

УДК: 616-013.395:591.81:591.3:616.832-002-056.3-092.9

Цимбалюк В. І.¹, Величко О. М.¹, Пічкур О. Л.¹, Вербовська С. А.¹, Пічкур Л. Д.¹, Шувалова Н. С.²¹ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна

e-mail: verbovskaya-svetlana@ukr.net

ВПЛИВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ВАРТОНОВОГО СТУДНЯ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-10 НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТОМ

РЕЗЮМЕ

На моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) щурів як аналога розсіяного склерозу людини дослідили вплив мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) Вартонового студня пуповини людини та інтерлейкіну 10 на функціональний стан ЦНС.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. ЕАЕ індукували гомогенатом спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда. МСК виділяли методом експлантів з Вартонового студня пупкового канатика людини та культивували до 2-го пасажу. Рекombінантний ІL-10 вводили на 10-у добу після індукції ЕАЕ внутрішньовенно та на 17-у добу субоципітально в дозі 0,2 мкг/тварину. Трансплантацію клітин проводили субоципітально на 17-у добу в дозі 10⁶ клітин на тварину. Поведінкові реакції досліджували в тесті «відкрите поле» тричі: на 12-у, 15-у та 24-у добу після індукції ЕАЕ.

РЕЗУЛЬТАТИ. Встановлено, що індукований ЕАЕ на 12-у добу приводить до суттєвих змін адаптивної поведінки щурів у вигляді пригнічення орієнтовно-дослідницької та активації емоційної активності. Після застосування МСК та ІL-10 показано нормалізацію показників когнітивної діяльності (орієнтовно-дослідницька активність) та емоційної сфери (рівень страху, тривожності).

ВИСНОВКИ. Комбіноване застосування інтерлейкіну-10 і мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня пуповини людини у щурів з індукованим ЕАЕ позитивно впливає на корекцію порушень поведінкових реакцій тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальний алергічний енцефаломієліт; мезенхімальні стовбурові клітини Вартонового студня; інтерлейкін-10; тест «відкрите поле»

Прогрес в лікуванні запально-дегенеративних уражень ЦНС людини пов'язують з розвитком клітинних технологій. На сьогодні досягнуто успіхи у вивченні можливості впливу за допомогою клітин-прогеніторів різного походження (нейрогенні стовбурові клітини фетального мозку, гемопоетичні стовбурові клітини) на деструктивний аутоімунітет, нейротрофічні процеси. Але значно важче вплинути на дегенеративно-дистрофічні процеси. Крім того, часто застосовуван-

ня клітин-прогеніторів має біоетичні обмеження. Останнім часом широке розповсюдження отримало застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Опубліковано дані про виявлення та успішне виділення МСК практично з усіх тканин організму [1, 2], але основна увага приділяється таким джерелам клітин, як кістковий мозок, жирова тканина [3, 4, 5]. Незважаючи на спільну назву, МСК з різних джерел мають значні відмінності у доступності та безпечності.

Вартонів студень пуповини (пупкового канатика), на відміну від кісткового мозку та жирової тканини, містять клітини, що збереглися з ранніх етапів ембріогенезу. Пуповина, як похідне жовткового мішка та алантоїсу, містить примітивну форму позазародкової мезенхіми – мукозну сполучну тканину (Вартонів студень) [6], яка за своїм клітинним складом та будовою займає проміжне місце між ембріональною мезенхімою та дорослою сполучною тканиною [7]. В її клітинному складі переважають фібробластоподібні клітини, що активно синтезують глікозаміноглікани, та, за думкою деяких авторів, зберігають не мультипотентний (на відміну від клітин кісткового мозку та жирової тканини, які є МСК дорослого організму), а навіть плюрипотентний стовбуровий потенціал [8]. Є дані про можливість експресії ними ембріональних маркерів *Oct4* і *Tra-1-60*, *Tra-1-81*, *SSEA-1*, *SSEA-4* [9]. Вони мають дещо відмінний від зрілого імунотипу, що відкриває додаткові можливості для алотрансплантації [10, 11]. Введення в культуру клітин з пупкового канатика не створює морально-етичного конфлікту, процедура отримання МСК з пупкового канатика є досить простою. В дослідках 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 Вартонового студня пуповини можлива без їх негайного відторгнення. Дані літератури засвідчують більш виражені імуносупресивні властивості МСК пупкового канатика в порівнянні з аналогічними клітинами з інших джерел, що, поряд з іншими перевагами, свідчить про перспективність використання їх в регенеративній медицині [12]. МСК з Вартонового студня добре проліферують *in vitro*, мають унікальні властивості (міграція в білу речовину спинного мозку після інтравентрикулярних введення, здатність до трансдиференціювання в клітини ектодермального походження, існування системного і локального імунomodуючого 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.

