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], Шувалова Н. С.[2], Топорова О. К.[2,3], Дерябіна О. Г.[2,3], Пічкур Л. Д.[1]

[1]*ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна*
[2]*ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна*
[3]*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна*

e-mail: verbovskaya-svetlana@ukr.net

ВПЛИВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ВАРТОНОВОГО СТУДНЯ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ, ТРАНСФІКОВАНИХ ПЛАЗМІДНИМ ВЕКТОРОМ, ЩО МІСТИТЬ ГЕН IL-10, НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТОМ

РЕЗЮМЕ

На моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ), як аналога розсіяного склерозу людини, вивчали вплив мезенхімальних стовбурових клітин, трансфікованих плазмідним вектором, що містить ген інтерлейкіну-10 (IL-10), на функціональний стан ЦНС щурів.

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. Потім МСК 2-го пасажу трансфікували плазмідою, що містить кДНК-овий варіант гена IL-10 і маркерний ген зеленого флуоресцентного білка (GFP). Трансплантацію клітин проводили субокципітально на 17-у добу в дозі 1 млн клітин на тварину.*

РЕЗУЛЬТАТИ. *При дослідженні в тесті «відкрите поле» встановлено, що застосування МСК, трансфікованих геном IL-10, у щурів з індукованим ЕАЕ призводить до зниження показників вертикальної локомоторної активності та підвищення емоційної активності, а також частково корегує показники горизонтальної локомоторної активності, які наближаються до показників інтактних тварин.*

ВИСНОВКИ. *Застосування МСК, трансфікованих плазмідним вектором, що містить ген IL-10, у щурів з індукованим ЕАЕ є більш ефективним, ніж лікування нетрансфікованими МСК. Комбінований метод лікування (IL-10 + МСК) у щурів з індукованим ЕАЕ ефективніший, ніж метод лікування трансфікованими МСК.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *експериментальний алергічний енцефаломієліт, мезенхімальні стовбурові клітини, інтерлейкін-10, тест «відкрите поле»*

У 30-40% випадків розвитку розсіяного склерозу передує розсіяний енцефаломієліт, тому правильне ефективне лікування цього захворювання є надзвичайно важливою проблемою з економічної, медичної та наукової точок зору. Для лікування цих станів застосовуються різні підходи: від імунокорегуючої, противірусної терапії до клітинної терапії [1]. Експериментальною моделлю розсіяного енцефаломієліту є експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) [2].

Останнім часом все більше досліджень присвячено вивченню мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих з різних джерел (кістковий мозок, жирова тканина і та ін.), які мають суттєві відмінності у доступності, різні характеристики ефективності та безпечності [3, 4]. Одними з найбільш перспективних для використання є МСК Вартонового студня пуповини людини [5].

МСК з Вартонового студня добре проліферують *in vitro* [6], мають унікальні властивості: міграція в білу речовину спинного мозку

після інтравентрикулярних введень, здатність до трансдиференціювання в клітини ектодермального походження, існування системного і локального імуномодулюючого впливу за рахунок швидкого збільшення регуляторних лімфоцитів і зменшення кількості активованих антигенпрезентуючих клітин. При цьому МСК здатні стимулювати синтез і самостійно синтезувати протизапальні цитокіни, такі як інтерлейкін-10 (IL-10) та трансформуючий фактор росту β (TGF-β.) [7, 8]. Ці властивості МСК (особливо щодо IL-10) можуть бути надзвичайно важливими для корекції багатьох патологічних станів, враховуючи те, яку важливу роль відіграє IL-10 у попередженні розвитку та лікуванні аутоімунних станів та захворювань ЦНС [9-11].

В нашій попередній роботі [12] показано, що МСК Вартонового студня пуповини людини в комбінації з IL-10 справляють виражений позитивний вплив на поведінкові реакції дослідних тварин з ЕАЕ. Отримання необхідної для застосування кількості IL-10 є досить проблематичним, тому в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України розроблена методика трансфекції гена, відповідального за синтез IL-10, в МСК Вартонового студня пуповини людини.

