

УДК 612.818-014.3:612.017.1  
doi: 10.22494/cot.v7i1.93

# Ефекти інтерлейкіну-10 та фактора росту фібробластів-2 у мишей із токсичною купризоною моделлю демієлінізації



Лабунець І. Ф., Родніченко А. Є., Утко Н. О., Пантелеймонова Т. М., Похолєнко Я. О., Літошенко З. Л., Бутенко Г. М.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

e-mail: irina\_labunets@ukr.net

## РЕЗЮМЕ

Цитокіни і ростові фактори проявляють нейротропні, протизапальні та імуномодулюючі властивості, а тому можуть впливати на функціонування нервової системи при демієлінізуючій патології.

**МЕТА РОБОТИ:** встановити зміни у головному мозку Т-лімфоцитів, макрофагів, факторів оксидативного стресу і антиоксидантного захисту, ендокринної функції тимуса, а також поведінки у мишей, що отримували нейротоксин купризон і рекомбінантні білки людини: інтерлейкін-10 (rhIL-10) і фактор росту фібробластів-2 (rhFGF-2).

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Миші лінії 129/Sv віком 4-6 міс. отримували з їжею купризон щоденно впродовж трьох тижнів, а з 7-ї доби купризоною дієти – ін'єкції різних доз rhIL-10 і rhFGF-2. В тканині головного мозку визначали вміст CD3<sup>+</sup> Т-клітин, макрофагів, малонитратного діальдегіду, активність антиоксидантних ферментів, а в крові – рівень тимуліну. Поведінкові реакції оцінювали в тесті «відкритого поля».

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** У мишей, що отримували купризон і rhIL-10, спостерігали зменшення в головному мозку кількості CD3<sup>+</sup> Т-клітин і активності макрофагів, які суттєво зростали під впливом токсину. Після ін'єкцій цитокіну значно зростала активність супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази в головному мозку, а також рівень тимуліну в крові. Рухова, емоційна і дослідницька активність мишей, була суттєво пригнічена під дією купризону, підвищувалась після введення rhIL-10. Ефект rhIL-10 на досліджувані показники виразніший при дозі 5 мкг/кг, ніж 50 мкг/кг. Після ін'єкцій rhFGF-2 мишам із купризоною дієтою спостерігали зменшення активності макрофагів головного мозку і підвищення вмісту тимуліну в крові залежно від дози цього фактора; рухова активність таких тварин зростала незалежно від дози rhFGF-2.

**ВИСНОВКИ.** Ін'єкції rhIL-10 і rhFGF-2 викликають дозозалежні позитивні ефекти на патогенетичні фактори експериментальної демієлінізуючої патології, а також функціональний стан нервової системи. При цьому ефекти виразніші у rhIL-10.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** купризон; інтерлейкін-10; фактор росту фібробластів-2; Т-лімфоцити; макрофаги; антиоксидантні ферменти; тимулін; поведінкові реакції

На цей час у терапії демієлінізуючої патології центральної нервової системи (ЦНС) велика увага прикута до пошуку засобів, які сприяють активації та спрямованій диференціації власних нейральних стовбурових клітин (НСК) [1]. Зокрема, цитокіни і ростові фактори, як важливі складові мікрооточення для НСК головного мозку, впливають на проліферативний і диференціальний потенціал цих клітин [2, 3]. Так, інтерлейкін-10 (IL-10) є ростовим фактором для НСК субвентрикулярної зони бокових шлуночків головного мозку, функціонування яких змінюється при демієлінізуючій патології

[4-6]. Крім того, IL-10 має позитивний вплив щодо зміненого морфофункціонального стану ЦНС у тварин із деякими експериментальними моделями демієлінізації [7, 8]. У головному мозку фактор росту фібробластів (FGF-2) проявляє властивості мітогенного фактора для НСК, інгібує апоптоз нейронів і сприяє ремієлінізації шляхом активації попередників олігодендроцитів [9, 10].

При демієлінізуючій патології ЦНС встановлено зміни регенераторного потенціалу НСК і функціонального стану нервової системи, а також зв'язок цих процесів із ушкоджуючим впливом на систему

факторів оксидативного стресу, активованої мікроглії, макрофагів і Т-лімфоцитів [11, 12]. При цьому у тварин із моделлю експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) інтерлейкін-10 проявляє виражені протизапальні властивості, впливає на кількість Т-лімфоцитів і нейтрофілів у периферичній крові [13, 14]. На цій моделі також показано вплив FGF-2 на прояви нейрозапалення через зменшення функціональної активності мікроглії головного мозку та інфільтрації органу CD8<sup>+</sup> Т-клітинами [9, 10, 15].

Водночас, залишаються практично не дослідженими зміни в головному мозку Т-лімфоцитів, макрофагів, факторів оксидативного стресу, а також функціонування ЦНС за умов введення IL-10 і FGF-2 мишам із токсичною купризоною моделлю демієлінізації. Цю модель широко використовують для експериментального дослідження патогенезу демієлінізації та ремієлінізації, механізмів змін поведінкових реакцій [16, 17]. Оскільки активність Т-лімфоцитів і макрофагів контролюється гормонами тимуса, виникає також інтерес вивчення на купризонній моделі демієлінізації впливу IL-10 і FGF-2 на ендокринну функцію тимуса, яка змінюється у мишей із купризоною дієтою [12, 18].

Із літератури відома залежність ефектів цитокінів і ростових факторів в організмі, зокрема, IL-10 та FGF-2, від їх концентрації [4, 19, 20]. Тому дослідження впливу різних доз IL-10 та FGF-2 на патогенетичні фактори демієлінізації та функціонування нервової системи важливі для обґрунтування схем терапії даної патології.

**МЕТА РОБОТИ:** встановити зміни у головному мозку Т-лімфоцитів, макрофагів, балансу факторів оксидативного стресу і антиоксидантного захисту, функції тимуса та поведінкових реакцій у мишей із токсичною моделлю демієлінізації за умов введення різних доз IL-10 і FGF-2.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

**Тварини.** Досліди проводили на мишах-самцях лінії 129/Sv віком 4-6 міс. із розплідника ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Миші знаходилися у стандартних умовах віварію при фіксованому світловому режимі 12:12 год. Матеріал для дослідження отримували від тварин після евтаназії шляхом декапітації під ефірним наркозом. Всі експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою».