Проте існує думка, що пошкоджуючі фактори вогнища запалення негативно впливають на життєдіяльність введених МСК, ймовірно, створюючи обмеження для повноцінної реалізації їх терапевтичного потенціалу [13]. Тому перспективно видається ідея одночасного застосування МСК і зниження рівня запалення. Одним із ключових протизапальних цитокінів вважають IL-10 [14]. В окремих роботах показано ключову роль IL-10 у попередженні розвитку та лікуванні аутоімунних станів та аутоімунних захворювань ЦНС [15, 16, 17].

Нами було зроблено припущення, що одночасне застосування МСК та IL-10 зможе взаємно посилити їх терапевтичний ефект. Беручи до уваги особливості і унікальні властивості МСК Вартонового студня, нами проведено експериментальне комплексне вивчення ефективності застосування МСК при вогнищевих ураженнях ЦНС щурів з модельованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) у комбінації з введенням IL-10, з метою створення нового імунотипу стану та корекції рухових порушень експериментальних тварин. Проведено експериментальне дослідження впливу нового методу лікування на поведінкові реакції щурів.

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. 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.

Мета роботи: дослідити вплив мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня людини та інтерлейкіна-10 на функціональний стан ЦНС щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилися у відділі експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Свідоцтво про атестацію №ПТ-145/09, видане 14.05.2010, чинне 13.05.2015.

Дослідження проведені на 43 білих безпородних щурах-саміцях вагою 200-230 г. Тварини розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України» утримувались в стандартних умовах віварію із забезпеченням вільного доступу до води та їжі.

Усі процедури з дослідними щурами виконували у відповідності з міжнародними правилами і нормами European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC та згідно з принципами «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), і Законом України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.20.2006 [18, 19].

ЕАЕ індукували гомогенатом спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (*Sigma*, США) згідно зі зміною співвідношення компонентів енцефалітогенної суміші (співвідношенням ад'юванту до мозкової тканини 1,6:1), що дозволило отримати хронічний рецидивуючий перебіг ЕАЕ з неважкою клінікою [20, 21]. Саме хронічно рецидивуюча форма ЕАЕ дозволяє більш детально вивчати вплив факторів на перебіг демієлінізуючого процесу та уникнути летальності експериментальних тварин, яка, за даними деяких дослідників, при гострому ЕАЕ доходить до 30-60% [21]. Енцефалітогенну суміш вводили у подушечки кінцівок щурів згідно зі стандартним протоколом із розрахунку 50 мг енцефалітогенної суміші на кожну тварину [20, 21].

Розподіл на експериментальні групи представлено в **табл.1**.

В наших попередніх роботах виявлено, що максимум клінічних проявів у тварин з ЕАЕ спостерігається на 17-у добу після індукції ЕАЕ, тому ми виділили групу тварин, яким на 10-у добу внутрішньовенно вводили IL-10 з метою протизапального впливу [21, 22]. На піку клінічних проявів на 16-у добу тваринам вводили МСК з метою оцінити їх протизапальний вплив і здатність попереджувати процеси демієлінізації і пришвидшувати ремієлінізацію ЦНС на морфологічному рівні.

Щурів з ЕАЕ лікували внутрішньовенним чи субоципітальним введенням у різних поєднаннях IL-10 та МСК. Рекombінантний IL-10

Таблиця 1. Розподіл тварин в експерименті.