МЕТА РОБОТИ: встановити вплив мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня пуповини людини, трансфікованих плазмідним вектором, що містить ген IL-10, на функціональний стан ЦНС щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведені в лабораторії експериментальної нейрохірургії відділу експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України» на 53 білих безпородних статевозрілих щурах-самицях 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 відповідно до міжнародних правил і норм European Communities Council Directives of 24 November1986, 86/609/EEC та згідно з принципами «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) [13] і Законом України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» от 21.20.2006 [14].

ЕАЕ індукували гомогенатом спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma, США) згідно з методикою Г. С. Давидової [15] зі зміною співвідношення компонентів енцефалітогенної суміші (співвідношенням ад'юванта до мозкової тканини 1,6:1), що дозволило отримати хронічний рецидивуючий ЕАЕ з клінічним перебігом середнього ступеня важкості [16]. Саме хронічно рецидивуюча форма ЕАЕ дозволяє більш детально вивчити вплив факторів на перебіг демієлінізуючого процесу та уникнути летальності експериментальних тварин, яка, за даними деяких дослідників, при гострому ЕАЕ доходить до 30-60% [17]. Енцефалітогенну суміш вводили у подушечки кінцівок щурів згідно [16, 17] з розрахунком 50 мг енцефалітогенної суміші на кожну тварину.

Розподіл на експериментальні групи представлено в **табл. 1**. Щурів з ЕАЕ лікували внутрішньовенним чи субокципітальним введенням у різних поєднаннях мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та IL-10 і мезенхімальних стовбурових клітин, трансфікованих плазмідою, що містить ген IL-10 (МСКТ). У наших попередніх роботах виявлено, що максимум клінічних проявів у тварин з ЕАЕ [16] 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. На піку клінічних проявів на 16-у добу тваринам вводили МСК або МСКТ, розраховуючи оцінити протизапальний вплив і здатність МСК та МСКТ попереджувати процеси демієлінізації і пришвидшувати ремієлінізацію ЦНС на морфологічному рівні.

Рекомбінантний IL-10 людини був отриманий в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України і люб'язно наданий для проведення експерименту.

Пупкові канатики, отримані за інформованою згодою від здорових породіль під час нормальних пологів, були надані муніципальним пологовим будинком №5 м. Києва. МСК виділяли методом експлантів з Вартонового студня пупкового канатика людини. Отримання, ідентифікація, культивування, визначення життєздатності МСК проводили згідно з методикою, описаною в нашій попередній публікації [12]. Матеріал обробляли не пізніше ніж через 5 годин після пологів. Пупковий канатик відмивали від крові, на 30 хв вміщували в середовище *DMEM* з антибіотиками: 1000 од/мл пеніциліну та 1 мкг/мл стрептоміцину (*Артеріум*, Україна) та антимікотиком (50 од/мл амфотерицину В (*Київмедпрепарат*, Україна). Відокремлювали Вартонів студень, який подрібнювали ножицями та вміщували в культуральний флакон 75 см^2 (*Grenier Bio-One*, Австрія) з ростовим середовищем α-МЕМ з 2 мМ L-глютаміном (*BioWest*, Іспанія), що містило 10% фетальної телячої сироватки (*HyClone*, США) та 1% антибіотиків бензилпеніцилін та стрептоміцин (*Артеріум*, Україна). Культивування проводили у стандартних умовах CO_2-інкубатора (37 °С, 5% CO_2, зволожена атмосфера). При досягненні 70% конфлюентності моношару 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.

Для оцінки стану культур використовували інвертований мікроскоп «Leica DMIL» (Німеччина). FACS-аналіз експресії поверхневих маркерів МСК CD105, CD90, CD73 (BD, США) виконано на сортері BD FACSAria із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva v. 2.6.2 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 плазмідою, що містить кДНК-овий варіант гена IL-10 [18] і маркерний ген зеленого флуоресцентного білка (GFP) під регуляцією конститутивного промотора ранніх генів цитомегаловірусу (CMV). Трансфекцію проводили за допомогою трансфекційного реагенту TurboFect (*Termo Scientific*, США) 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 [12] і вводили експериментальним щурам субокципітально у кількості 1 млн клітин на тварину. Паралельну пробу аналізували методом проточної цитометрії на сортері BD FACSAria і визначали відсоток трансфікованих клітин за маркерним білком GFP. Ця величина становила 20%.

