спинного мозку щурів 3 групи. 35 доба. а – переважання нейронів із збереженою структурою. Окремі клітини-тіні. Б – посилення ступеня демієлінізації аксонів, гіпертрофовані гліюцити. Забарвлення тіоніном. х 800

У порівнянні з контролем дещо менша частка нейронів сірої субстанції (41,73%) виявляє ознаки ішемічного стану, часткового тигролізу, лізису ядерця, редукції відростків, спостерігаються також окремі клітини-тіні. Але частіше нейрони мають збережену цитоструктуру.

У білій речовині також визначається посилення структурних ознак демієлінізації аксонів та збільшення вмісту реактивних гіпертрофованих форм гліюцитів. На поперекових зрізах аксони грубо деформовані з частковим або тотальним лізисом. Місцями вогнища демієлінізації утворюють спустошення різної поширеності (рис. 6.24. б). Навколо деяких судин капілярного типу реєструються периваскулярний набряк та дрібні скупчення змінених еритроцитів.

У сірій речовині спинного мозку тварин 3 групи на 60 добу дослідження реєструється збільшення вмісту пошкоджених нейроцитів з редукованими, або скороченими та значно потовщеними відростками. Деякі нейроцити містять гіперхромні пікнотизовані ядра з відсутністю ядерця, або ядра не візуалізуються. В цитоплазмі таких нейроцитів виявляється глибока фрагментація тигроїдної субстанції з утворенням клітин-тіней (рис.6.25).

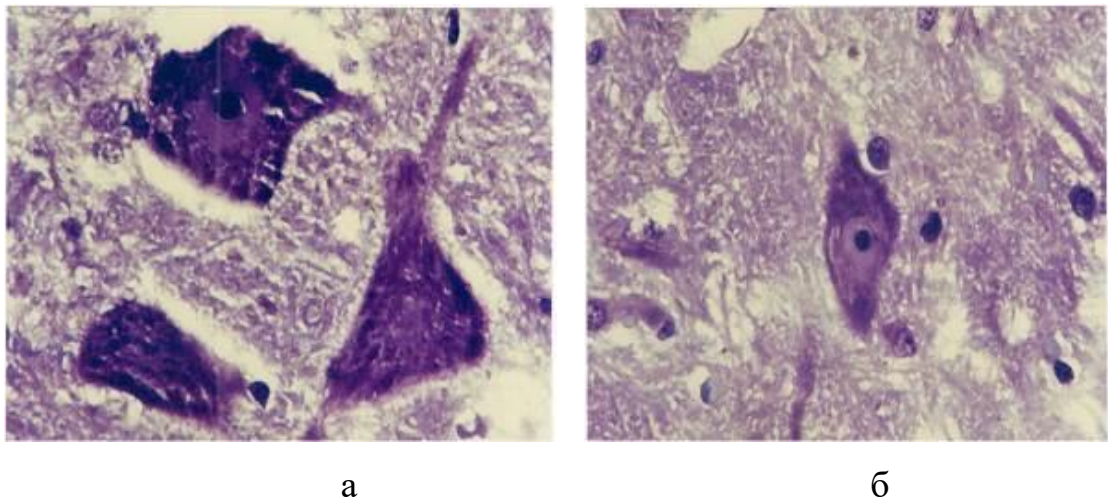


Рис. 6.25. Гістологічний зріз сірої речовини спинного мозку тварин 3 групи. 60 доба. а – грубо змінені нейроцити; б – окремі нейрони зберігають звичайну структуру ядра з ядерцем. Забарвлення тіоніном. х 800

Частка патологічно змінених нейроцитів складає 41,46 % проти 49,97 % у контролі. Все ж деякі нейроцити мають збережені фенотипові ознаки з наближенням до нормальної цитоструктури (рис.6.25.). У більшості клітин гліального компоненту виявляється гіперхроматоз ядер.

Патоморфологічне дослідження тканини спинного мозку щурів 4 групи на 35 добу показало, що у порівнянні з контрольною групою тварин та попередніми експериментальними групами виявлена дещо менша поширеність демієлінізації аксонів білої речовини. Серед гліоцитів виявляються реактивні форми (рис. 6.26). У сірій речовині спинного мозку на 35 добу цитоструктура більшості нейронів виявилася збереженою. Вони мають характерну форму цитоплазматичних тіл та досить довгі

відростки, ядра правильної круглої форми містять чітко виражені ядерця. При морфометричній оцінці виявилася зменшеною частка патологічно змінених нейронів: 32,75 % проти 49,97% в групі порівняння, хоча серед них зустрічаються клітини-тіні (рис.6.26).

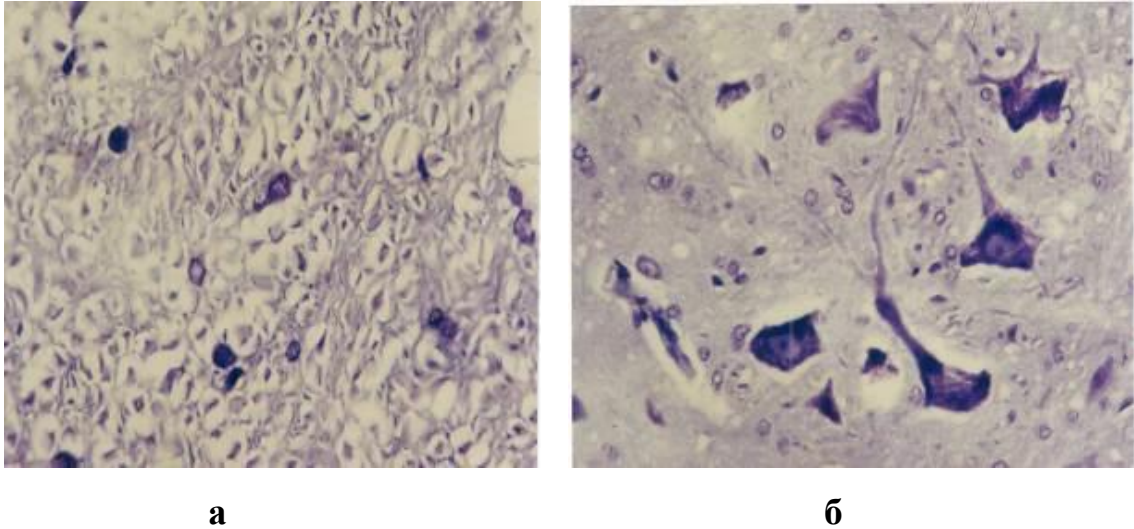


Рис. 6.26. Гістологічний зріз сірої речовини спинного мозку тварин 4 групи. 35 доба. а – менша вираженість де мієлінізації у порівнянні з попередніми групами; б – цитоструктура нейронів спинного мозку. Забарвлення тіоніном. х 800

Результати патоморфологічної оцінки стану білої речовини спинного мозку щурів, забитих на 60 добу, показали, що поширеність демієлінізації аксонів залишається майже на такому ж рівні, як і в попередній строк дослідження (на 35 добу). У проміжках між демієлінізованими ділянками спостерігаються зони білої речовини збереженої структури (рис.6.27).

У сірій речовині спинного мозку частка патологічно змінених нейронів теж зменшена і складає 39,76 % проти 49,97% в контрольній групі тварин. Серед них спостерігаються нейрони з ознаками ішемії, лізису ядер, тигролізу, а також клітини-тіні.

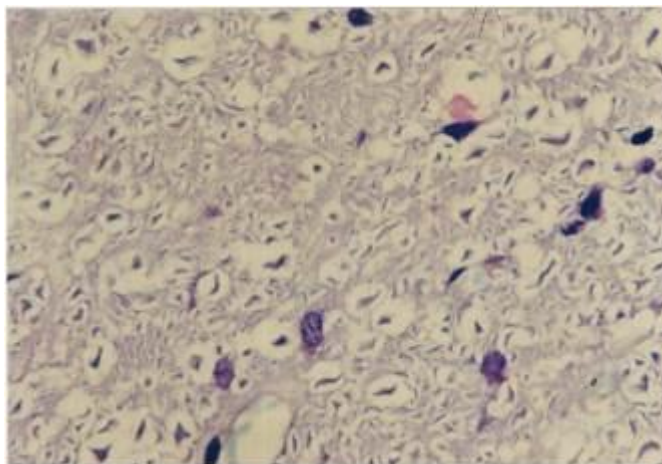


Рис. 6.27. Гістологічний зріз сірої речовини спинного мозку тварин 4 групи. 60 доба. Збережена структура білої речовини спинного мозку. Забарвлення тіоніном. х 400

Таким чином, на основі отриманих результатів можна припустити, що застосування лікувальної схеми клітинної терапії щурам з ЕАЕ: в/в введення інтерлейкіну на 10 добу та с/о введення МСК + інтерлейкіну на 16 добу може забезпечити зменшення структурних ознак демієлінізації у тканині спинного мозку, що супроводжується зниженням вмісту пошкоджених нейроцитів у сірій субстанції.