**Моделі.** Як експериментальну модель демієлінізації використовували токсичну купризонову модель, детальна характеристика якої наведена раніше [12, 17]. Для відтворення купризонової моделі демієлінізації мишам давали нейротоксин купризон (*Sigma*, США) з їжею (0,2 % від добового корму) щоденно впродовж трьох тижнів. Група інтактних тварин знаходилась на звичайному раціоні віварію.

**Рекомбінантні білки людини.** В роботі використовували рекомбінантний інтерлейкін-10 людини (rhIL-10) і рекомбінантний фактор росту фіброblastів людини (rhFGF-2). Їх отримували шляхом синтезу в клітинах відповідних штамів-продуцентів *E.coli* згідно стандартної методики [21]. Після лізису бактеріальних клітин цільові білки очищали із застосуванням іонообмінної та афінної хроматографії. Вміст rhIL-10 в лізаті клітин *E.coli* та хроматографічних фракціях оцінювали методом денситометрії електрофорезом з наступним аналізом за допомогою програмного забезпечення «Total Lab» (США). Активність rhFGF-2 визначали в тесті стимуляції ангиогенезу в хоріоналантоїдній мембрані курячих ембріонів.

**Схеми використання rhIL-10 і rhFGF-2.** Починаючи з 7-ї доби прийому купризону, мишам внутрішньоочеревинно вводили rhIL-10 у разових дозах 5,0 мкг/кг і 50,0 мкг/кг у 100 мкл фосфатного буфера, всього 3 ін'єкції, з інтервалом у 3 доби; або rhFGF-2 у разовій дозі 20 мкг/кг та різній тривалості введення (всього 7 і 10 ін'єкцій, з інтервалом у 24 год). Контрольні групи тварин отримували ку-

призон та ін'єкції розчинника за аналогічними схемами. Введення рекомбінантних білків із 7-ї доби купризонової дієти пояснюється розвитком вже в цей період апоптозу олігодендроцитів [3], а також суттєвим зниженням рухової активності мишей [17].

**Експериментальні групи:** інтактні миші (звичайний раціон); прийом купризону та ін'єкції розчинника (контрольні групи); купризон та ін'єкції rhIL-10 у дозах 5,0 мкг/кг і 50 мкг/кг (три введення); купризон та ін'єкції rhFGF-2 у дозі 20 мкг/кг, 7 і 10 введення.

**При фенотипуванні клітин головного мозку** за маркером CD3 використовували мічені фікоеритрином моноклональні антитіла згідно з рекомендаціями фірми-виробника (Becton Dickinson, США). Гомогенат головного мозку фіксували впродовж 10 хв при кімнатній температурі 4 % розчином параформальдегіду на 0,1 М фосфатно-сольовому буфері з рН 7,4. Пермеабілізацію клітин проводили впродовж 15 хв буфером Perm/Wash (*Becton Dickinson*, США). До гомогенату головного мозку ( $2 \cdot 10^5$  клітин в 50 мкл) додавали моноклональні антитіла у розведенні 1:50 (0,5 мкг/10<sup>6</sup> клітин). Вимірювання проводили на лазерному проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria за допомогою програми BD FACS Diva 6.1 (*Becton Dickinson*, США).

**Функціональна активність макрофагів.** Головний мозок гомогенізували в розчині фосфатно-сольового буфера і вносили до чашок Петрі діаметром 100 мм (*Sarstedt*, Німеччина) у ростовому середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 2 мМ L-глутаміну та пеніциліном і стрептоміцином (всі реактиви – *Sigma*, США). Суспензію клітин культивували при +37 °С у зволоженої атмосфері з концентрацією CO<sub>2</sub> 5 % протягом години. Потім клітини, що адгезувалися до пластику, знімали за допомогою суміші розчинів 0,25 % трипсину та 0,02 % версену (1:5). Коли клітини повністю відстали від субстрату, додавали 10 % ембріональної телячої сироватки для інгібування дії трипсину та ретельно ресуспендували. Після підрахунку клітин у камері Горяєва 0,2 мл клітинної суспензії нашаровували на покривні скельця (2,5•10<sup>6</sup> клітин/мл) та інкубували протягом 60 хв у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> при +37 °С. Після інкубації на отриманий моношар наносили 0,2 мл суспензії латексу у середовищі RPMI-1640 (*Sigma*, США) з концентрацією 2,5•10<sup>8</sup> часточок/мл та інкубували 45 хв у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> при +37 °С. Після інкубації скельця фіксували у парах 4 % параформальдегіду та фарбували за Романовским-Гімза. У світловому мікроскопі підраховували не менш 200 макрофагів і визначали фагоцитарний індекс – відносну кількість клітин, здатних до фагоцитозу часточок латексу; та фагоцитарне число – кількість часточок латексу, які поглинулися одним макрофагом.

**Ендокринну функцію тимуса** визначали за вмістом у сироватці крові гормону тимуліну (log<sub>2</sub> титру) [22].

**Фактори оксидативного стресу та антиоксидантного захисту.** Вміст малонового діальдегіду (МДА) у головному мозку мишей оцінювали по інтенсивності кольору триметинового комплексу, який утворюється між МДА і тіобарбітуровою кислотою (*Sigma-Aldrich*, Німеччина), та виражали у нмоль/мг [23]. Активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази визначали в супернатантах гомогенатів головного мозку тварин [24]. Для визначення активності СОД використовували метод, заснований на здатності ферменту пригнічувати реакцію аутоокиснення адреналіну (*Sigma-Aldrich*, Німеччина) в адренохром при рН = 10,2. Активність СОД виражали в умовних одиницях із розрахунку на 1 мг білка за 1 хв (од/хв•мг). Активність каталази визначали з кінетики руйнування H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Riedel-deHaën*, Німеччина) і виражали в мкмоль утилізованої H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 1 мг білка за 1 хв (мкмоль/хв•мг). Вміст білку в органі вимірювали за методом Лоурі, який базується на реакції білків з лужним розчином міді. Отримана субстанція відновлюється реагентом Folin (*Sigma-Aldrich*, Німеччина), що супроводжується зміною забарвлення у блакитний колір. Усі вимірювання здійснювали на спектрофотометрі  $\mu$ Quant (*Bio-Tek*, США).