ГРУПА, №	КІЛЬКІСТЬ ТВАРИН	ЛІКУВАННЯ
1	8	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2	8	Трансплантація МСК (10 ⁶ клітин/тварину) субоципітально на 17-у добу після індукції ЕАЕ
3	8	Введення IL-10 (0,2 мкг/тварину внутрішньовенно) на 10-у добу, IL-10 субоципітально на 17-у добу після індукції ЕАЕ
4	7	Введення IL-10 внутрішньовенно на 10-у добу, (IL-10 та МСК) субоципітально на 17-у добу після індукції ЕАЕ
5	12	Інтактні щури

АКТИВНІСТЬ	ПОКАЗНИК	ІНТАКТНІ, N=12	ЕАЕ, N=8
Горизонтальна активність	LP	1,50 ± 0,19	1,53 ± 0,22
	n1	7,25 ± 1,21	9,75 ± 2,03
Центральні квадрати	n2	6,17 ± 1,20	4,75 ± 1,60
	ns	13,42 ± 1,90	14,50 ± 2,72
Горизонтальна активність	LP	8,07 ± 1,16	5,53 ± 0,95
	n1	67,75 ± 5,40	39,88 ± 4,19 p<0,0015*
	n2	50,25 ± 4,04	26,50 ± 5,02 p<0,004*
Периферійні квадрати	ns	118,00 ± 7,31	66,38 ± 8,73 p<0,0002*
	LP	44,74 ± 10,13	10,39 ± 1,98 p<0,0001*
Вертикальна активність	n1	14,58 ± 1,76	15,63 ± 2,18
	n2	16,75 ± 1,44	14,38 ± 2,42
	ns	31,33 ± 2,74	30,00 ± 3,61
	T1	41,34 ± 5,38	43,46 ± 7,29
	T2	51,88 ± 5,13	44,36 ± 10,21
	Ts	93,22 ± 8,83	87,82 ± 13,10
	t1	2,83 ± 0,21	2,72 ± 0,15
	t2	3,17 ± 0,22	2,97 ± 0,23
	ts	2,99 ± 0,12	2,91 ± 0,17
	Емоційна активність (грумінг)	LP	102,23 ± 13,21
n1		3,67 ± 0,74	3,13 ± 0,64
n2		3,42 ± 0,62	2,75 ± 0,49
ns		7,08 ± 0,99	5,88 ± 0,79
T1		15,54 ± 2,53	16,70 ± 3,44
T2		25,45 ± 6,73	29,95 ± 7,86
Ts		40,99 ± 8,08	46,65 ± 7,65
t1		4,92 ± 1,00	5,05 ± 0,93
t2		10,41 ± 3,20	9,21 ± 2,11
ts		7,08 ± 1,82	8,18 ± 1,32
Емоційна активність (болюси)	n	0 ± 0	0,63 ± 0,32
Дослідницька активність (нірки)	LP	202,41 ± 47,44	398,50 ± 77,51 p<0,031*
	n1	1,83 ± 0,39	0,63 ± 0,26
	n2	1,67 ± 0,53	1,13 ± 0,58
	ns	3,50 ± 0,68	1,75 ± 0,77
	T1	4,91 ± 1,08	1,70 ± 0,70
	T2	4,19 ± 1,30	2,05 ± 1,06
	Ts	9,09 ± 1,67	3,75 ± 1,64 p<0,047*
	t1	2,01 ± 0,39	1,39 ± 0,55
	t2	1,86 ± 0,49	0,69 ± 0,34
	ts	2,80 ± 0,30	1,09 ± 0,42 p<0,004*

людини був отриманий в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України і люб'язно наданий для проведення експерименту.

МСК виділяли методом експлантів з Вартонового студня пупкового канатика людини. Пупкові канатики, отримані від здорових породіль під час нормальних пологів, були надані муніципальним пологовим будинком № 5 м. Києва. Жінки підписали інформаційний лист про згоду надати матеріал для наукових досліджень.

Матеріал обробляли не пізніше ніж через 5 годин після пологів. Доставка в лабораторію відбувалася в середовищі DMEM (Sigma, США) з 1000 од/мл бензилпеніциліну (Артеріум, Україна) та 1 мг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна). Пупковий канатик максимально відмивали від крові, на 30 хвилин вміщували в середовище DMEM з антибіотиками: 1000 од/мл пеніциліну та 1 мг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна) та антимікотиком (50 од/мл амфотерицину В (Київмедпрепарат, Україна)). Всі маніпуляції проводили в стерильних умовах.