При дослідженні тканини спинного мозку щурів 5 групи на 35 добу у порівнянні з іншими групами візуально відзначається, що більшість нейронів сірої речовини набула майже нормального фенотипу. Так, моторні нейрони передніх рогів спинного мозку зберігають характерну пірамідальну або ромбоподібну форму цитоплазматичних тіл з наявністю чітких відростків. Ядра нейроцитів мають правильну закруглену форму, містять укрупнені ядерця. У цитоплазмі реєструється характерна рівномірно щільна структура базofilної тигроїдної субстанції, яка відображує стан метаболізму рибонуклеїнового комплексу цитоплазми. Інколи зустрічаються патологічно змінені форми нейроцитів. Такі нейроцити містять гіперхромні деформовані ядра, у яких ядерця не візуалізуються (рис.6.28.).

Деякі нейроцити виявляють ознаки лізису базofilної субстанції у цитоплазмі, спостерігаються також нейроцити з редукованими відростками. Вміст дистрофованих та некробіотично змінених нейроклітин у 10 довільно вибраних полях зору мікроскопу спостерігається в межах від 19 до 42, складаючи у середньому 27,7. У м'яких мозкових оболонках виявляються ознаки фіброзу волокон сполучної тканини. Важливо підкреслити, що у білій речовині спинного мозку експериментальних щурів на 35 добу дослідження відзначається деяке зменшення ступеня демієлінізації нервових волокон у порівнянні з подібними зразками спинного мозку інших груп тварин у цей же строк (рис.6.29.).

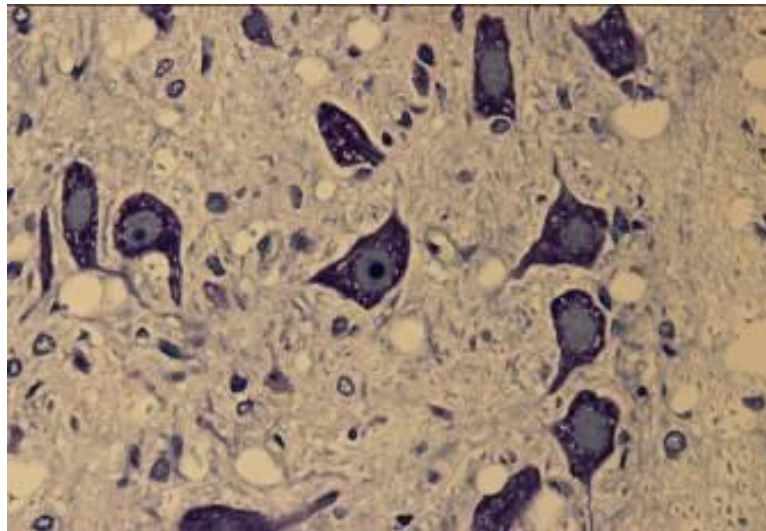


Рис.6.2

8. Нейрони у спинному мозку щура з ЕАЕ після введення трансфікованих МСК. Пояснення в тексті. Забарвлення тіоніном. X 800

В той же час у ділянках значної демієлінізації у порожнинних спустошеннях прослідковуються ознаки набряку, деформації або лізису нервових волокон. На 60 добу експерименту у тварин 5 групи у тканині спинного мозку на мікроскопічному рівні візуально спостерігається збільшення нейроцитів з ознаками дистрофічних та некробіотичних змін. Вміст дистрофованих нейроклітин у 10 довільно вибраних полях зору мікроскопу становить у середньому 18,7 з коливаннями в межах від 13

до до 23. У той же час у білій речовині відзначається підвищення ступеня демієлінізації нервових волокон у порівнянні з контрольними зразками і терміном дослідження 35 діб (рис. 6.30 а, б).

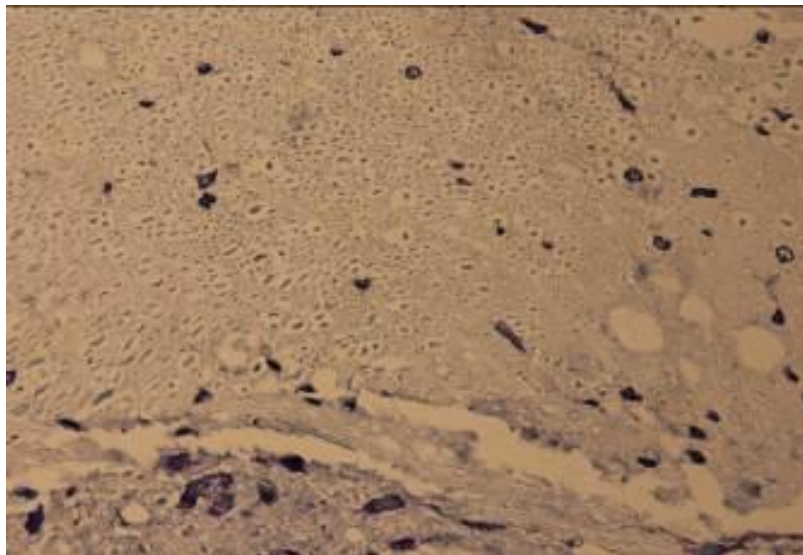


Рис. 6.29. Сіра речовина спинного мозку щура з ЕАЕ після введення МСКТ. 35 доба. Забарвлення тіоніном. Х 400

Таким чином, у терміни 35 діб у спинному мозку тварин V групи спостерігаються морфологічні ознаки нормалізації клітинного складу, а також зменшення ступеня демієлінізації білої речовини. Але при продовженому спостереженні у динаміці розвитку процесу на 60 добу експерименту морфологічно констатується погіршення стану нейроцитів спинного мозку, що може свідчити про послаблення лікувального ефекту клітинної терапії МСК у віддаленому періоді.

Проведено морфометричне дослідження впливу інтерлейкіну 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.

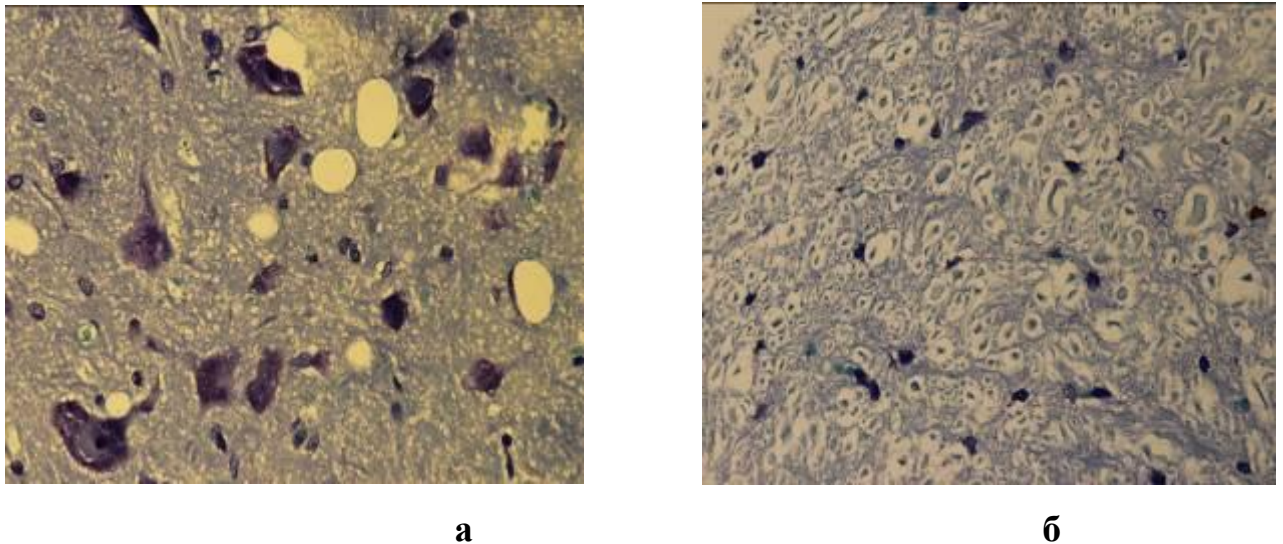


Рис.6.30. Сіра речовина спинного мозку щура з ЕАЕ після введення МСКТ. 60 доба. а - різні стадії пошкодження нейронів; б – структура сірої речовини. Пояснення в тексті. Забарвлення тіоніном. х 800

Для статистичного аналізу використовували ДА Краскела-Уолліса, згідно з яким для показника «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, ураховуючи поправку Хольма-Бонферроні, на 35 добу спостерігається статистично значуща різниця між групою порівняння №1 та експериментальними групами 2, 3, 4 (таблиця 6.2., рис. 6.2.16).

При цьому, в даних групах відсоток патологічно змінених 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.