**Поведінкові реакції досліджували** в тесті «відкритого поля», який дає можливість оцінити у тварин рухову, емоційну і дослідницьку

активність [25]. Горизонтальну рухову активність досліджували по кількості перетнутих квадратів, емоційну – по кількості болюсів, дослідницьку – по кількості вертикальних стійок і заглядань у «нірки» (норковий рефлекс). Показники поведінки у мишей експериментальних груп реєстрували впродовж 3 хв.

**Статистичний аналіз** результатів проводили за допомогою t-критерія Стьюдента. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного та помилки середнього ( $M \pm m$ ). Різницю між досліджуваними показниками вважали достовірно вірогідною при значенні  $p < 0,05$ . Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували програму Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Вплив різних доз rhIL-10 на макрофаги, Т-лімфоцити, фактори оксидативного стресу і антиоксидантного захисту головного мозку та функцію тимуса у мишей із купризоною моделлю демієлінізації.**

Встановлено, що після прийому купризону у головному мозку мишей суттєво зростає кількість Т-лімфоцитів, активних макрофагів, а також вміст МДА (рис. 1, 2). Після введення rhIL-10 у дозі 5,0 мкг/кг кількість Т-лімфоцитів і активність макрофагів зменшується, тоді як активність СОД, каталази і вміст в крові тимуліну підвищується (рис. 1, 2). RhIL-10 у дозі 50,0 мкг/кг чинить ще більш виразний пригнічуючий вплив на кількість Т-клітин у головному мозку, а також підвищує вміст тимічного гормону в крові (рис. 1). Значення всіх інших досліджуваних показників після введення цитокіну у дозі 50,0 мкг/кг не відрізняються від тих, що були в контрольній групі з купризоном (рис. 1, 2).

Отже, ефект rhIL-10 на Т-лімфоцити, макрофаги і антиоксидантні ферменти головного мозку мишей із купризоною дією залежить від його дози. При цьому позитивні зміни більшості досліджуваних показників спостерігаються при дозі цитокіну 5,0 мкг/кг.

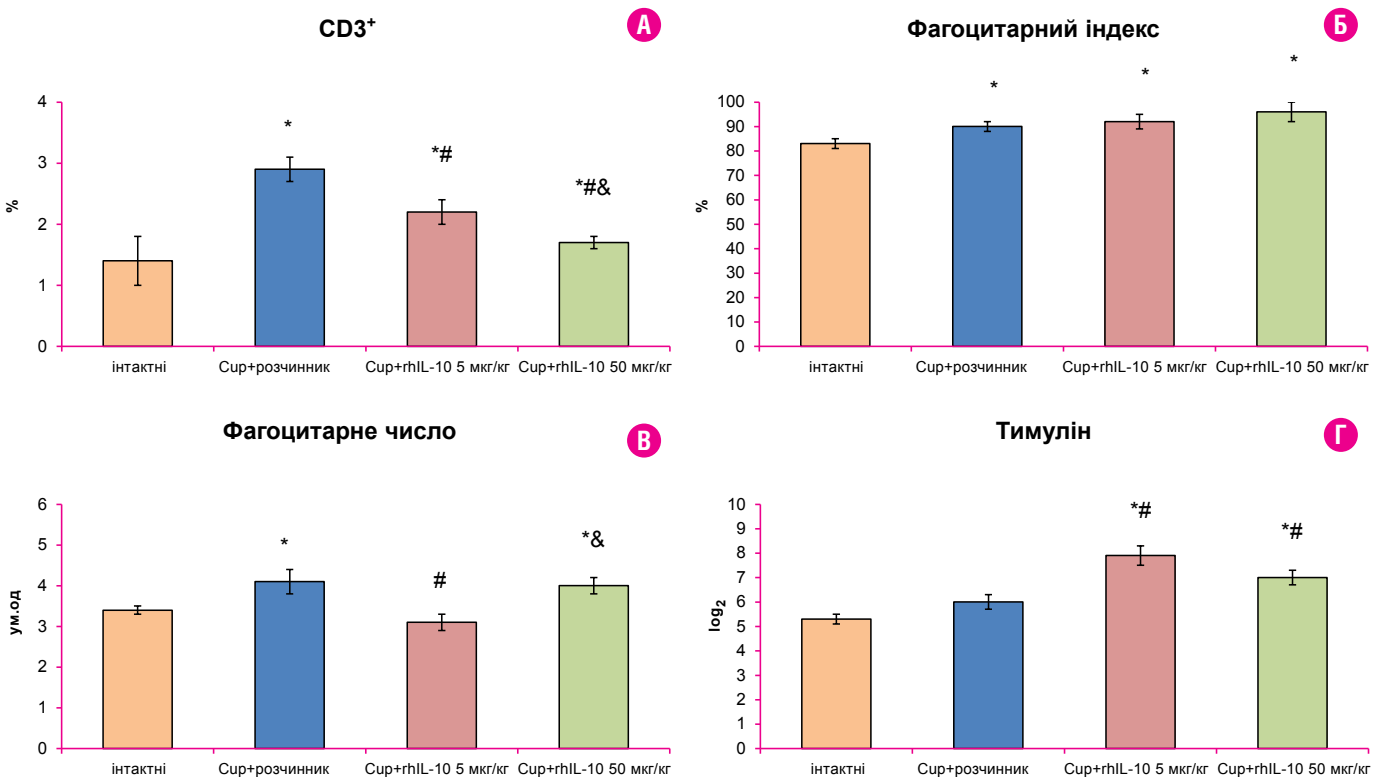
**Вплив різних доз rhIL-10 на поведінкові реакції у мишей із купризоною моделлю демієлінізації.**

Встановлено, що прийом купризону призводить до суттєво зменшення значень показників рухової, емоційної та дослідницької активності мишей (рис. 3). Після ін'єкцій rhIL-10 у дозі 5,0 мкг/кг значення досліджуваних показників суттєво зростають, причому кількість болюсів і вертикальний стійок – до рівня інтактних мишей (рис. 3). Ефект rhIL-10 у дозі 50,0 мкг/кг був аналогічним щодо змін показників поведінкових реакцій, за виключенням кількості вертикальних стійок.