З пупкового канатика вилучали судини: одну вену та дві артерії, та відокремлювали Вартонів студень, який подрібнювали ножицями до найменш можливого розміру 0,1-0,5 см та вміщували в культуральний флакон 75 см² (Grenier Bio-One, Австрія) з ростовим середовищем α-MEM з 2 мМ L-глутаміном (BioWest, Іспанія), що містило 10% фетальної телячої сироватки (HyClone, США) та 1% антибіотиків бензилпеніцилін та стрептоміцин (Артеріум, Україна). Культивування проводили у стандартних умовах CO₂-інкубатора (37 °C, 5% CO₂, зволожена атмосфера). Через 7-14 днів в культуральних флаконах можна було спостерігати прикріплені окремі клітини та клони. Отриману культуру вважали нульовим пасажем і культивували у вказаних вище умовах. При досягненні моношару 70% конфлюентності клітини переводили в суспензію з використанням суміші 0,25% розчину трипсину та 0,02% розчину Версена (1:1). Для введення піддослідним тваринам використовували клітини 2-го пасажу. Їх характеризували за морфологією та поверхневими маркерами. Кількість клітин визначали за допомогою камери Горяєва.

Для оцінки стану культур використовували інвертований мікроскоп Leica DMIL (Leica, Німеччина). FACS-аналіз експресії поверхневих маркерів МСК з використанням моноклональних антитіл проти CD105, CD90, CD73 (Becton Dickinson, США) виконано на сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva у відділі клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Поведінкові реакції щурів №1, №2, №3 і №4 груп досліджували за тестом «відкрите поле» три рази, групи №5 – один раз. Перше тестування проводили: у експериментальних щурів №1, №2, №3 і №4 груп – на 12-у добу після індукції ЕАЕ; друге тестування: у тварин груп №1 і №2 – на 15-у добу після індукції ЕАЕ, у щурів груп №3 і №4 – на 15-у добу після індукції ЕАЕ (7-а доба після внутрішньовенного введення IL-10); третє тестування: у щурів групи №1 – на 24-у добу після

Таблиця 2. Порівняння показників поведінкових реакцій інтактних щурів і щурів на 12-у добу після індукції ЕАЕ, перше тестування (M ± m).

Примітки:

LP – латентний період;

n1 – кількість епізодів за перші 5 хв.;

n2 – кількість епізодів за другі 5 хв.;

ns – загальна кількість епізодів;

T1 – тривалість епізодів за перші 5 хв.;

T2 – тривалість епізодів за другі 5 хв.;

Ts – загальна тривалість епізодів;

t1 – середня тривалість окремого епізоду за перші 5 хв.;

t2 – середня тривалість окремого епізоду за другі 5 хв.;

ts – середня тривалість окремого епізоду за 10 хв. спостережень;

p* – вірогідні відмінності при порівнянні експериментальних груп.

p** – вірогідні відмінності при порівнянні груп (ЕАЕ та ЕАЕ+МСК);

p*** – вірогідні відмінності при порівнянні груп (ЕАЕ та ЕАЕ+IL-10);

p**** – вірогідні відмінності при порівнянні груп (ЕАЕ та ЕАЕ+IL-10+МСК).