Таблиця 6.2

Вплив різних схем клітинної терапії на морфо-функціональний стан рухових нейронів сірої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з ЕАЕ

Параметри	Вид впливу / термін дослідження	35 доба	60 доба
Відсоток патологічно змінених нейронів СМ	Контроль	27,92 (21,05; 31,58)	27,92 (21,05; 31,58)
	Гр.1 (ЕАЕ)	61,81 (57,89;69,23) $p_{K-1}=0,0000$	64,81 (56,0;70,0) $p_{K-1}=0,0000$
	Гр.2 (ЕАЕ+МСК)	32,58 (28,57;35,29) $p_{1-2}=0,00002$	53,59 (50,0;63,16) $p_{K-1}=0,0000$ $p_{1-2}=0,0007$
	Гр.3 (ЕАЕ+ІЛ)	41,88 (36,36;47,62) $p_{1-3}=0,001$	40,66 (36,84;47,06) $p_{1-3}=0,0001$ $p_{2-3}=0,002$
	Гр.4 (ЕАЕ+МСК+ІЛ)	35,36 (33,33;42,86) $p_{1-4}=0,0003$	38,28 (33,33;43,48) $p_{2-4}=0,006$
	Гр.5 (ЕАЕ+МСКТ)	46,64 (42,31; 48,39) $p_{K-5}=0,002$ $p_{2-5}=0,04$	43,55 (36,0;52,38) $p_{1-5}=0,02$

Примітка. М (25%; 75%) (n), де М - медіана; (.) - інтерквартильний діапазон.

На 60 добу експерименту, згідно ДА Краскела-Уолліса – Н (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)%, критерій; $p=0,007$), в групі №4 – в 1,7 разу – до 38,28 (33,33;43,48)%, критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,002$), а в групі 5 – в 1,5 разу – до 43,55 (36,0;52,38)%, критерій U-Манна-Уїтні; $p=0,02$).

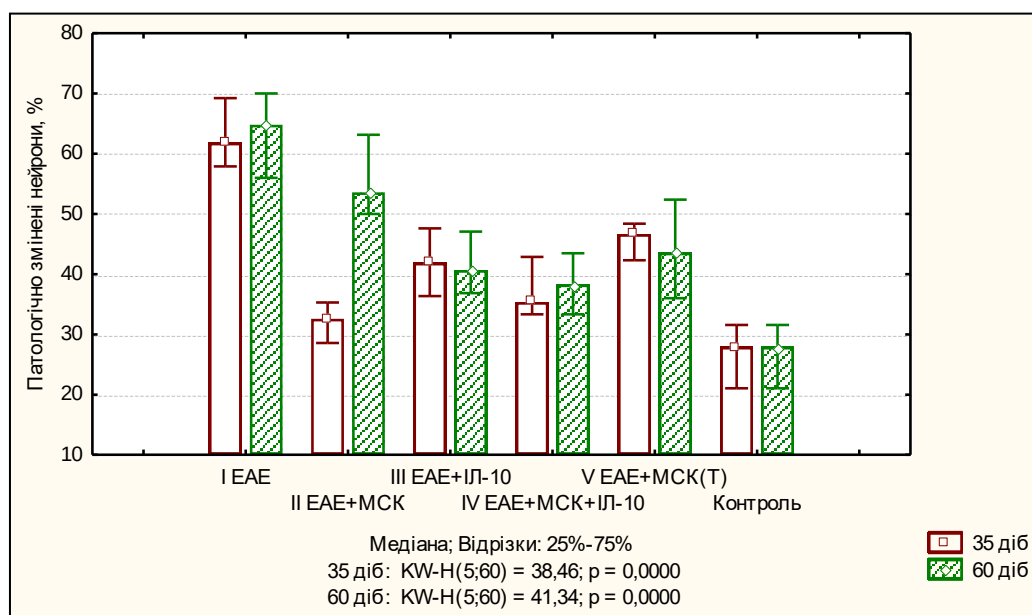


Рис. 6.31. Динаміка змін відсотку патологічно змінених нейронів в сірій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ, під впливом різних схем введення МСК та ІЛ-10

. Загалом, в цьому експерименті числові значення показника, що вивчався, в усіх групах дослідження, крім групи 2, характеризувались мінімальними коливаннями без динаміки і були статистично незначущими щодо різних термінів дослідження.

Наше дослідження засвідчило беззаперечне статистично значуще зниження відсотку патологічно змінених нейронів спинного мозку експериментальної групи 4, яким внутрішньовенно вводили ІЛ-10 і на 17 добу у велику потиличну цистерну – МСК, відносно групи порівняння у всі терміни експерименту. Це в певній мірі може пояснюватись протизапальною дією ІЛ-10, який створює підґрунтя для нормального функціонування введених в ліквор стовбурових клітин.

ПІДСУМКИ

На сьогоднішній день розсіяний склероз (РС) розглядається як складне хронічне імунно-опосередковане і нейродегенеративне захворювання, спричинене генетичною схильністю і екологічними факторами ризику [138, 139].

Він характеризується інфільтрацією імунних клітин з крові в ЦНС і пошкодженням мієліну і аксонів. За останні роки були розроблені методи лікування РС, спрямовані на пригнічення імунної системи для контролю запальних процесів з метою припинення прогресування захворювання. Методи лікування, які застосовуються на даний час, ефективні лише частково [140 – 142].

Для посилення нейро- або мієлогенезу ушкоджених тканин ЦНС і відновлення неврологічних функцій є актуальним пошук нових підходів і методів лікування. Одним із таких напрямків може бути застосування клітинної терапії [13].

До переліку найперспективніших відносять МСК різного походження, позитивний механізм дії яких пов'язують з можливістю нейрогенного трансдиференціювання [143], тобто “перепрограмування” клітин у зовсім інший фенотип, хоумінгом (переміщенням клітин у ділянки ураження ЦНС) [144], заміщенням дефектів ЦНС з встановленням синаптичних контактів з мікрооточенням [145]. Рівень знань про походження і роль стовбурових клітин *in vivo*, доведеність можливості трансдиференціювання СК в клітини ЦНС і виконання ними специфічних фізіологічних функцій стали предметом для дослідження можливості і доцільності їх застосування при ураженнях ЦНС.

Численні дослідження показали, що МСК різного походження здатні поліпшити перебіг алергічного енцефаломієліту, що є експериментальною моделлю РС [65, 146, 147].

На численних моделях неврологічних розладів, у тому числі ЕАЕ, було встановлено, що трансплантовані МСК виявляють імуномодулюючі, протизапальні, прорегенеративні, нейропротекторні і ангіогенні властивості [9, 148], сприяють зменшенню демієлінізації та попереджують загибель нейронів.

Крім того, на моделі ЕАЕ у мишей трансплантація МСК (на ранніх стадіях) показувала захист від розвитку ЕАЕ, що був пов'язаний із дозою трансплантованих клітин, а на піку ЕАЕ сприяла зменшенню прогресування і тяжкості захворювання [65].

В деяких роботах встановлено, що МСК здатні мігрувати в зони ушкоджених ділянок ЦНС, де вони підтримують локальний нейрогенез, мієлогенез через нейротрофічні ефекти, стимуляцію резидентних стовбурових клітин ЦНС, індукцію імуномодуляції *in situ*, або, ймовірно, навіть трансдиференціацію [142]. Існують повідомлення, що трансплантовані МСК можуть слугувати джерелом нейротрофічних сполук, які поширюються через спинномозкову рідину до різних відділів спинного мозку [149]. Також виявлено, що трансплантовані у головний мозок МСК людини динамічно розподіляються і переважно локалізуються у певних анатомічних ділянках [150]. Очевидно, цей процес опосередковується молекулами адгезії і знаходиться під контролем рецепторів, які експресуються трансплантованими МСК [151].

МСК з Вартонових драглів пуповини людини можуть бути ефективними в лікуванні захворювань центральної нервової системи. Імуномодулюючий ефект МСК-ВДл був оцінений *in vitro* і на тваринних моделях [152].

Застосування результатів експериментальних досліджень у клінічній практиці є однією з основних, оскільки вони часто не отримують клінічного підтвердження [153]. Це диктує необхідність створення адекватної моделі захворювання з можливістю точного відтворення ланок патогенезу та стандартизації протоколів експериментальних досліджень. У якості моделі нами використано оптимізовану модель ЕАЕ.

Проведені нами дослідження, спрямовані на пошук оптимальної дози АФ для індукції ЕАЕ у щурів, показали, що найбільш поширений процес демієлінізації у тканині спинного мозку цих піддослідних тварин відтворюється при використанні потрібної дози АФ. Цей процес супроводжується появою дистрофічно-деструктивних змін у більшості

нейроцитів сірої речовини спинного мозку. Але рівень захворюваності у таких тварин настільки важкий, що унеможлиблює спостереження за ними в тесті «відкрите поле». Результати проведених досліджень засвідчують про достатність використання однієї дози АФ для отримання ефективної моделі експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом у щурів протягом 35 діб.