Тобто, незалежно від дози, ін'єкції rhIL-10 поліпшують рухову та емоційну активність тварин, порушену прийомом купризону. Проте у дозі 5,0 мкг/кг цитокіну виявився більш ефективним щодо покращення дослідницької діяльності тварин із купризоною моделлю демієлінізації.

**Макрофаги, Т-лімфоцити, фактори оксидативного стресу і антиоксидантного захисту головного мозку, функція тимуса у мишей, які отримували купризон і різні дози rhFGF-2.**

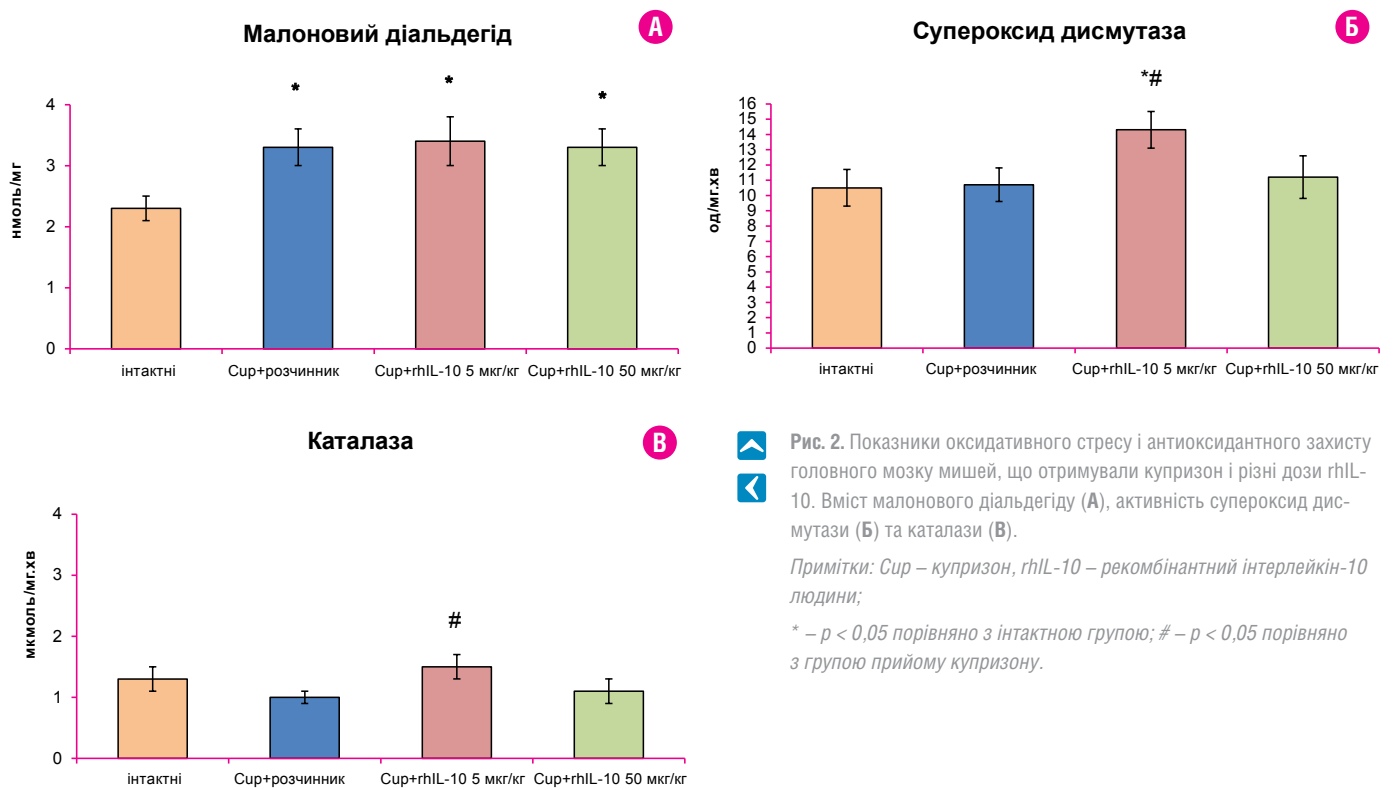
Встановлено, що у тварин із купризоною дією, яким вводили rhFGF-2 у дозі 20 мкг/кг (7 ін'єкцій), спостерігаються зміни тільки клітинних і гуморальних факторів імунної системи, а саме: суттєво зменшується активність макрофагів головного мозку та зростає вміст у крові тимуліну (табл. 1). Ростовий фактор у дозі 20 мкг/кг (10 ін'єкцій) викликає підвищення вмісту в крові тимічного гормону. При цьому у таких тварин активність макрофагів і кількість Т-лімфоцитів у головному мозку залишаються підвищеними (табл. 1).



**Рис. 1.** Відносний вміст CD3<sup>+</sup> клітин (А), фагоцитарна активність макрофагів (Б, В) у головному мозку, а також вміст тимуліну (Г) в крові мишей, що отримували купризон і різні дози rhIL-10.

Примітки: Суп – купризон, rhIL-10 – рекомбінантний інтерлейкін-10 людини;