АКТИВНІСТЬ	ПОКАЗНИК	ІНТАКТНІ ЩУРИ, N=12	EAE, N=8	EAE+MCK, N=8	EAE+IL-10, N=7	EAE+IL-10 +MCK, N=4
Горизонтальна активність	LP	1,50 ± 0,19	1,16 ± 0,07	6,32 ± 3,12 p < 0,028**	2,21 ± 0,57 p < 0,002***	2,19 ± 0,69 p < 0,028****
	n1	7,25 ± 1,21	14,38 ± 3,83	8,25 ± 1,60	9,29 ± 2,65	14,75 ± 7,36
Центральні квадрати	n2	6,17 ± 1,20	5,50 ± 1,95	4,00 ± 1,41	2,71 ± 1,44	27,50 ± 17,88
	ns	13,42 ± 1,9	19,88 ± 4,98	12,25 ± 2,33	12,00 ± 3,25	42,25 ± 25,1
Горизонтальна активність	Lp	8,07 ± 1,16	9,59 ± 6,05	11,58 ± 4,13 p < 0,028**	129,06 ± 80,36	10,45 ± 3,63
	n1	67,75 ± 5,40	60,88 ± 10,54	50,00 ± 10,29	51,14 ± 14,73	75,50 ± 24,94
Периферійні квадрати	n2	50,25 ± 4,04	29,00 ± 7,49	24,63 ± 5,11	29,86 ± 7,54	54,25 ± 18,10
	ns	118,00 ± 7,31	89,88 ± 14,96	74,63 ± 12,94	81,00 ± 18,70	129,75 ± 39,80
Вертикальна активність	LP	44,74 ± 10,13	42,10 ± 12,15	86,15 ± 46,05	97,14 ± 55,96	104,53 ± 45,75
	n1	14,58 ± 1,76	16,63 ± 2,31	12,63 ± 2,99	14,86 ± 4,18	13,50 ± 4,86
	n2	16,75 ± 1,44	10,63 ± 2,50	11,50 ± 2,65	12,57 ± 3,18	12,50 ± 2,33
	ns	31,33 ± 2,74	27,25 ± 4,42	24,13 ± 5,11	27,43 ± 7,15	26,00 ± 5,28
	T1	41,34 ± 5,38	42,53 ± 6,75	35,51 ± 9,57	49,43 ± 13,49	34,89 ± 12,63
	T2	51,88 ± 5,13	37,96 ± 10,02	34,67 ± 7,71	61,41 ± 13,46	40,25 ± 8,17
	Ts	93,22 ± 8,83	80,48 ± 15,89	70,18 ± 15,60	110,84 ± 26,36	75,13 ± 15,19
	t1	2,83 ± 0,21	2,51 ± 0,21	2,41 ± 0,37	2,80 ± 0,67	2,57 ± 0,40
	t2	3,17 ± 0,22	3,40 ± 0,31	3,20 ± 0,27	5,91 ± 1,17 p < 0,029***	3,19 ± 0,30
	ts	2,99 ± 0,12	2,84 ± 0,22	3,02 ± 0,21	4,74 ± 0,72 p < 0,029***	2,91 ± 0,36
Емоційна активність (грумінг)	LP	102,23 ± 13,20	60,62 ± 11,72	68,56 ± 24,00	92,23 ± 41,05	57,39 ± 8,47
	n1	3,67 ± 0,74	4,00 ± 0,42	4,63 ± 0,73	5,00 ± 1,15	5,00 ± 1,22
	n2	3,42 ± 0,62	4,00 ± 1,00	5,75 ± 0,80	3,43 ± 0,95	4,75 ± 1,75
	ns	7,08 ± 0,99	8,00 ± 0,91	10,38 ± 1,16	8,43 ± 1,34	9,75 ± 2,17
	T1	15,54 ± 2,53	39,99 ± 7,09	40,08 ± 9,76	51,93 ± 14,67	33,40 ± 9,39
	T2	25,45 ± 6,73	32,63 ± 11,52	88,44 ± 14,34 p < 0,01**	30,85 ± 9,33	47,51 ± 20,3
	Ts	40,99 ± 8,08	72,62 ± 9,98	128,51 ± 16,60 p < 0,028**	82,78 ± 8,68	80,91 ± 27,34
	t1	4,92 ± 1,00	10,22 ± 1,59	10,96 ± 3,56	9,39 ± 3,01	6,54 ± 1,05
	t2	10,41 ± 3,20	7,66 ± 2,46	16,58 ± 3,23 p < 0,005**	9,10 ± 2,74	9,40 ± 2,60
	ts	7,08 ± 1,82	9,20 ± 1,08	14,11 ± 3,24	12,01 ± 2,48	7,50 ± 1,42
Емоційна активність (болюси)	n	0 ± 0	0,63 ± 0,50	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Дослідницька активність (нірки)	LP	202,41 ± 47,44	479,81 ± 65,74	317,20 ± 58,90	448,35 ± 93,80	432,99 ± 129,60
	n1	1,83 ± 0,39	0,25 ± 0,16	1,00 ± 0,38	0,29 ± 0,18	0,50 ± 0,50
	n2	1,67 ± 0,53	0,38 ± 0,18	0,50 ± 0,27	0,14 ± 0,14	1,75 ± 1,44
	ns	3,50 ± 0,68	0,63 ± 0,18	1,50 ± 0,53	0,43 ± 0,20	2,25 ± 1,31
	T1	4,91 ± 1,08	0,41 ± 0,30	1,57 ± 0,70	0,28 ± 0,19	1,19 ± 1,19
	T2	4,19 ± 1,30	0,59 ± 0,31	0,69 ± 0,40	0,46 ± 0,46	5,61 ± 5,0
	Ts	9,09 ± 1,67	1,00 ± 0,34	2,26 ± 0,95	0,74 ± 0,45	6,81 ± 4,68
	t1	2,01 ± 0,39	0,41 ± 0,30	0,91 ± 0,32	0,28 ± 0,19	0,60 ± 0,60
	t2	1,86 ± 0,49	0,59 ± 0,31	0,51 ± 0,27	0,46 ± 0,46	1,34 ± 0,83
	ts	2,80 ± 0,30	1,00 ± 0,34	1,21 ± 0,27	0,74 ± 0,45	1,93 ± 0,72