При цьому слід зауважити, що на нашому матеріалі у тканині спинного мозку щурів з ЕАЕ не зареєстровані прояви запальної реакції незалежно від тестованої дози АФ. В той же час за даними літератури [87] вважається, що введена мозкова речовина викликає в організмі утворення аутоантитіл, які проникають у мозок і руйнують мієлін. У відповідь на пошкодження мієліну може розвиватися запальна реакція. Також існує думка, що процес запалення при ЕАЕ не може бути винятково вторинним явищем, оскільки запальна реакція первинно може ініціювати процес демієлінізації нервових волокон, але повної топографічної відповідності між поширеністю демієлінізації нервовій тканині та запальною інфільтрацією не існує. Запальна інфільтрація при ЕАЕ в основному обмежується м'якими мозковими оболонками, а ознаки демієлінізації аксонів розвиваються у білій речовині спинного та головного мозку. Навіть при значній внутрішньоадвентиціальній запальній інфільтрації окремих судин мозку процес демієлінізації в цих ділянках часто не виявляється.

Патоморфологічні дослідження експериментального матеріалу показали, що застосований в роботі метод індукції ЕАЕ забезпечує розвиток у тканині ЦНС дистрофічних та некробіотичних змін у нейроклітинах спинного мозку і викликає поширену демієлінізацію нервових волокон білої речовини з чітким переважанням у тканині поперекового відділу спинного мозку. Так, на 30 добу у білій речовині спинного мозку щурів з індукованим ЕАЕ (група порівняння) реєструються морфологічні ознаки майже тотального пошкодження мієлінових оболонок нервових волокон з утворенням поширених спустошень навколо них. Правомірно припустити, що в утворенні циркулярних

спустошень навколо патологічно змінених нервових волокон та їх оболонки певна роль належить розвитку реактивного набряку як загальній реакції нервової тканини на вплив різноманітних патологічних факторів.

Використання одинарної дози АФ забезпечує одночасне відтворення захворювання середнього та тяжкого ступеня з хронічним ремітуючим перебігом, що може вважатись еквівалентом РС у людей, відсутністю летальності на фоні виражених рухових і поведінкових порушень, адекватною для вивчення ефективності засобів клітинної інженерії [87].

Вважається, що ЦНС є забар'єрним імунно-привілейованим органом завдяки її структурним особливостям. Тим не менш, сучасні дослідження засвідчують контроль імунної системи над ЦНС через модифіковані схеми імунного нагляду, що потребує перегляду та переосмислення концепції імуннологічної привілейованості ЦНС [154]. РС є прикладом такого імунного «нагляду» за ЦНС. Можливості виживання і міграції МСК-ВДл в зони ураження ЦНС при патологічних станах ще недостатньо досліджені, в той час як ці фактори можуть мати істотний вплив на ефективність клітинної терапії. В цьому контексті, ми досліджували виживання МСК-ВДл і їх розповсюдження по лікворних шляхах після трансплантації на піку клінічних симптомів у тварин з ЕАЕ без відповідної імуносупресії.

Нами виявлена здатність МСК Вартонових драглів пуповини людини до хоумінгу. Субокципітально введені клітини можуть мігрувати через спинно-мозкову рідину з місця ін'єкції (велика потилична цистерна) у різні відділи ЦНС і виживати в них принаймні протягом 5 діб після трансплантації, яка була виконана на піку ЕАЕ в ксеногенному варіанті без імуносупресії.

Вивчено фенотипові характеристики і проліферативний потенціал МСК Вартонових драглів пуповини людини в умовах культивування. Важливими для практичної трансплантології є вивчені морфологічні властивості МСК, які зберігаються протягом 2 пасажів в культурі. У подальшому появляються ознаки деградації культури та втрати клітинами мезенхімального мультипотентного фенотипу, зустрічаються випадки

спонтанної адипогенної та хондрогенної диференціації у моношарі. Наряду з цим спостерігається тенденція до статистично не значущого зниження інтенсивності експресії маркерів CD105 та CD90. Це засвідчує необхідність застосування з терапевтичною метою МСК пуповини людини не вище другого пасажу.

Дослідження поведінкових реакцій тварин і клінічного перебігу захворювання засвідчило значне зниження орієнтовно-дослідницької та емоційної активності щурів з індукованим ЕАЕ уже на 12-ту добу. Пік захворюваності припадає у середньому на 17-18 добу. Застосування МСК та МСК у поєднанні з ІЛ-10 справляло більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів при ЕАЕ, ніж внутрішньовенне і субокципітальне введення ІЛ-10. Комбіноване застосування МСК та ІЛ-10 статистично значуще більш ефективно сприяє корекції порушень орієнтовно-дослідницької активності та емоційної сфери щурів з ЕАЕ, ніж трансфіковані МСК.

Позитивна динаміка поведінкових реакцій експериментальних груп тварин, очевидно, має своє вираження на ультраструктурному рівні, де уже в ранні терміни дослідження МСК демонструють позитивний вплив у вигляді зниження ступеня міжламілярного і периаksonального набряку та сприяють активації процесу ремієлінізації. При цьому, у всіх експериментальних групах тварин, за деяким винятком групи ЕАЕ+ІЛ-10, процес демієлінізації призупиняється, відносно групи порівняння, починаючи з терміну дослідження 35 діб. За різних шляхів введення ІЛ-10 не справляє впливу, ознаки якого мають статистичну значущість, однак при комплексному застосуванні демонструє підсилення й потенціювання дії МСК.

За нашими мікроскопічними спостереженнями крім індукованого пошкодження субстанції мієлінових оболонок у тканині спинного мозку деструктивні порушення охоплюють також і самі нервові волокна у вигляді їх витончення, деформації, зморщування, набряку або тотального лізису. У деяких випадках виявлено вогнища деструкції у демієлінізованих ділянках з наявністю старих крововиливів, а також скопичень еритроцитів, діapedез яких може бути

обумовлений порушенням проникності судинних стінок. Це супроводжувалося розвитком дистрофічних та некробіотичних змін у нейроцитах сірої речовини, частка яких кількісно збільшується на 60 добу експерименту.

Після субокципітального введення щурам з ЕАЕ трансфікованих МСК на 35 добу гістоструктура тканини спинного мозку на світлооптичному рівні візуально в цілому набуває морфологічних ознак нормалізації клітинного складу на тлі значного зменшення ознак демієлінізації нервових волокон білої речовини. Але у динаміці розвитку процесу на 60 добу дослідження морфологічно констатується погіршення стану нервової тканини, що підтверджуються кількісним збільшенням дистрофованих та некробіотично змінених нейроклітин. Це може засвідчувати поступове послаблення позитивного впливу клітинної терапії МСК на розвиток ЕАЕ у віддаленому періоді. На дослідженому матеріалі ця закономірність прослідковується в усіх тварин експериментальних груп. Узагальнений аналіз кількісних показників патологічно змінених нейроклітин у різних умовах дослідів показує значні коливання їх вмісту у тканині спинного мозку експериментальних щурів та Щурів групи порівняння (ЕАЕ). Відсутність значущих кількісних відмінностей між цими показниками у нервовій тканині може пояснюватися, зокрема, індивідуальною реакцією кожної тварини на індукцію ЕАЕ та відповіддю організму тварини на подальше введення МСК. На нашу думку, при оцінці наявності лікувального впливу клітинної терапії на прояви ЕАЕ більш надійними та показовими виявилися якісні ознаки ураження нейроклітин, що підтверджується фотодокументацією мікроскопічних особливостей клітинно-тканинних змін у структурі головного мозку у різних варіантах дослідів.

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 міжламілярного 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 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пирадов МИ, Супонева НА. Аутоиммунные заболевания нервной системы: состояние, проблемы и перспективы. Вестник Российской Академии наук. 2015;2:183-87. doi: 10.15690/vgramn.v70i2.1311.
2. Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ, Читаєва ГЄ. Основні патогенетичні механізми процесу демієлінізації в центральній нервовій системі та можливості його корекції. Укр. неврологічний журнал. [Інтернет]. 2017;2:12-19. Доступно на:
http://www.ukrneuroj.com.ua/svizhij_nomer.php?nid=43.
3. Заргарова ТА, Фаворова ОО. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит – модель рассеянного склероза. Иммунология. [Інтернет]. 1999;2:5-8. Доступно на: <http://www.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=29994>.
4. Абдурахманова РФ, Иззатов ХН, Хадибаева ГР, Шарипова БА, Кахарова МХ. Рассеянный склероз: этиология, патогенез и клиника (часть I). Вестн. последипломного образования в сфере здравоохранения. [Інтернет]. 2016;3:68-74. Доступно на:
http://elibrary.ru/download/elibrary_27672614_77360970.pdf.
5. Selmi C, Barin JG, Rose NR. Current trends in autoimmunity and the nervous system. J Autoimmun. 2016;75:20-9. doi:10.1016/j.jaut.2016.08.005. PMID: 27545842.
6. Шмидт ТЕ. Рассеянный склероз: этиология, факторы риска, патогенез, клиника и прогрессирование (по материалам конгресса Ectrims). Неврол. журн. [Інтернет]. 2014;19(1):49-54. Доступно на:
http://elibrary.ru/download/elibrary_21507324_23865792.pdf.
7. Adami R, Scesa G, Bottai D. Stem cell transplantation in neurological diseases: improving effectiveness in animal models. Front Cell Dev Biol. 2014;2:17. doi:10.3389/fcell.2014.00017. PMID: 25364724.

8. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):347-56. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.008. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21718735.
9. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol.* 2011 Jul;10(7):649-56. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70121-1. PMID: 21683930.
10. Maslova OO, Shuvalova NS, Sukhorada OM, Zhukova SM, Deryabina OG, Makarenko MV, et al. Heterogeneity of Umbilical Cords as a Source for MSC. *Dataset Papers in Biology.* Volume 2013 (2013), Article ID 370103. Available from: <http://dx.doi.org/10.7167/2013/370103>.
11. Kovalchuk MV, Shuvalova NS, Pokhodenko IO, Draguljan MV, Gulko TP, Deryabina OG, et al. Monitoring of transplanted human Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly in xenogeneic systems in vivo. *Biopolymers and Cells.* 2015;31(3):193-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008E0>; http://nbuv.gov.ua/UJRN/BPK_2015_31_3_6.
12. Zhao G, Liu F, Lan S, Li P, Wang L, Kou J, et al. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:38. doi: 10.1186/s13287-015-0031-3. PMID: 25889402; PMCID: PMC4413550.
13. Cohen JA. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013 Oct;333(1-2):43-9. doi: 10.1016/j.jns.2012.12.009. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23294498; PMCID: PMC3624046.
14. Dulamea AO. Role of oligodendrocyte dysfunction in demyelination, remyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;958:91-127. doi: 10.1007/978-3-319-47861-6_7. PMID: 28093710.

15. Levy M, Boulis N, Rao M, Svendsen CN. Regenerative cellular therapies for neurologic diseases. *Brain Res.* 2016;1638(Pt.A):88-96. doi:10.1016/j.brainres.2015.06.053. PMID: 26239912.
16. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Oct;46(7):1339-50. doi: 10.1016/j.jacc.2005.05.079. PMID: 16198853.
17. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004 Feb;16(2):249-56. doi: 10.1093/intimm/dxh029. PMID: 14734610.
18. O'Neill EJ, Day MJ, Wraith DC. IL-10 is essential for disease protection following intranasal peptide administration in the C57BL/6 model of EAE. *J Neuroimmunol.* 2006 Sep;178(1-2):1-8. Epub 2006 Jul 26. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.05.030. PMID: 16872684; PMCID: PMC3399771.
19. Huss DJ, Winger RC, Cox GM, Guerau-de-Arellano M, Yang Y, Racke MK, et al. TGF- β signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. *Eur J Immunol.* 2011 Oct;41(10):2987-96. doi: 10.1002/eji.201141666. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21728174; PMCID: PMC3478765.
20. Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol.* 2012 Sep;40(9):761-70. doi: 10.1016/j.exphem.2012.05.006. Epub 2012 May 23. PMID: 22634392.
21. Лисяный НИ. Иммунология и иммунотерапия рассеянного склероза. Киев: ЗАТ "ВІПОЛ"; 2003. 251 с.
22. Багинский ФВ, Галиновская НВ, Усова НН, Демидова ВО, Латышева ВЯ. Рассеянный склероз: современное состояние проблемы (обзор литературы).

- Проблемы здоровья и экологии. [Интернет]. 2010;3(25):75-80. Доступно на: http://elibrary.ru/download/elibrary_24899388_32233254.pdf
23. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol*. 2010;225(1):9-17. PMID: 19961850. doi:10.1016/j.expneurol.2009.11.019.
 24. Гусев ЕИ, Завалишин ИА, Бойко АН. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. М.: Миклош; 2004. 540 с.
 25. Ильина НИ. Клиническая иммунология и иммуноопосредованные воспалительные заболевания. *Рос. аллергол. журн.* [Интернет]. 2010;2:54-7. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=15274346>.
 26. Завалишин ИА, Захарова МН. Рассеянный склероз: современные аспекты этиологии и патогенеза. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. [Интернет]. 2003;2:10-7. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=24209746>.
 27. Железникова ГФ, Скрипненко НВ, Иванова ГП, Суровцева АВ, Скрипненко ВЮ. Факторы иммунопатогенеза рассеянного склероза. *Рос. иммунолог. журн.* [Интернет]. 2015;9(3):261-82. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=25474994>.
 28. Чехонин ВП, Давыдовская МВ, Лебедев СВ, Демина ТЛ, Дмитриева ТВ, Гусев ЮИ. Нейробиологические основы ремиелинизации в ЦНС. *Вестн. РАМН*. [Интернет]. 2003;8:43-52. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=17034240>.
 29. Cuevas-García C. Multiple sclerosis: current immunological aspects. *Rev Alerg Mex*. 2017;64(1):76-86. Spanish. PMID: 28188715. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v64n1/2448-9190-ram-64-01-00076.pdf>
 30. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*. 2016;1(1). pii:1003. PMID: 28127589; PMCID: PMC5260818.

31. Selmi C, Barin JG, Rose NR. Current trends in autoimmunity and the nervous system. *J Autoimmun.* 2016;75:20-9. doi:10.1016/j.jaut.2016.08.005. PMID: 27545842.
32. Бутенко ГМ. Розсіяний склероз – захворювання багатфакторне. *Нова медицина.* 2002;2:18-19.
33. Дражина НП, Усс АЛ, Миланович НФ, Кривенко СИ, Змачинский ВА, Борисов АВ, и др. Эффективность и безопасность применения аутологичной трансплантации мультипотентных мезенхимальных клеток при рассеянном склерозе. *Хирургия. Восточная Европа.* [Интернет]. 2012;4(04):72-82. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18362593>.
34. Соколова АА. Состояние мембранно-дестабилизирующих процессов и антиоксидантной защиты в эритроцитах больных рассеянным склерозом. *Вестн. Тюмен. гос. ун-та. Экология и природопользование.* [Интернет]. 2008;3:22-7. Доступно на: <https://elibrary.ru/contents.asp?selid=11661035&issueid=529360>.
35. Almolda B, Gonzalez B, Castellano B. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:1157-71. doi:10.2741/3781. PMID: 21196224.
36. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):393-407. doi:10.1038/nri2550. PMID: 19444307.
37. Макшаков ГС, Лапин СВ, Евдошенко ЕП. Современные представления об интратекальном гуморальном иммунном ответе и диагностическое значение выявления олигоклональных иммуноглобулинов при рассеянном склерозе. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2016;116(2-2):14-20. doi: 10.17116/jnevro20161162214-20.
38. Ulivieri C, Baldari CT. Regulation of T cell activation and differentiation by extracellular vesicles and their pathogenic role in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Molecules.* 2017;22(2). pii:E225. doi:10.3390/molecules22020225. PMID: 28157168.

39. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Wiendl H, Marcenaro E, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, et al. Regulatory functions of natural killer cells in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2016 Dec;(7):606. doi:10.3389/fimmu.2016.00606. PMID: 28066417; PMCID: PMC5165263.
40. Guo AC, Chu T, Liu XQ, Su HX, Wu WT. Reactivated astrocytes as a possible source of oligodendrocyte precursors for remyelination in remitting phase of experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Am J Transl Res.* 2016;8(12):5637-45. PMID: 28078034; PMCID: PMC5209514.
41. Friesse MA. Widespread synaptic loss in multiple sclerosis. *Brain.* 2016;139(Pt 1):2-4. doi:10.1093/brain/awv349. PMID: 26747852.
42. Polazzi E, Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol.* 2010;92(3):293-315. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.06.009. PMID: 20609379.
43. 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. [Інтернет]. 2017;28:5-17. Доступно на:
<https://nmapo.edu.ua/zagruzka2/zbornikNMAPO28.pdf>.
44. Пічкур ЛД, Семенова ВМ, Вербовська СА, Олексенко НП, Акінола СТ. Особливості перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту після трансплантації стовбурових клітин. *Укр. нейрохірург. журнал.* 2017;(2):27-33. doi: 10.25305/unj.104500.
45. Завалишин ИА, Головкин ИА. Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики. М.: Минздрав России, НИИ неврологии РАМН; 2000. 356 с.
46. Маслова ОО, Дерябіна ОГ, Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ. Сучасні підходи до кріоконсервування клітин мезенхімального

- походження. Укр. нейрохірург. журнал. 2017;1:5-10. doi: <https://doi.org/10.25305/unj.96083>.
47. Пухов РВ, Бисага ГН, Трифанов АГ, Ефимцев АЮ, Фокин ВА. Влияние нейротрофической терапии на метаболизм головного мозга при рассеянном склерозе. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. [Интернет]. 2013;113(10-2):97-104. Доступно на: <http://lekarius.ru/magazines/81173/85689/154323>.
 48. Семенова ВМ, Лісяний МІ, Маркова ОВ, Бельська ЛМ. Клітинна терапія експериментального алергійного енцефаломієліту щурів. Патоморфологічний аспект. Трансплантологія. 2003;4(1):102-4.
 49. Adami R, Scesa G, Bottai D. Stem cell transplantation in neurological diseases: improving effectiveness in animal models. Front Cell Dev Biol. 2014;2:17. doi:10.3389/fcell.2014.00017. PMID: 25364724.
 50. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Маркова ОВ, Пічкур ЛД, Вербовська СА. Результати хірургічного лікування експериментального алергічного енцефаломієліту. Трансплантологія. 2003;4(1):115-7.
 51. Ahn M, Yang W, Kim H, Jin JK, Moon C, Shin T. Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res. 2012;1453:77-86. doi:10.1016/j.brainres.2012.03.023. PMID: 22483960.
 52. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. Arch Med Sci. 2015;11(6):1164-78. doi:10.5114/aoms.2015.56342. PMID: 26788077.
 53. Пономарев ВВ, Селицкий ММ, Иванчик ГИ, Мезина ЕВ. Инновационные биомаркеры аутоиммунных заболеваний нервной системы. Мед. новости. [Интернет]. 2016; 1:3-8. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=25450324>.