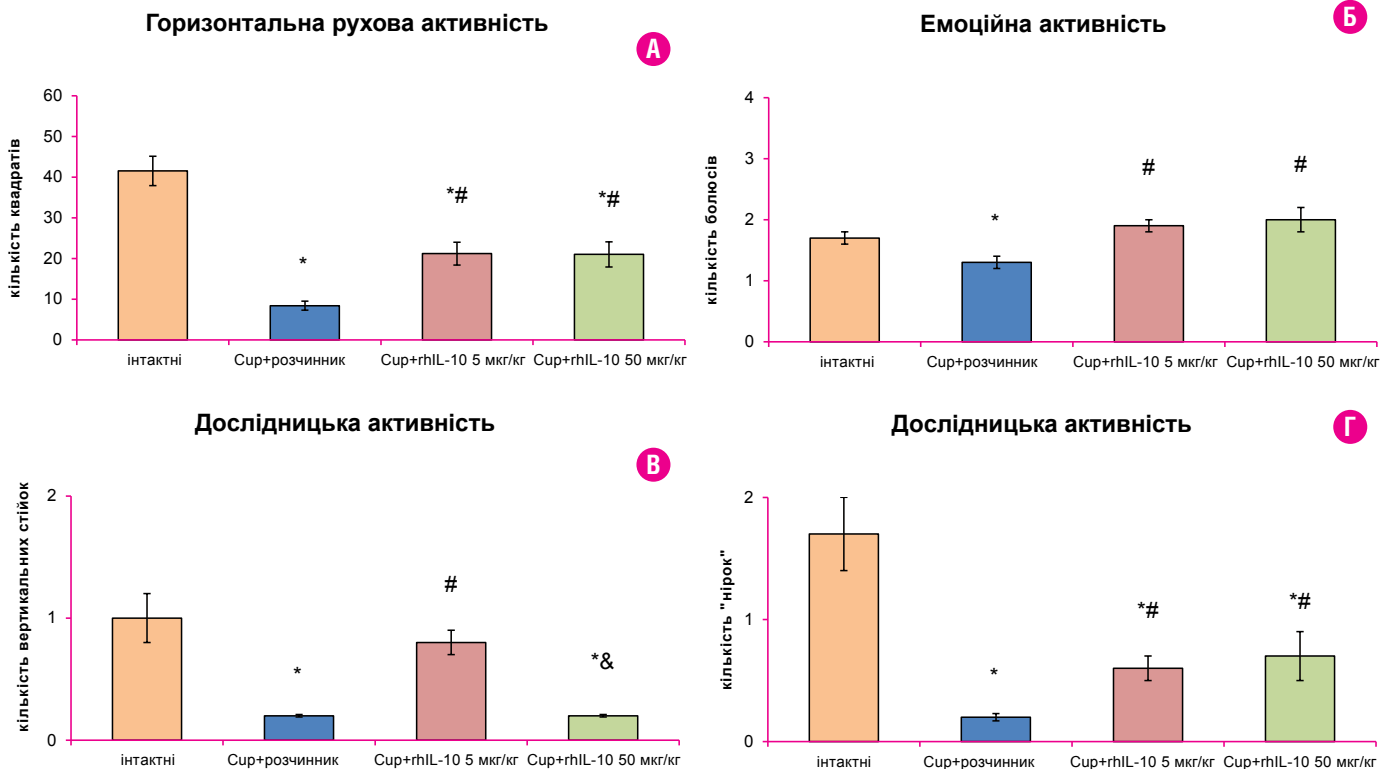
\* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактною групою; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою прийому купризону; & –  $p < 0,05$  порівняно з дозою rhIL-10 5 мкг/кг.



**Рис. 2.** Показники оксидативного стресу і антиоксидантного захисту головного мозку мишей, що отримували купризон і різні дози rhIL-10. Вміст малонового діальдегіду (А), активність супероксид дисмутази (Б) та каталази (В).

Примітки: Сур – купризон, rhIL-10 – рекомбінантний інтерлейкін-10 людини;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактною групою; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою прийому купризону.



**Рис. 3.** Показники поведінкових реакцій у мишей експериментальних груп в тесті «відкритого поля»: горизонтальна рухова активність (А), емоційна активність (Б), дослідницька активність (В, Г).

Примітки: Сур – купризон, rhIL-10 – рекомбінантний інтерлейкін-10 людини;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактною групою; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою прийому купризону; & –  $p < 0,05$  порівняно з дозою rhIL-10 5 мкг/кг.

Тобто, у мишей із купризоною дією rhFGF-2 проявляє дозозалежний ефект на активність макрофагів головного мозку і функцію тимуса.

**Поведінкові реакції у мишей, які отримували купризон і різні дози rhFGF-2.**

Встановлено суттєве підвищення горизонтальної рухової активності у мишей, що отримували купризон разом з ін'єкціями різних доз rhFGF-2 (табл. 2). Але при цьому рухова активність мишей залишалась все-таки меншою, ніж у тварин інтактної групи ( $p < 0,05$ ). Значення показників емоційної та дослідницької активності не відрізнялись між експериментальними групами. Отже, незалежно від використаної дози, ін'єкції rhFGF-2 поліпшують рухову активність мишей із купризоною моделлю демієлінізації.

Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що rhIL-10 і rhFGF-2 впливають на досліджені патогенетичні фактори демієлінізуючої патології, спричиненої нейротоксином купризоном, а також змінений функціональний стан ЦНС. Ефект rhIL-10 і rhFGF-2 має дозозалежний характер.

Із даних літератури відомо, що виражені протизапальні властивості IL-10 при такій експериментальній демієлінізуючій патології ЦНС як ЕАЕ пов'язані зі зменшенням у головному мозку експресії та синтезу прозапальних цитокінів (тумор-некротичний фактор TNF- $\alpha$ , інтерферон- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6), активності клітин мікроглії/макрофагів і Т-хелперів 1 типу [26, 27].

На купризоновій моделі демієлінізації нами показано пригнічуючий ефект rhIL-10 на кількість Т-лімфоцитів і активність макрофагів головного мозку. Є також важливим посилення ендокринної функції тимуса у таких мишей, що можна пояснити зниженням синтезу кортикостерону в надниркових залозах під впливом цитокіну [28]. Із літератури відомо про регулюючу дію тимуліну на активність макрофагів, диференціювання і функціонування Т-лімфоцитів [18]. У тварин із моделлю нейрозапалення показано стимулюючий вплив цього гормону на синтез у головному мозку IL-10 на тлі пригнічення синтезу TNF- $\alpha$  і IL-1 $\beta$  [29]. Доведено, що макрофаги і Т-лімфоцити є джерелом прозапальних цитокінів і активних форм кисню, які ушкоджують нервові клітини головного мозку [3, 11, 30].

Зростання активності антиоксидантних ферментів у головному мозку мишей, що отримували купризон разом із rhIL-10, є підтвердженням посилення у таких тварин антиоксидантного захисту органу. Дослідженнями Lattorre і співавторів [19] також показана можливість активуючого впливу IL-10 на антиоксидантні ферменти клітин організму за умов дії прооксидантних ушкоджуючих факторів.