Таблиця 3. Порівняння показників поведінкових реакцій щурів при різних видах лікування індукованого EAE, третє тестування (M ± m).

індукції ЕАЕ, у щурів групи №2 – на 24-у добу після індукції ЕАЕ (7-а доба після субоципітального введення МСК), у щурів групи №3 – на 24-у добу після індукції ЕАЕ (15-а доба після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-а доба після субоципітального введення ІЛ-10), у щурів групи №4 – на 24-у добу після індукції ЕАЕ (15-а доба після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-а доба після субоципітального введення ІЛ-10 і МСК).

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 (n1), кількість епізодів за другі 5 хвилин (n2), загальну кількість епізодів за 10 хвилин спостережень (ns), тривалість епізодів за перші 5 хвилин (T1), тривалість епізодів за другі 5 хвилин (T2), загальну тривалість епізодів (Ts), середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хвилин (t1), середню тривалість окремого епізоду за другі 5 хвилин (t2) та середню тривалість окремого епізоду за 10 хвилин спостережень (ts).

Статистична обробка отриманих даних проводилась 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При першому тестуванні у «відкритому полі» щурів на 12-у добу після індукції ЕАЕ (група №1) у порівнянні з інтактними тваринами (група №5) виявили вірогідне зниження горизонтальної локомоторної активності (зменшення кількості перетинів периферійних квадратів – n1, n2, ns), вертикальної локомоторної активності (вірогідне зменшення латентного періоду – LP та тенденція до зниження кількості вертикальних стійок – n2, ns, їх тривалості – T2, Ts та середньої тривалості – t1, t2, ts), вірогідне зниження дослідницької активності (збільшення латентного періоду – LP та зменшення тривалості – Ts і середньої тривалості епізодів грумінгу – ts). Також спостерігали тенденцію до підвищення емоційної активності (збільшення тривалості епізодів грумінгу – T1, T2, Ts при зменшенні кількості епізодів грумінгу – n1, n2, ns та збільшення кількості болюсів) (табл. 2). Також спостерігали тенденцію до зниження дослідницької активності.

Друге тестування у «відкритому полі» проводилося на 15-у добу після індукції ЕАЕ і на 7-му добу після внутрішньовенного введення ІЛ-10 з метою оцінити зміни поведінкових реакцій дослідних тварин в ході розвитку захворювання та під впливом ІЛ-10. Оскільки достовірних змін в групах тварин під час першого та другого тестування не виявлено, результати другого тестування в цій роботі не представляємо.

Третє дослідження у «відкритому полі» поведінкових реакцій щурів групи №2 – на 24-у добу після ЕАЕ та на 7-у добу після субоципітального введення МСК у порівнянні з експериментальною групою щурів №1, яка не отримала лікування, (табл. 3) виявило тенденцію до зниження горизонтальної локомоторної активності (зменшення кількості перетинів центральних та периферійних квадратів) при вірогідно збільшеному латентному періоді – LP перетину центральних та периферійних квадратів, вірогідне підвищення емоційної активності (збільшення тривалості – T2, Ts та середньої тривалості епізоду грумінгу – t2). А також відмічено тенденцію до зниження вертикальної локомоторної активності та підвищення дослідницької активності.