54. Бочарова АИ, Куташов ВА. Современный взгляд на лечение рассеянного склероза. Молодой ученый. [Интернет]. 2015;19:259-61. Доступно на: <http://moluch.ru/archive/99/22236>.
55. Ельчанинова СА, Смагина ИВ, Сидоренко ВА, Личенко ЮН, Поповцева АВ, Федянин АС. Молекулы адгезии и провоспалительные цитокины в спинномозговой жидкости больных рассеянным склерозом. Бюл. Сибирской медицины. [Интернет]. 2009;8(1–2):23-6. Доступно на: <http://elibrary.ru/item.asp?id=12863805>.
56. Зафранская ММ, Нижегородова ДБ, Иванчик ГИ, Борисов АВ, Кожух ГВ, Назарова ЕА, et al. Динамика цитокинов у пациентов с рассеянным склерозом до и после клеточной терапии. Иммунопатология, аллергология, инфектология. [Интернет]. 2014;3:82-91. Доступно на: <https://readera.ru/142165570>.
57. Kruglov AA, Lampropoulou V, Fillatreau S, Nedospasov SA. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. J Immunol. 2011 Dec;187(11):5660-70. doi: 10.4049/jimmunol.1100663. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22058414.
58. Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, Ng C, et al. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. Science. 2016;354(6308). pii: aaf7073. doi:10.1126/science.aaf7073. PMID: 27846470.
59. Polazzi E, Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. Prog Neurobiol. 2010;92(3):293-315. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.06.009. PMID: 20609379.
60. Shroff G. Transplantation of Human Embryonic Stem Cells in Patients with Multiple Sclerosis and Lyme Disease. Am J Case Rep. 2016;13(17):944-9. PMID: 27956736; PMCID: PMC5156555.

61. Tanna T, Sachan V. Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(6):513-21. PMID: 25248677. doi: 10.2174/1574888x09666140923101110.
62. Yun JW, Xiao A, Tsunoda I, Minagar A, Alexander JS. From trash to treasure: the untapped potential of endothelial microparticles in neurovascular diseases. *Pathophysiology.* 2016;23(4):265-74. PMID: 27531185. doi:10.1016/j.pathophys.2016.08.004.
63. Лисяный НИ, Маркова ОВ. Коррекция аутоиммунного демиелинизирующего процесса у крыс клетками аллогенного головного мозга новорожденных животных. *Иммунология.* 2003;1:15-9.
64. Braithwaite AW, Del Sal G, Lu X. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;13(6):984-93. doi: 10.1038/sj.cdd.4401924. PMID: 16575404.
65. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells.* 2009 Oct;27(10):2624-35. doi: 10.1002/stem.194. PMID: 19676124.
66. Theotokis P, Kleopa KA, Touloumi O, Lagoudaki R, Loubopoulos A, Nousiopoulou E, et al. Connexin43 and connexin47 alterations after neural precursor cells transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia.* 2015 Oct;63(10):1772-83. doi: 10.1002/glia.22843. Epub 2015 Apr 27. PMID: 25914045.
67. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia.* 2009 Aug;57(11):1192-203. doi: 10.1002/glia.20841. PMID: 19191336; PMCID: PMC2706928.

68. Barhum Y, Gai-Castro S, Bahat-Stromza M, Barzilay R, Melamed E, Offen D. Intracerebroventricular transplantation of human mesenchymal stem cells induced to secrete neurotrophic factors attenuates clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2010 May;41(1):129-37. doi: 10.1007/s12031-009-9302-8. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19902385.
69. Федулов АС, Борисов АВ, Московских ЮВ, Зафранская ММ, Кривенко СИ, Нижегородова ДБ, и др. Аутологичная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток как метод модификации клинического течения рассеянного склероза. *Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа*. [Интернет]. 2016;4:516-22. Доступно на: <https://elibrary.ru/item.asp?id=27518366>.
70. Klose J, Schmidt NO, Melms A, Dohi M, Miyazaki J, Bischof F, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. *J Neuroinflammation*. 2013 Sep;10:117. doi: 10.1186/1742-2094-10-117. PMID: 24053338; PMCID: PMC3852052.
71. Min CK, Kim BG, Park G, Cho B, Oh IH. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007 May;39(10):637-45. Epub 2007 Mar 19. doi: 10.1038/sj.bmt.1705644. PMID: 17369865.
72. Kovalchuk MV, Deryabina OG, Pichkur LD, Verbovskaya SA, Shuvalova NS, Pichkur OL, 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;31(5):371-378. doi: 10.7124/bc.0008F9.
73. Peron JP, Jazedje T, Brandão WN, Perin PM, Maluf M, Evangelista LP, et al. Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. *Stem Cell Rev*. 2012 Sep;8(3):940-52. doi: 10.1007/s12015-011-9338-3. PMID: 22180029.

74. Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther.* 2009 Oct;17(10):1799-803. doi: 10.1038/mt.2009.157. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19602999; PMCID: PMC2835011.
75. Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater.* 2010;20:121-33. Available from: <https://doi.org/10.22203/ecm.v020a11>. PMID: 21249629.
76. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells.* 2010 Aug;2(4):81-92. doi: 10.4252/wjsc.v2.i4.81. PMID: 21607124; PMCID: PMC3097927.
77. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2010 Aug-Oct;13(4-5):109-18. doi: 10.1016/j.drug.2010.07.001. Epub 2010 Aug 9. PMID: 20692200; PMCID: PMC2956795.
78. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov;139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PMID: 1994537.
79. Семенова ВМ, Лисяный НИ, Стаино ЛП, Бельская ЛН, Егорова ДМ. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования. *Укр. нейрохірург. журнал.* 2014;(3):24-9. doi: 10.25305/unj.47487.
80. Семёнова ВМ, редактор. Аспекты применения метода культивирования тканей в нейробиологии и нейроонкологии. Киев: Интерсервис; 2018. Цымбалюк ВИ, Пичкур ЛД, Дерябина ЕГ, Маслова ОА, Шувалова НС, Вербовская СА, Акинола СТ, Кордюм ВА. Фенотипическая характеристика и пролиферативный потенциал мезенхимальных

стволовых клеток из Вартонова студня пуповины человека в условиях культивирования; с.295-304.

81. Kalluri J. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1417-9. doi: 10.1172/JCI39675. PMID: 19487817; PMCID: PMC2689122.
82. Селезнева ТД, Мишин АС, Барсуков ВЮ. Гистология. Полный курс за 3 дня. М.: Эксмо; 2007. 354 с.
83. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392-401. doi: 10.1038/nrc1877. PMID: 16572188.
84. Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*. 2008;17(3):303-11. PMID: 18522233. doi: 10.3727/096368908784153922.
85. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009 Sep;88(9):792-806. doi: 10.1177/0022034509340867. PMID: 19767575; PMCID: PMC2830488.
86. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*. 2011;32(4):311-5. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21733573.
87. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(4):1079-1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x. Review. PubMed PMID: 21371012; PMCID: PMC3229753.
88. Lipton MM, Freund J. Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants. *J Immunol*. 1953 Aug;71(2):98-109. PubMed PMID: 13084920.

89. Марков ДА. Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. Минск: Наука и техника; 1973. 389 с.
90. Житнухин ЮЛ, Хижняк МГ. Иммуноморфологические особенности экспериментального аллергического энцефаломиелита, индуцированного энцефалитогенным полипептидом. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1987;3:343-46.
91. Link H, Huang YM, Thomas M, Xiao BG. Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2001;114:1-7. PubMed PMID: 11240009. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00247-8.
92. Raine CS. Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. Lab Invest. 1984 Jun;50(6):608-35. PubMed PMID: 6202955.
93. Braitch M, Constantinescu CS. The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS). Inflamm Allergy Drug Targets. 2010 Sep;9(4):249-56. doi: 10.2174/187152810793358778. PubMed PMID: 20887272.
94. Kim H, Moon C, Ahn M, Byun J, Lee Y, Kim MD, et al. Heat shock protein 27 upregulation and phosphorylation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res. 2009 Dec;1304:155-163. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.060. Epub 2009 Sep 23. PubMed PMID: 19781527.
95. Koetsier JC, editor. Handbook of clinical neurology. New York: Elsevier; 1986. Vol. 47: Raine CS. Experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic neuritis; p. 429-66.
96. Пічкур ЛД, Семенова ВМ, Величко ОМ, Вербовська СА, Єгорова ДМ, Акінола СТ, та ін. Оптимізація моделювання експериментального алергічного енцефаломієліта з хронічним рецидивуючим перебігом.