Таблиця 1. Розподіл тварин в експерименті.

ГРУПА	КІЛЬКІСТЬ ТВАРИН	ЛІКУВАННЯ
1	8	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2	8	Введення МСК субокципітально (1 млн клітин) на 17-у добу
3	8	Введення IL-10 внутрішньовенно (1 мкг в 1 мл) на 10-у добу, IL-10 субокципітально (1 мкг в 0,1 мл) на 17-у добу
4	7	Введення IL-10 внутрішньовенно (1 мкг в 1 мл) на 10-у добу, 1 мкг IL-10 + 1 млн МСК субокципітально на 17-у добу
5	12	Інтактні щури
6	10	Введення МСКТ субокципітально (1 млн клітин) на 17-у добу

Поведінкові реакції щурів груп №1-4 і №6 досліджували за тестом «відкрите поле» тричі: на 12-у, 15-у та 24-у добу після індукції ЕАЕ, групи №5 (інтактні) – один раз. Перше та друге тестування дослідних тварин проводили для вивчення ступеня 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.

Адаптивну поведінку тварин оцінювали за тестом «відкрите поле» протягом 10 хв (за перші 5 хв, за другі 5 хв та за 10 хв 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 кількість болюсів при дефекації). За допомогою програмно-комп'ютерного комплексу по дослідженню поведінкових реакцій тварин реєстрували: латентний період **(LP)**, кількість епізодів за перші 5 хв **(n1)**, кількість епізодів за другі 5 хв **(n2)**, загальну кількість епізодів за 10 хв спостережень **(ns)**, тривалість епізодів за перші 5 хв **(T1)**, тривалість епізодів за другі 5 хв **(T2)**, загальну тривалість епізодів **(Ts)**, середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хв **(t1)**, середню тривалість окремого епізоду за другі 5 хв **(t2)** та середню тривалість окремого епізоду за 10 хв спостережень **(ts)**.

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-Уітні. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При третьому тестуванні в установці «відкрите поле» щурів групи №6 (24-а доба після індукції ЕАЕ та через 1 тиждень після субокципітального введення МСКТ) у порівнянні з щурами групи №1 (24-а доба після індукції ЕАЕ, без лікування) **(табл.2)** виявлено вірогідне зниження показників вертикальної локомоторної активності (зменшення кількості вертикальних стійок – **n1**) та підвищення емоційної активності (збільшення загальної та середньої тривалості епізодів грумінгу – **Ts**, **ts**). Також спостерігали тенденцію до змін горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів центральних квадратів та збільшення кількості перетинів периферійних квадратів, а також зниження дослідницької активності за перші 5 хв та підвищення за другі 5 хв дослідження.

У тесті «відкритого поля» при третьому тестуванні щурів групи №6 (24-а доба після індукції ЕАЕ та через 1 тиждень після субокципітального введення МСКТ) у порівнянні з групою щурів №2 (24-а доба після індукції ЕАЕ та через 1 тиждень після субокципітального введення МСК) **(табл.2)** спостерігали вірогідне підвищення показників горизонтальної локомоторної активності (при зменшеному латентному періоді **LP** збільшувалась кількість перетинів периферійних квадратів **n2**), зниження емоційної активності (зменшення кількості епізодів грумінгу **n2**, **ns** та зменшення тривалості епізодів грумінгу **T2**) та зниження дослідницької активності (при збільшеному латентному періоді **LP** зменшувалась кількість заглядань у нірки **n1**, тривалість та середня тривалість епізодів **T1**, **t1**). Також виявлено тенденцію до зниження показників вертикальної локомоторної активності.

У щурів групи №6 (24-а доба після індукції ЕАЕ та через 1 тиждень після субокципітального введення МСКТ) у порівнянні з тваринами групи №4 (24-а доба після індукції ЕАЕ через 2 тижні після внутрішньовенного введення IL-10 та через 1 тиждень після субокципітального введення IL-10 та МСК) **(табл. 2)** при третьому тестуванні у «відкритому полі» виявлено вірогідне підвищення емоційної активності (середньої тривалості епізодів грумінгу ts). Також спостерігали тенденцію до зниження горизонтальної і вертикальної локомоторної активності та дослідницької активності.