У «відкритому полі» при третьому тестуванні щурів групи №3 – на 24-у добу після індукції ЕАЕ (15-а доба після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-а доба після субоципітального введення ІЛ-10) у порівнянні з групою щурів №1 (табл. 3) відзначали вірогідно збільшений латентний період – LP перетину центральних квадратів при тенденції до зниження кількості перетинів центральних і периферійних квадратів (горизонтальна локомоторна активність) та вірогідне підвищення вертикальної локомоторної активності (збільшення середньої тривалості вертикальних стійок – t2, ts). Також спостерігали зміни показників емоційної активності (тенденція до підвищення за перші 5 хвилин та зниження за другі 5 хвилин дослідження) та зниження дослідницької активності.

При третьому тестуванні у «відкритому полі» щурів групи №4 – на 24-у добу після ЕАЕ (15-а доба після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-а доба після субоципітального введення ІЛ-10 та МСК) у порівнянні з експериментальною групою щурів №1, яка не отримала лікування, виявлені зміни показників горизонтальної локомоторної активності (вірогідне збільшення латентного періоду LP перетину центральних квадратів при тенденції до підвищення кількості перетинів центральних і периферійних квадратів) та спостерігали тенденцію до підвищення вертикальної локомоторної активності (за другі 5 хвилин дослідження) і дослідницької активності, а також зниження емоційної активності (грумінгу – за перші 5 хвилин дослідження та зменшення кількості болюсів) (табл. 3).

Результати дослідження показали, що індукований ЕАЕ у щурів призводить до зниження орієнтовно-дослідницької діяльності на тлі підвищення рівня емоційного напруження. У експериментальних тварин після індукції ЕАЕ відмічено зниження локомоторної і дослідницької активності та підвищення емоційної активності. Ймовірно, причиною порушення орієнтовно-дослідницької поведінки цих щурів може вважатися зростання рівня тривожності і страху. Виявлені зміни в поведінці щурів з ЕАЕ свідчать про суттєві зрушення в діяльності мозку, які з найбільшою вірогідністю обумовлені дегенеративно-дистрофічними змінами ЦНС.

Послаблення негативного впливу емоційного стану супроводжується посиленням орієнтовно-дослідницької активності. При застосуванні МСК та ІЛ-10 нормалізуються показники когнітивної діяльності (орієнтовно-дослідницька активність) та емоційної сфери (рівень страху, тривожності).

Результати нашої роботи свідчать про можливість корекції порушень поведінки щурів з ЕАЕ шляхом лікування МСК та ІЛ-10.

ВИСНОВКИ

1. У щурів на 12-у добу після індукції ЕАЕ при тестуванні у «відкритому полі» спостерігаються зміни адаптивної поведінки у вигляді пригнічення орієнтовно-дослідницької та активації емоційної активності.
2. На 24-у добу після ЕАЕ та на 7-у добу після субоципітального введення МСК у щурів при тестуванні у «відкритому полі» виявлено зниження горизонтальної і вертикальної локомоторної активності та підвищення дослідницької і емоційної активності.
3. На 24-у добу після індукції ЕАЕ (15-а доба після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-а доба після субоципітального введення ІЛ-10) у щурів при тестуванні у «відкритому полі» спостерігали зниження горизонтальної локомоторної і дослідницької активності та підвищення вертикальної локомоторної і емоційної активності.