- Експериментальна і клінічна медицина. [Інтернет]. 2017;4(77):4-14. Доступно на: <http://journals.uran.ua/index.php/2414-4517/article/view/118566>.
97. Нефьодов ОО, Мамчур ВЙ, Харченко ЮВ. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту. Вісник проблем біології і медицини. [Інтернет]. 2014;4(2):205-8. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2014_4%282%29__46.
 98. Руденко ВА, Гнедкова ІО, Пічкур ЛД, Вербовська СА, Похолоenko ЯО. Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та IL-10 на показники клітинного імунітету у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом. Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупіка. [Інтернет]. 2014;23(2):434-41. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Znpsnmapo_2014_23%282%29__59.
 99. Scuteri A, Donzelli E, Rigolio R, Ballarini E, Monfrini M, Crippa L, et al. Therapeutic Administration of Mesenchymal Stem Cells Abrogates the Relapse Phase in Chronic Relapsing-Remitting EAE. J Stem Cell Res Ther. 2015;5(262). doi: 10.4172/2157-7633.1000262.
 100. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis: potentials and limitations. Prog Neurobiol. 2010 Nov;92(3):386-404. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.06.005. Epub 2010 Jun 15. PubMed PMID: 2055823.
 101. Цимбалюк ВІ, Величко ОМ, Вербовська СА, Пічкур ЛД, Шувалова НС. 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;3(1):40-5. doi: 10.22494/COT.V3I1.19.

102. Цимбалюк ВІ, Касяненко ЮА. Особливості моделювання та перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту. Укр. Нейрохірург. журнал. [Інтернет]. 2005;1:45-51. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Unkhj_2005_1_10.
103. Maslova OO, Shuvalova NS, Sukhorada OM, Deryabina OG, Makarenko MV. Changes in morphofunctional characteristics of umbilical cord matrix mesenchymal cell during passaging. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2012;22(2):153-56. Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/78/103>.
104. Козловская ЛВ, Николаев АЮ. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. М.: «Медицина»; 1984. 288 с.
105. Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. Transfus Med Hemother. 2008;35(3):228-238. Epub 2008 May 8. doi: 10.1159/000124281. PMID: 21547120; PMCID: PMC3083290.
106. Jennings BR, Ridler PJ. Interaction of chromosomal stains with DNA. An electrofluorescence study. Biophys Struct Mech. 1983;10(1-2):71-9. PMID: 6193819. doi: 10.1007/bf00535543.
107. Baraldi PG, Bovero A, Fruttarolo F, Preti D, Tabrizi MA, Pavani MG, et al. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. Med Res Rev. 2004 Jul;24(4):475-528. doi:10.1002/med.20000. PMID: 15170593.
108. Gray JW, Darzynkiewicz Z. Techniques in cell cycle analysis. Clifton, New Jersey: Humana Press Inc.; 1986. 407 p.
109. Kubista M1, Akerman B, Nordén B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. Biochemistry. 1987 Jul 14;26(14):4545-53. PMID: 3663606. doi: 10.1021/bi00388a057.

110. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes [Internet]. Council of Europe. 2017 [cited 24 May 2017]. Available from: <https://rm.coe.int/168007a67b>.
111. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.06 №3447-IV [Електронний ресурс]. Верховна Рада України. 2017 [дата звернення 24.05.2017]. Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
112. Величко ОМ, Білоус ОІ, Морозов АМ, Гридін НЯ, Білошицький ВВ.; ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», патентовласник. Пристрій «відкрите поле» для дослідження поведінкових реакцій щурів. Патент України № 105155. 2016 березень 03.
113. Величко ОМ, Білоус ОІ, Морозов АМ, Гридін НЯ, Білошицький ВВ.; ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», патентовласник. Спосіб дослідження поведінкових реакцій щурів в установці «відкрите поле». Патент України № 104642. 2016 лютий 10.
114. Хоминский БС, редактор. Руководство по патологической анатомии. М.: Медгиз; 1962. Жаботинский ЮМ. Нормальная и патологическая морфология нервной клетки, нервного волокна и окончаний; с.15-53.
115. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич НН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: МОРИОН; 2001. 408 с.
116. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 1989 Oct;17(20):8390. PMID: 2813076. doi: 10.1093/nar/17.20.8390.

117. Biase FH, Franco MM, Goulart LR, Antunes RC. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genet Mol Biol.* 2002;25(3):313-315. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572002000300011>.
118. Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, et al. Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer.* 2002 Nov;87(11):1328-35. PMID: 12439725; PMCID: PMC2408903. doi: 10.1038/sj.bjc.6600573.
119. Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr Protoc Immunol.* 2010 Feb;Chapter 15:Unit 15.1. PMID: 20143314. doi: 10.1002/0471142735.im1501s88].
120. Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера»; 2000. 312 с.
121. Цимбалюк ВІ, Дерябіна ОГ, Шувалова НС, Маслова ОО, Похоленко ЯО, Топорова ОК, та ін. Фенотипові зміни і проліферативний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів пуповини людини в умовах культивування. *Укр. нейрохірург. журнал.* 2015;2:17-24. doi: 10.25305/unj.45290.
122. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med.* 1952 Mar;95(3):285-98. doi:10.1084/jem.95.3.285. PMID: 14927794; PMCID: PMC2212069.
123. Гайер Г. Электронная гистохимия. Пер. С нем. Москва: Мир; 1974. 488 с.
124. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963 Apr;17:208-12. doi: 10.1083/jcb.17.1.208. PMID: 13986422; PMCID: PMC2106263.
125. Цимбалюк ВІ, Маркова ОВ, Пічкур ЛД, Васлович ВВ, Касяненко ЮА.; Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, патентовласник. Спосіб оцінки ступеня демієлінізації аксонів при

експериментальному алергічному енцефаломієліті. Патент України № 17499. 2006 вересень 15.

126. Шабанов ДА. Онлайн-конспект курса «Биометрическая обработка данных в зоологии и экологии». [Интернет] 2011. Электронная книга, режим доступа: <https://batrachos.com/biometria>.
127. Пічкур ЛД, Ковальчук МВ, Дерябіна ОГ, Вербовська СА, Акінола СТ, Шувалова НС, та ін. Вживання трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин вартонових драглів пуповини людини в центральній нервовій системі щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті після їх субокципітального введення. Укр. нейрохірург. журнал. 2017;3:30-5. doi: 10.25305/unj.112102.
128. Пічкур ЛД, Вербовська СА, Васлович ВВ, Акінола СТ, Дерябіна ОГ, Похолоenko ЯО, та ін. Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіну-10 на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту. Укр. неврол. журнал. 2018;1:56-63.
129. Gordon D, Pavlovska G, Uney JB, Wraith DC, Scolding NJ. 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 Nov;69(11):1087-95. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181f97392. PubMed PMID: 20940628.
130. Kassis 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 Jul-Aug;154(1-2):70-6. doi: 10.1016/j.imlet.2013.06.002. Epub 2013 Aug 28. PubMed PMID: 23994102.
131. Zhu J, Zhang J, Li Q, Du Y, Qiao B, Hu X. Transplanting of mesenchymal stem cells may affect proliferation and function of CD4(+)T-cells in

- experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Clin Transplant*. 2012 Oct;10(5):492-500. doi: 10.6002/ect.2011.0197. Epub 2012 Jul 20. PubMed PMID: 22817386.
132. Руденко ВА, Бельська ЛМ, Гнедкова ІО, Пічкур ОЛ, Вербовська СА, Похолоenko ЯО. Ксеногенна трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин трансфікованих геном ІL-10 як метод клітинної терапії експериментального алергічного енцефаломієліта. Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупіка. [Інтернет]. 2015;24:323-29. Доступно на: https://nmapo.edu.ua/zagruzka/zbornikNMAPO24_1.pdf.
 133. Jorgensen C, Djouad F, Apparailly F, Noël D. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther*. 2003 May;10(10):928-31. doi: 10.1038/sj.gt.3302019. PubMed PMID: 12732877.
 134. Цимбалюк ВІ, Пічкур ЛД, Вербовська СА, Акінола СТ, Васлович ВВ, Дерябіна ОГ, та ін. Вплив ксеногенної трансплантації нативних і трансфікованих геном інтерлейкіна 10 мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту. Вісник проблем біології і медицини. 2018; Вип.1, т.2(143):227-34.
 135. Цимбалюк ВІ, Величко ОМ, Пічкур ЛД, Акінола СТ, Вербовська СА, Шувалова НС, та ін. Вплив нативних мезенхімальних стовбурових клітин та трансфікованих геном інтерлейкіна-10 на поведінкові реакції щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті. Укр. нейрохірург. журнал. 2018; 1:66-72. doi: 10.25305/unj.117776.
 136. Schröder JM, Sommer C. Mitochondrial abnormalities in human sural nerves: fine structural evaluation of cases with mitochondrial myopathy, hereditary and non-hereditary neuropathies and review of the literature. *Acta Neuropathol*. 1991;82(6):471-82. doi: 10.1007/bf00293381. PMID: 1785260.