Використання різних методів лікування (МСК, IL-10 та в комбінації IL-10 + МСК) щурів з індукованим ЕАЕ при дослідженні поведінкових реакцій у «відкритому полі» були розглянуті в нашій попередній статті [12], де було визначено, що лікування тварин з ЕАЕ лише інтерлейкіном-10 менш ефективне, ніж застосування МСК та IL-10 + МСК. Тому в даній роботі, вивчаючи вплив на поведінку тварин з індукованим ЕАЕ ще одного методу лікування – МСК, трансфікованих плазмідним вектором, що містить ген IL-10, ми порівнювали його з двома методами лікування, а саме – з лікуванням МСК та комбінованим методом лікування IL-10 + МСК.

Застосування МСКТ у щурів з індукованим ЕАЕ при тестуванні у «відкритому полі» вірогідно зменшує вертикальну локомоторну активність та підвищує емоційну активність, а також частково корегує показники горизонтальної локомоторної активності, які наближаються до показників інтактних тварин **(табл. 2)**. При порівнянні двох методів лікування (МСКТ і МСК) у щурів з індукованим ЕАЕ виявлено, що МСКТ вірогідно знижують емоційну і дослідницьку активності тварин та позитивно впливають на показники горизонтальної локомоторної активності, які вірогідно підвищуються, наближаючись до показників інтактних щурів **(табл. 2)**. Результати наших досліджень показали, що метод лікування МСКТ ефективніший, ніж лікування МСК. Порівняння двох методів лікування (МСКТ і комбіновано IL-10 + МСК) щурів з індукованим ЕАЕ виявило, що лікування МСКТ вірогідно підвищує показники емоційної активності. При комбінованому лікуванні IL-10 + МСК щурів з індукованим ЕАЕ у порівнянні з групою інтактних тварин вірогідних відмінностей між показниками поведінкових реакцій щурів не виявили, але відмічали його позитивний вплив, який проявлявся в тому, що показники вертикальної локомоторної активності та дослідницької і частково емоційної активності наближалися до показників інтактних щурів **(табл. 2)**, тому комбінований метод лікування IL-10 + МСК ми вважаємо ефективніше, ніж лікування МСКТ.

ВИСНОВКИ

1. ***Лікування МСКТ щурів з індукованим ЕАЕ вірогідно знижує вертикальну локомоторну активність та підвищує емоційну активність.***
2. ***Застосування МСКТ у щурів з індукованим ЕАЕ є більш ефективним, ніж лікування МСК.***
3. ***Комбінований метод лікування IL-10 + МСК у щурів з індукованим ЕАЕ ефективніший, ніж метод лікування МСКТ.***

Таблиця 2. Порівняння показників поведінкових реакцій щурів з лікуванням МСКТ з іншими видами лікування індукованого ЕАЕ (M ± m)