Важливо, що після ін'єкцій rhIL-10 зміни у головному мозку кількості Т-лімфоцитів, макрофагів і активності антиоксидантних ферментів, а також вмісту тимуліну в крові співпадають із поліпшенням пригнічених купризоном поведінкових реакцій. Позитивні зміни функціонального стану ЦНС, спричинені rhIL-10, свідчать про участь факторів імунної системи та антиоксидантного захисту в їх формуванні.

Разом з тим, звертає на себе увагу дозозалежний ефект rhIL-10 на показники імунної системи, антиоксидантного захисту та поведінки у мишей із купризоною моделлю демієлінізації; при цьому більш дієвою була доза 5,0 мкг/кг. Навпаки, у відновленні структури нейронів ЦНС таких мишей більш ефективно виявилась доза rhIL-10 50,0 мкг/кг [8]. Неоднакові результати впливу різних доз rhIL-10 на структуру ЦНС можна частково пояснити залученням за таких умов різних шляхів його реалізації. Так, результати позитивних змін поведінкових реакцій після введення меншої дози rhIL-10 на тлі невиражених структурних змін нейронів ЦНС узгоджуються з припущенням Serra-de-Oliveira та співав. щодо важливості змін факторів нейрозапалення в патогенезі не тільки пригнічення функціонального стану нервової системи при демієлінізуючій патології, але й його відновлення [31]. В той же час, після введення більшої дози rhIL-10 ми спостерігали суттєві морфофункціональні позитивні зміни ЦНС, проте на тлі менш виражених змін факторів нейрозапалення порівняно з меншою дозою цитокіну. Не виключено, що у таких мишей зміни структури нейронів пояснюються активуючим впливом rhIL-10 на синтез нейротрофічних факторів у головному мозку. Авторами показано, що IL-10 забезпечує виживаність ушкоджених нейронів ЦНС шляхом активації синтезу нейротрофічних факторів гліальними клітинами [32, 33].

Щодо властивостей FGF-2 відомо, що він є мультифункціональним ростовим фактором із вираженими ефектами на ангиогенез і функціонування НСК у основних зонах нейрогенезу [10]. При цьому дані літератури щодо змін нейрогенезу і мієлогенезу під впливом FGF-2 неоднозначні, а саме спостерігалась як активація цих процесів, так і їх пригнічення [9, 34]. В нашому експерименті ми спостерігали суттєве зростання рухової активності у мишей, які отримували купризон разом із rhFGF-2. За нашими попередніми результатами, у мишей, які отримали 7 ін'єкцій ростового фактора одночасно зростала (у 1,5 рази) кількість незмінених нейронів у корі головного мозку, що дає нам можливість оцінити ефект rhFGF-2 у таких мишей як нейропротекторний.

Із літератури відомо, що одним із можливих шляхів протекторного ефекту FGF-2 при демієлінізуючій патології є зміна кількості та/або активності клітин, залучених у процеси нейрозапалення [10]. При

**Таблиця 1.** Відносний вміст CD3<sup>+</sup> клітин, активність макрофагів, показники оксидативного стресу і антиоксидантного захисту в головному мозку, а також вміст тимуліну в крові мишей експериментальних груп, M  $\pm$  m.

ПОКАЗНИК	ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ГРУПА			
	ІНТАКТНІ	КУПРИЗОН + РОЗЧИННИК	КУПРИЗОН + rhFGF-2 20 МКГ/КГ, (7 ІН'ЄКЦІЙ)	КУПРИЗОН + rhFGF-2 20,0 МКГ/КГ, (10 ІН'ЄКЦІЙ)
CD3 <sup>+</sup> , %	1,9 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1*	2,8 $\pm$ 0,2*	3,5 $\pm$ 0,5*
Фагоцитарний індекс, %	80,2 $\pm$ 2,1	87,3 $\pm$ 2,4*	88,1 $\pm$ 2,3*	90,2 $\pm$ 3,1*
Фагоцитарне число, ум. од.	3,4 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,3*	3,0 $\pm$ 0,2#	3,8 $\pm$ 0,1*
Тимулін, log2	5,7 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,2*#	7,0 $\pm$ 0,3*
Малоновий діальдегід (нмоль/мг)	2,8 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2*	3,5 $\pm$ 0,2*	3,3 $\pm$ 0,1*
Супероксиддисмутаза (од/мг•хв)	11,6 $\pm$ 1,2	11,4 $\pm$ 1,4	10,5 $\pm$ 1,8	10,2 $\pm$ 1,6
Каталаза (мкмоль/мг•хв)	1,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2

Примітки: rhFGF-2 – рекомбінантний фактор росту фібробластів людини;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактною групою; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою прийому купризону.

Таблиця 2. Показники поведінкових реакцій у мишей експериментальних груп в тесті «відкритого поля», М ± m

ПОКАЗНИК	ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ГРУПА			
	ІНТАКТНІ	КУПРИЗОН + РОЗЧИННИК	КУПРИЗОН + rhFGF-2 20 МКГ/КГ, (7 ІН'ЄКЦІЙ)	КУПРИЗОН + rhFGF-2 20,0 МКГ/КГ, (10 ІН'ЄКЦІЙ)
Кількість квадратів	40,8 ± 3,4	17,0 ± 1,5*	28,1 ± 3,1*#	30,0 ± 3,2*#
Кількість болюсів	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1*	1,3 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*
Кількість стійок	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,02*	0,3 ± 0,01*	0,3 ± 0,03*
Кількість "нірок"	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*

Примітки: rhFGF-2 – рекомбінантний фактор росту фібробластів людини;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактною групою; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою прийому купризону.

цьому FGF-2 впливає на клітини мікроглії/макрофаги головного мозку через поверхневий глікопротеїн CD200, який регулює активацію цих клітин [9]. На думку Gudi та співавторів, FGF-2 посилює мієлінізацію шляхом як прямої дії на олігодендроцити, так і опосередковано, через інші типи клітин, які її пригнічують (астроцити, клітини мікроглії) [3]. Наші результати щодо падіння активності макрофагів головного мозку після ін'єкцій rhFGF-2 мишам із купризоною дією підтверджують думку цих авторів.