ВИСНОВКИ

4. На 24-у добу після ЕАЕ (15-а доба після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-а доба після субокупітального введення ІЛ-10 та МСК) у щурів при тестуванні у «відкритому полі» виявлено підвищення горизонтальної і вертикальної локомоторної активності та дослідницької активності, а також зниження емоційної активності.
5. При застосуванні МСК та ІЛ-10 нормалізуються показники когнітивної діяльності (орієнтовно-дослідницька активність) та емоційної сфери (рівень страху, тривожності).
6. Застосування МСК та ІЛ-10 сприяє корекції порушень адаптивної поведінки експериментальних щурів з індукованим ЕАЕ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Augello A. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niche [Text] / A. Augello, T. B. Kurth, C. De Bari // Eur. Cell Mater. – 2010. – Vol. 20. – P. 121–133.
2. Bieback K. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy [Text] / K. Bieback, I. Brinkmann // World J. Stem Cells. – 2010. – Vol. 2, №4. – P. 81–92.
3. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance [Text] / Z. Wang, Y. Li, A. Ahmad, et al. // Drug Resistance Updates. – 2010. – Vol. 13, № 4–5. – P. 109 – 118.
4. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease [Text] / J.-P. Thiery, H. Acloque, R.Y.J. Huang, et al. // Cell. – 2009. – Vol. 139, № 5. – P. 871 – 890.
5. Проліферативний і дифференцировочний потенціал мезенхімальних стволових кліток із жирової ткани в умовах культивування [Текст] / В. М. Семенова, Н. І. Лисяний, Л. П. Стайно, і др. // Український нейрохірургічний журнал. – 2014. – № 3. – С. 24 – 29.
6. Kalluri J. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells [Text] / J. Kalluri // J. Clin. Invest. – 2009. – Vol. 119, № 6. – P. 1417–1419.
7. Селезнева Т. Д. Гістологія. Повний курс за 3 дні [Текст] / Т. Д. Селезнева, В. Ю. Барсуков, А. С. Мишин // М.: Эксмо, 2007. – 354 с.
8. Kalluri R. Fibroblasts in cancer [Text] / R. Kalluri, M. Zeisberg // Nat. Rev. Cancer. – 2006. – Vol. 6, № 5. – P. 392–401.
9. Multipotent Menstrual Blood Stromal Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation [Text] / A. Patel, E. Park, M. Kuzman, et al. // Cell Transplantation. – 2008. – Vol. 17, № 3. – P. 303–311.
10. Huang G.T.-J. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine [Text] / G.T.-J. Huang, S. Gronthos, S. Shi // JDR. – 2009. – Vol. 88, № 9. – P. 792 – 806.
11. Taghizadeh R. R. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications [Text] / R. R. Taghizadeh, K. J. Cetrulo, C. L. Cetrulo // Placenta. – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 311 – 315.
12. Heterogeneity of Umbilical Cords as a Source for MSC [Text] / O.O. Maslova, N. S. Shuvalova, O. M. Sukhorada, et al. // Dataset Papers in Biology. – 2013. – Vol. 2013, Article ID 370103, <http://dx.doi.org/10.7167/2013/370103>.
13. Improved Graft Mesenchymal Stem Cell Survival in Ischemic Heart With a Hypoxia-Regulated Heme Oxygenase-1 Vector [Text] / Y.L. Tang, Y.C. Zhang, K. Qian, et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2005. – Vol. 46, № 7. – P. 1339–1350.
14. Lalani I. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity [Text] / I. Lalani, K. Bhol, A.R. Ahmed // Ann. Allergy. – 1997. – Vol. 79. – P. 469–483.
15. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cells [Text] / X. Zhang, D. N. Koldzic, L. Izikson, et al. // Int. Immunol. – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 249–256.
16. Segal B. M. An Interleukin (IL)-10/IL-12 Immunoregulatory Circuit Controls Susceptibility to Autoimmune Disease [Text] / B.M. Segal, B.K. Dwyer, E.M. Shevach // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 187, № 4. – P. 537–546.
17. IL-10 Is Critical in the Regulation of Autoimmune Encephalomyelitis as Demonstrated by Studies of IL-10- and IL-4-Deficient and Transgenic Mice [Text] / E. Bettelli, M.P. Das, E.D. Howard, et al. // J. Immunol. – 1998. – Vol. 161. – P. 3299–3306.
18. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [Text] // Council of Europe. Strasbourg, 1986. 51 p.
19. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 №3447-IV [Текст] // Відомості Верховної Ради України. – 2006. – № 27. – С. 990.
20. Марков Д. А. Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике [Текст] / Д. А. Марков // Минск: Наука и техника, 1975. – 360 с.
21. Цимбалюк В.І. Особливості моделювання та перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту [Текст] / В.І. Цимбалюк, Ю. А. Касяненко // Укр. нейрохірургічний журнал. – 2005. – №1 – С. 12–14.
22. Касяненко Ю.А. Вплив суспензії клітин фетального мозку на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.05. «Нейрохірургія» [Текст] / Ю. А.Касяненко // Київ, 2006.– 20 с.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 22.04.2015 р.

Прийнята до друку 21.05.2015 р.