АКТИВНІСТЬ	ПОКАЗНИКИ	ІНТАКТНІ, n=12	ЕАЕ, n=8	ЕАЕ+МСК, n=8	ЕАЕ+ (IL-10 + МСК), n=4	ЕАЕ+МСКТ, n=10
Горизонтальна активність Центральні квадрати	Lp	1,50 ± 0,19	1,16 ± 0,07	6,32 ± 3,12	2,19 ± 0,69	1,52 ± 0,17
	n1	7,25 ± 1,21	14,38 ± 3,83	8,25 ± 1,60	14,75 ± 7,36	8,80 ± 2,14
	n2	6,17 ± 1,20	5,50 ± 1,95	4,00 ± 1,41	27,50 ± 17,88	5,80 ± 1,57
	ns	13,42 ± 1,90	19,88 ± 4,98	12,25 ± 2,33	42,25 ± 25,10	14,60 ± 3,14
Горизонтальна активність Периферійні квадрати	Lp	8,07 ± 1,16	9,59 ± 6,05	11,58 ± 4,13	10,45 ± 3,63	4,66 ± 0,39**
	n1	67,75 ± 5,40	60,88 ± 10,54	50,00 ± 10,29	75,50 ± 24,94	60,80 ± 9,50
	n2	50,25 ± 4,04	29,00 ± 7,49	24,63 ± 5,11	54,25 ± 18,10	46,00 ± 6,64**
	ns	118,00 ± 7,31	89,88 ± 14,96	74,63 ± 12,94	129,75 ± 39,80	106,80 ± 10,22
Вертикальна активність	Lp	44,74 ± 10,13	42,10 ± 12,15	86,15 ± 46,05	104,53 ± 45,75	78,53 ± 35,51
	n1	14,58 ± 1,76	16,63 ± 2,31	12,63 ± 2,99	13,50 ± 4,86	9,90 ± 1,99*
	n2	16,75 ± 1,44	10,63 ± 2,50	11,50 ± 2,65	12,50 ± 2,33	12,10 ± 2,34
	ns	31,33 ± 2,74	27,25 ± 4,42	24,13 ± 5,11	26,00 ± 5,28	22,00 ± 4,03
	T1	41,34 ± 5,38	42,53 ± 6,75	35,51 ± 9,57	34,89 ± 12,63	25,68 ± 5,57
	T2	51,88 ± 5,13	37,96 ± 10,02	34,67 ± 7,71	40,25 ± 8,17	37,60 ± 7,49
	Ts	93,22 ± 8,83	80,48 ± 15,89	70,18 ± 15,60	75,13 ± 15,19	63,38 ± 12,45
	t1	2,83 ± 0,21	2,51 ± 0,21	2,41 ± 0,37	2,57 ± 0,40	2,28 ± 0,28
	t2	3,17 ± 0,22	3,40 ± 0,31	3,20 ± 0,27	3,19 ± 0,30	3,12 ± 0,21
	ts	2,99 ± 0,12	2,84 ± 0,22	3,02 ± 0,21	2,91 ± 0,36	2,84 ± 0,12
Емоційна активність (грумінг)	Lp	102,23 ± 13,21	60,62 ± 11,72	68,56 ± 24,00	57,39 ± 8,47	53,43 ± 8,73
	n1	3,67 ± 0,74	4,00 ± 0,42	4,63 ± 0,73	5,00 ± 1,22	4,00 ± 0,37
	n2	3,42 ± 0,62	4,00 ± 1,00	5,75 ± 0,80	4,75 ± 1,75	3,10 ± 0,74**
	ns	7,08 ± 0,99	8,00 ± 0,91	10,38 ± 1,16	9,75 ± 2,17	7,10 ± 0,50**
	T1	15,54 ± 2,53	39,99 ± 7,09	40,08 ± 9,76	33,40 ± 9,39	56,68 ± 13,35
	T2	25,45 ± 6,73	32,63 ± 11,52	88,44 ± 14,34	47,51 ± 20,30	43,81 ± 9,94**
	Ts	40,99 ± 8,08	72,62 ± 9,98	128,51 ± 16,60	80,91 ± 27,34	100,48 ± 6,28*
	t1	4,92 ± 1,00	10,22 ± 1,59	10,96 ± 3,56	6,54 ± 1,05	13,91 ± 3,03
	t2	10,41 ± 3,20	7,66 ± 2,46	16,58 ± 3,23	9,40 ± 2,60	13,54 ± 3,66
	ts	7,08 ± 1,82	9,20 ± 1,08	14,11 ± 3,24	7,50 ± 1,42	15,16 ± 1,87* / ***
Емоційна активність (болюси)	n	0 ± 0	0,63 ± 0,50	0 ± 0	0 ± 0	1,50 ± 0,81
Дослідницька активність (нірки)	Lp	202,41 ± 47,44	479,81 ± 65,74	317,20 ± 58,90	432,99 ± 129,60	517,08 ± 58,48**
	n1	1,83 ± 0,39	0,25 ± 0,16	1,00 ± 0,38	0,50 ± 0,50	0,10 ± 0,10**
	n2	1,67 ± 0,53	0,38 ± 0,18	0,50 ± 0,27	1,75 ± 1,44	0,60 ± 0,34
	ns	3,50 ± 0,68	0,63 ± 0,18	1,50 ± 0,53	2,25 ± 1,31	0,70 ± 0,33
	T1	4,91 ± 1,08	0,41 ± 0,30	1,57 ± 0,70	1,19 ± 1,19	0,06 ± 0,06**
	T2	4,19 ± 1,30	0,59 ± 0,31	0,69 ± 0,40	5,61 ± 5,00	2,05 ± 1,46
	Ts	9,09 ± 1,67	1,00 ± 0,34	2,26 ± 0,95	6,81 ± 4,68	2,11 ± 1,45
	t1	2,01 ± 0,39	0,41 ± 0,30	0,91 ± 0,32	0,60 ± 0,60	0,06 ± 0,06**
	t2	1,86 ± 0,49	0,59 ± 0,31	0,51 ± 0,27	1,34 ± 0,83	0,85 ± 0,51
	ts	2,80 ± 0,30	1,00 ± 0,34	1,21 ± 0,27	1,93 ± 0,72	0,90 ± 0,50