Разом з тим, ми не спостерігали зменшення кількості Т-клітин у головному мозку мишей, які отримували купризон разом із rhFGF-2, хоча іншими авторами виявлено такий ефект у тварин з ЕАЕ [9]. Більш того, кількість Т-лімфоцитів у головному мозку мишей із купризоною дією після десяти ін'єкцій rhFGF-2 стала навіть більше в 1,4 рази, ніж у мишей контрольної групи. Результати свідчать про важливість реалізації ефектів rhFGF-2, як і rhIL-10, залежно від їх курсової дози при демієлінізуючій патології ЦНС. Можливо, саме з використанням різних доз FGF-2 при цій патології пов'язана розбіжність у результатах дослідників щодо напрямку його впливу на мієлогенез.

Оскільки, за даними літератури, FGF-2 і IL-10 впливають на мієло- і нейрогенез, а їх експресія у головному мозку поетапно посилюється при відтворенні купризонової моделі демієлінізації [3], ми порівняли отримані ефекти rhIL-10 і rhFGF-2 у мишей із купризоною дією. Таке порівняння дозволило нам встановити як загальні риси їх дії, так і відмінності. Загальною рисою ефектів rhIL-10 і rhFGF-2 на тлі прийому купризону є позитивні зміни активності макрофагів у головному мозку, вмісту тимуліну в крові та рухової активності тварин. При цьому rhIL-10 виявився також ефективним щодо змін кількості Т-лімфоцитів і стану антиоксидантного захисту головного мозку. Наші результати поглиблюють уявлення щодо ролі протизапальних цитокінів (IL-10) і ростових факторів (FGF-2) в патогенезі демієлінізуючої патології ЦНС. Факт дозозалежного впливу rhIL-10 і rhFGF-2 при цій патології може мати значення при обґрунтуванні підходів до її терапії. Зокрема, аналогічний ефект на змінені показники, а в ряді випадків і більш виражений, можна отримати при використанні меншої курсової дози цитокіну та ростового фактора.

## ВИСНОВКИ

1. *Ін'єкції rhIL-10 мишам із купризоною моделлю демієлінізації проявляють дозозалежний ефект на зміни кількості Т-лімфоцитів, активності макрофагів і антиоксидантних ферментів у головному мозку, а також вмісту в крові тимуліну.*
2. *Рекомбінантний IL-10 людини покращує рухову та емоційну активність мишей, яка була пригнічена прийомом купризону. Зростання дослідницької діяльності у таких тварин залежало від дози цитокіну.*
3. *У мишей із купризоною дією ін'єкції rhFGF-2 викликають позитивні зміни активності макрофагів головного мозку, вмісту тимуліну в крові та рухової активності. Ефект даного ростового фактора на активність макрофагів головного мозку і вміст тимуліну в крові залежить від його дози.*
4. *Більш ефективні зміни досліджуваних показників у експериментальних мишей при використанні менших доз rhIL-10 і rhFGF-2 свідчать про важливість врахування дозозалежного впливу цих клітинних факторів при обґрунтуванні підходів до терапії демієлінізуючої патології.*

## СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Huang L., Wang G. The effects of different factors on the behavior of neural stem cells. Stem cells international. 2017. **2017**. 16 p. Article ID9497325, <https://doi.org/10.1155/2017/9497325>.
2. Huang Y., Dreyfus C. F. The role of growth factors as a therapeutic approach to demyelinating disease. Exp Neurol. 2016. **283** (ptB). P. 531-540. DOI:10.1016/j.exp.neurol.2016.02.023.
3. Gudi V., Gingele S., Skripuletz Th., Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. Front Cell Neurosci. 2014. **8** (Article 73). 24 p. DOI: 10.3389/fncel.2014.00073.
4. Perez-Asensio F. J., Perpiñá U., Planas A. M., Pozas E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. J Cell Sci. 2013. **126**. P. 4208-4219. DOI: 10.1242/jcs.127803.
5. Guglielmetti C., Praet J., Rangarajan J.R., Vreys R., DeVocht N., Maes F., et al. Multimodal imaging of subventricular zone neural stem/progenitor cells in the cuprizone mouse model reveals increased neurogenic potential for the olfactory bulb pathway, but no contribution to remyelination of the corpus callosum. Neuroimage. 2014. **1**, № 86. P. 99-110. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2013.07.080.