137. Васлович ВВ, Пічкур ЛД, Малишева ТА, Акінола СТ, Вербовська СА, Топорова ОК, Шувалова НС. Ультраструктурні зміни спинного мозку щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом під впливом мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіна-10. Журнал клінічних і експериментальних медических досліджень. 2018;1(6):17-30.
138. Darlington P, Boivin M, Bar-Or A. Harnessing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2011;11(9):1295-1303. doi:10.1586/ern.11.113. PMID: 21864075; PMCID: PMC3234364.
139. Høglund RA, Maghazachi AA. Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World Journal of Experimental Medicine*. 2014;4(3):27-37. doi:10.5493/wjem.v4.i3.27. PMCID: PMC4172701; PMID: 25254187.
140. Mastorodemos V, Ioannou M, Verginis P. Cell-Based Modulation of Autoimmune Responses in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Therapeutic Implications. *Neuroimmunomodulation*. 2015; 22(3):181-95. doi: 10.1159/000362370. PMID: 24852748.
141. Goldenberg MM. Multiple Sclerosis Review. *P&T*. 2012;37(3):175-184. PMID: 22605909; PMCID: PMC3351877.
142. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol*. 2010; 67(10): 1187-94. doi: 10.1001/archneurol.2010.248. PubMed PMID: 20937945; PubMed Central PMCID: PMC3036569.

143. Dennie D, Louboutin JP, Strayer DS. Migration of bone marrow progenitor cells in the adult brain of rats and rabbits *World J Stem Cells*. 2016 Apr;8(4):136-57. doi: 10.4252/wjsc.v8.i4.136. PMID: 27114746; PMCID: PMC4835673.
144. Oliveri RS, Bello S, Biering-Sørensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat model. *Neurobiol Dis*. 2014 Feb;62:338-53. doi: 10.1016/j.nbd.2013.10.014. Epub 2013 Oct 19. PMID: 24148857.
145. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*. 2015 Apr;116(8):1413-30. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303614. PMID: 25858066; PMCID: PMC4429294.
146. Axelsson M, Malmeström C, Gunnarsson M, Zetterberg H, Sundström P, Lycke J, et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014 Jan;20(1):43-50. doi: 10.1177/1352458513490544. Epub 2013 May 23. PMID: 23702432.
147. Lublin FD, Bowen JD, Huddleston J, Kremenutzky M, Carpenter A, Corboy JR, et al. Human placenta-derived cells (PDA-001) for the treatment of adults with multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled, multiple-dose study. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2014;3(6):696-704. doi:10.1016/j.msard.2014.08.002. PMID: 25891548.
148. Keating A. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):709-16. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015. PubMed PMID: 22704511.
149. Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, et al. Effects of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation through CSF on the Subacute and Chronic Spinal Cord Injury in Rats. *PLoS ONE*. 2013; 8(9):e73494. doi: 10.1371/journal.pone.0073494. PMID: 24039961; PMCID: PMC3770680.

150. Isakova I, Baker K, DuTreil M, Dufour J, Gaupp D, Phinney D. Age- and Dose-Related Effects on MSC Engraftment Levels and Anatomical Distribution in the Central Nervous Systems of Nonhuman Primates: Identification of Novel MSC Subpopulations That Respond to Guidance Cues in Brain. *Stem Cells*. 2007;25(12):3261-70. doi:10.1634/stemcells.2007-0543.
151. Phinney D, Baddoo M, Dutreil M, Gaupp D, Lai W, Isakova I. Murine Mesenchymal Stem Cells Transplanted to the Central Nervous System of Neonatal Versus Adult Mice Exhibit Distinct Engraftment Kinetics and Express Receptors That Guide Neuronal Cell Migration. *Stem Cells and Development*. 2006;15(3):437-47. doi:10.1089/scd.2006.15.437.
152. Zhao G, Liu F, Lan S, Li P, Wang L, Kou J, et al. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6(1):38. doi: 10.1186/s13287-015-0031-3. PMID: 25889402; PMCID: PMC4413550.
153. Steinbeck JA, Studer L. Moving stem cells to the clinic: potential and limitations for brain repair. *Neuron*. 2015 Apr;86(1):187-206. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.002. PMID: 25856494; PMCID: PMC4443446.
154. Romo-González T, Chavarria A, Pérez-H J. Central nervous system: A modified immune surveillance circuit? *Brain Behav Immun*. 2012 Aug;26(6):823-9. doi: 10.1016/j.bbi.2012.01.016. Epub 2012 Jan 28. PMID: 22310920.

ДОДАТОК 1

Таблиця 5.1

Аналіз динамічних рядів клінічного стану щурів з ЕАЕ та під впливом введення ІЛ-10 і МСК у різних комбінаціях.

До-ба	1 ЕАЕ бали	Аб-со-лю-т-ний при-ріст (спад)	При-скоре-ння (зни-ження) при-росту %	2 ЕАЕ+ МСК бали	Аб-со-лю-т-ний при-ріст (спад)	При-скоре-ння (зни-ження) при-росту %	3 ЕАЕ +ІЛ- 10 бали	Аб-со-лю-т-ний при-ріст (спад)	При-скоре-ння (зни-ження) при-росту %	4 ЕАЕ+ ІЛ-10 + МСК бали	Абсо-лю-т-ний при-ріст (спад)	При-скоре-ння (зни-ження) при-росту %	5 ЕАЕ+ МСКТ бали	Аб-со-лю-т-ний при-ріст (спад)	При-скоре-ння (зни-ження) при-росту %
2	0	немає	немає	0	немає	немає	0	немає	немає	0	немає	немає	0	немає	немає
4	0,15	0	немає	0,2	0,2	немає	0,2	0,2		0,2	0,2	немає	0	0	немає
6	0,2	0,15	33,3	0,25	0,05	25,0	0,25	0	25	0,25	0,05	25	0	0	немає
8	0,4	0,05	100	0,45	0,2	80	0,4	0,2	60	0,4	0,15	60	0,1	0,1	немає
10	0,5	0,2	25	0,45	0	0	0,55	0,2	37,5	0,55	0,15	37,5	0,25	0,15	150
12	0,75	0,1	50	0,8	0,35	77,8	0,9	0,3	63,6	0,9	0,35	63,6	0,7	0,45	180
14	0,9	0,25	20	0,9	0,1	12,5	1,1	0,2	22,2	1,1	0,2	22,2	1	0,3	43
16	1	0,15	11,1	1	0,1	11,1	1,3	0,2	18,2	1,3	0,2	18,2	1,2	0,2	20
18	1,1	0,1	10	1,5	0,5	50	1,9	0,6	46,2	2,07	0,8	59,2	1,6	0,4	33,3
20	1,3	0,1	18,2	1,5	0	0,0	1,9	0	0	1,9	-0,2	-8,2	2	0,4	25
22	1,8	0,2	38,5	1,4	-0,1	-6,7	1,6	-0,3	-15,8	1,3	-0,6	-31,6	1,4	-0,6	-30
24	1	0,5	-44,4	1,1	-0,3	-21,4	1,1	-0,5	-31,2	0,8	-0,5	-38,5	1	-0,4	-29
26	0,8	-0,2	-20	0,7	-0,4	-36,4	0,9	-0,2	-18,2	0,4	-0,4	-50	0,4	-0,6	-60
28	1	0,2	25	0,6	-0,1	-14,3	0,6	-0,3	-33,3	0,2	-0,2	-50	0,2	-0,2	-50
30	0,2	-0,8	-80	0,3	-0,3	-50	0,3	-0,3	-50	0,1	-0,1	-50	0,1	-0,1	-50
32	0,6	0,4	200,0	0,07	-0,23	-76,7	0,07	-0,2	-77	0,07	-0,03	-30	0	-0,1	-100
34	1	0,4	66,7	0	-0,07	-100	0	-0,07	-100	0	-0,07	-100	0	0	немає

Примітка: Показники прискорення спаду і абсолютний спад стану піддослідних тварин позначені знаком "-".

Абс. приріст = $x_n - x_{n-1}$, де n – доба спостереження; *Прискорення приросту(спаду)* = $(\text{абс.приріст}_n / x_{n-1}) * 100\%$

ДОДАТОК 2

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА 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.

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.

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.

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.

5. Васлович ВВ, Пічкур ЛД, Малишева ТА, Акінола СТ, Вербовська СА, Топорова ОК, Шувалова НС. Ультраструктурні 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.

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.

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.

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.

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.