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

**Вірогідні відмінності при порівнянні груп (ЕАЕ) та (ЕАЕ + МСКТ), p<0,05;*

***Вірогідні відмінності при порівнянні груп (ЕАЕ+МСК) та (ЕАЕ+МСКТ), p<0,05;*

****Вірогідні відмінності при порівнянні груп (ЕАЕ + IL-10 + МСК) та (ЕАЕ + МСКТ), p<0,05.*

ЛІТЕРАТУРА

1. *Гусев Е. И.* Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания [Текст] / *Е. И. Гусев* // М.: Миклош, 2004. – 540 с.
2. *Марков Д. А.* Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике [Текст] / *Д. А. Марков* // Минск: Наука и техника, 1975. – 360 с.
3. 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.
4. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования [Текст] / *В. М. Семенова, Н. И. Лисяный, Л. П. Стайно и др.* // Український нейрохірургічний журнал. – 2014. – **№3**. – С.24–29.
5. Heterogeneity of Umbilical Cords as a Source for MSC [Електронний ресурс] [Text] / *O. O. Maslova, N. S. Shuvalova, O. M. Sukhorada., et al.* // Dataset Papers in Biology. – **Vol. 2013**. – Article ID 370103. – http://dx.doi.org/10.7167/2013/370103.
6. Фенотипові зміни і проліферативний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів пуповини людини в умовах культивування [Текст] / *В. І. Цимбалюк, О. Г. Дерябіна, Н. С. Шувалова та ін.* // Український нейрохірургічний журнал. – 2015. – **№2**. – С.17–23.
7. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC [Text] / *R. Hass, C. Kasper, St. Böhm, et. al.* // Cell Communication and Signaling. – 2011. – **Vol. 9, №12**. – P. 1–14.
8. Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF-b [Text] / *Sh. A. Patel, J. R. Meyer, St. J. Greco, et al.* // The Journal of Immunology. – 2010. – **Vol. 184**. – P. 5885–5894.
9. *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.
10. 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.
11. *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.
12. Effect of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of umbilical cord of human and interleukin-10 on the behavioral responses of rats with experimental allergic encephalomyelitis [Текст] / *V. I. Tsymbaliuk, O. M. Velichko, O. L. Pichkur, et al.* // Cell and Organ Transplantology. – 2015. – **T. 3, №1**. – С. 46–51.
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [Text] // Council of European. – Strasbourg, 1986. – **№123**. – 51 p.
14. Закон Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 №3447-IV. [Текст] // Відомості Верховної Ради України. – №27. – 2006. – С. 990.
15. *Давыдова Г. С.* Вопросы направленного моделирования аллергического энцефаломиелита [Текст] / *Г. С. Давыдова* // Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. – Минск: Наука и техника, 1975. – 360 с.
16. *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.
17. *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.
18. Клонування інтерлейкіну-10 людини (hIL-10) та дослідження пливу складу поживного середовища на його синтез у клітинах E.coli [Текст] / *О. В. Окунєв, О. Г. Паливода, Г. О. Константинова та ін.* // Збірник тез VII Міжнародної наукової конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, 5-8 квітня 2011р.). – Львів, 2011. – С. 167.

СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 22.09.2015 р.
Прийнята до друку 24.11.2015 р.