6. *Labunets I., Rodnichenko A., Melnyk N., Utko N.* Neuroprotective effect of melatonin in mice with toxic cuprizone model of demyelination and possible pathways of its realization. *Cell and Organ Transplantation*. 2018. **6**, № 2. P. 145-151. DOI:10.22494/cot.v6i2.87.
7. *Пічкур Л. Д., Вербовська С. А., Васлович В. В., Акінола С. Т., Дерябіна О. Г., Похолоenko Я. О. та ін.* Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та інтерлейкіну-10 на перебіг алергійного енцефаломієліту. *Український неврологічний журнал*. 2018. № 1. С. 56-63.
8. *Лабунець І. Ф., Мельник Н. О., Родніченко А. Є., Похолоenko Я. О.* Вплив рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини на структуру нейронів центральної нервової системи та поведінкові реакції у мишей із купризоною моделлю розсіяного склерозу. Тези доповідей Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (9-10 листопада 2017 р., Київ, Україна). *Клітинна та органна трансплантація*. Додаток 2017. **5**. № 2. С. 240-241.
9. *Rottlaender A., Villwock H., Addicks K., Kuerten S.* Neuroprotective role of fibroblast growth factor-2 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. 2011. **133**. P. 370-378. DOI:10.1111/j.1365-2567.2011.03450.x.
10. *Woodbury M. E., Ikezu T.* Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014. **9**, № 2. P. 92-101. DOI:10.1007/s11481-013-9501-5.
11. *Абдурасулова И. Н., Клименко В. М.* Роль иммунных и глиальных клеток в процессах нейродегенерации. *Мед академ журнал*. 2011. **11**, № 1. С. 12-29.
12. *Лабунець І. Ф.* Изменения эндокринной функции тимуса, макрофагов и Т-лимфоцитов головного мозга у мышей разного возраста после введения нейротоксина купризонина и цитокина. *Международ неврол журн*. 2018. **4**, № 98. С. 155-161. DOI:10.22141/2224-0713.4.98.2018.139434.
13. *Руденко В. А., Гнедкова І. О., Пічкур Л. Д., Вербовська С. А., Похолоenko Я. О.* Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та IL-10 на показники клітинного імунітету у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом. *Зб.наук.праць спів роб. НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2014. **23**, № 2. С. 434-441.
14. *Meng J., Ni J., Wu Z., Jiang M., Zhu A., Qing H., et al.* The Critical Role of IL-10 in the Antineuroinflammatory and Antioxidative Effects of Rheum tanguticum on Activated Microglia *Oxid Med Cell Longev*. 2018. **6**. P. 1-12. DOI: 10.1155/2018/1083596.
15. *Noda M., Takii K., Parajuli B., Kawanokuchi J., Sonobe Y., Takeuchi H., et al.* FGF-2 released from degenerating neurons exerts microglial-induced neuroprotection via FGFR3-ERK signaling pathway. *J Neuroinflammation*. 2014. **11**. P. 76. DOI: 10.1186/1742-2094-11-76.
16. *Praet J., Guglielmetti C., Berneman Z., Van der Linden A., Ponsaerts P.* Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *J Neubiorev*. 2014. **47**. P. 485-505. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.004.
17. *Лабунець І. Ф.* Можливості та перспективи використання токсичної купризонової моделі демієлінізації *in vivo* та *in vitro* в експериментальній і клінічній неврології (огляд літератури та власні дослідження). *Український неврологічний журнал*. 2018. № 2. С. 63-68. ISSN 1998-4235 (print), ISSN 2522-1183 (online); DOI: <https://doi.org/10.30978/UNZ2018263>.
18. *Csaba G.* The immunoendocrine thymus as a pacemaker of lifespan. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016. **63**, № 2. P. 139-158. DOI: 10.1556/030.63.2016.2.1.
19. *Latorre E., Matheus N., Layunta E., Alcalde A. I., Mesonero J. E.* IL-10 counteracts proinflammatory mediator evoked oxidative stress in Caco-2 cells. *Mediators of Inflammation*. 2014. **2014**. Article ID 982639. 6p. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/98>.
20. *Shim K. Y., Saima F. T., Eom Y. W.* High Dose of FGF-2 Induced Growth Retardation via ERK1/2 De-phosphorylation in Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Sci Letters*. 2017. **23**. P. 49-56. URL: <https://doi.org/10.15616/BSL.2017.23.2.49/>.
21. *The Protein Protocols Handbook / Ed. J.M. Walker.* Totowa, 2002. 1139 p.
22. *Лабунець І. Ф., Родніченко А. Е., Васильев П. Г.* Способность клеток-предшественниц гранулоцитов и макрофагов костного мозга мышей разных линий к образованию колоний *in vitro* при изменении содержания тимулина в организме и в культуре клеток. *Гены & клетки*. 2017. **12**, № 2. С. 97-103. DOI: 10.23868/201707021.
23. *Uchiyama M., Mihara M.* Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978. **86**, № 1. P. 271-278.
24. *Labunets I. F., Talanov S. A., Vasilyev R. G., Rodnichenko A. E., Utko N. A., Kuzminova I. A. et al.* Thymic hormones, antioxidant enzymes and neurogenesis of bulbus olfactorius in rats with parkinsonism: the effect of melatonin. *Int J Phys Pathophys*. 2016. **7**, № 4. P. 285-298. DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v7.i4.10.
25. *Амикишиева А. В.* Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование. *Вестник ВОГиС*. 2009. **13**, № 3. С. 529-542.
26. *Strle K., Zhou J. H., Shen W. H., Broussard S. R., Johnson R.W., Found G. G., et al.* Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001. **21**, № 5. P. 427-449. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v21.i5.20.
27. *Klose J., Schmidt N. O., Melms A., Dohi M., Miyazaki J., Bischof F.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. *J Neuroinflammation*. 2013. **10**. P. 117. DOI: 10.1186/1742-2094-10-117.
28. *Koldric-Zivanovic N., Tu H., Juelich T. L., Rady P. L., Tying S. K., Hudnall S. D., et al.* Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: a preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zone fasciculata. *Brain Behav Immun*. 2006. **20**, № 5. P. 460-468. DOI: 10.1016/j.bbi.2005.09.003.
29. *Haddad J. J., Hanbali L. H.* The anti-inflammatory and immunomodulatory activity of thymulin peptide is NF- $\kappa$ B dependent and involves the downregulation of I  $\kappa$ B- $\alpha$ . *Am J Med Biol Res*. 2013. **1**, № 2. P. 41-49. DOI:10.12691/ajmbr-1-2-2.
30. *Kang Z., Liu L., Spangler R., Spear C., Wang C., Gulen M.F., et al.* IL-17-induced Act1-mediated signaling is critical for cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*. 2012. **32**, № 4. P. 8284-8292. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0841-12.2012.
31. *Serra-de-Oliveira N., Boilesen S. N., Prado de Franca Carvalho C., Lesueur-maluf L., Zollner R., Spadari R. C., et al.* Behavioural changes observed in demyelination model shares similarities with white matter abnormalities in humans. *Behav Brain Res*. 2015. **287**. P. 265-275. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.03.038.
32. *Лісняний М. І.* Подвійна роль мікроглії в патогенезі розсіяного склерозу. *Український неврологічний журнал*. 2018. № 3-4. С. 5-10. DOI: <http://doi.org/10.3978/UNJ2018-3-5>.
33. *Brodie C.* Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett*. 1996. **394**. P. 117-120.
34. *Furusko M., Roulois A. J., Franklin R. J., Bansal R.* Fibroblast growth factor signaling in oligodendrocyte-lineage cells facilitates recovery of chronically demyelinated lesions but is redundant in acute lesions. *Glia*. 2015. **63**, № 10. P. 1714-1728. DOI:10.1002/glia.22838.



СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 04.03.2019 р.

Прийнята до друку 31.05.2019 р.