

УДК612.017.1: 616.-092.9.

ВПЛИВ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ В ЩУРІВ

ЛІСЯНИЙ М.І. БЕЛЬСЬКА Л.М. ГНЕДКОВА І.О. СТАНЕЦЬКА Д.М.

Відділ нейроімунології ДУ «Інститут нейрохірургії» НАМАУ

На сьогодні добре вивчені мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), це мультипотентні стовбурові клітини, які здатні диференціюватися практично у будь-які клітини організму. Різноманіття шляхів диференціювання МСК і відносна доступність цих клітин в дорослому організмі робить їх унікальним матеріалом в регенераторній медицині [1, 2,3]. В даний час більшість робіт присвячено вивченню властивостей МСК, виділених з кісткового мозку дорослої людини та пуповинної крові. Але показано, що МСК можна одержати і з інших тканин дорослого організму - м'язів, серця, печінки, шкіри, жирової тканини (ЖТ) та ін. У зв'язку з цим, актуальним є використання альтернативного джерела для отримання МСК, зокрема, ЖТ [1,4,5]. У дорослої людини в склад ЖТ входять жирові клітини - адипоцити, а також клітини, що складають стромально-васкулярну фракцію (СВФ) ЖТ: преадипоцити, ендотеліальні і гладком'язові клітини кровоносних судин, макрофаги, Т-лімфоцити, периваскулярні фібробласти і підтримуюча волокниста колагенова строма. Фібробласти жирової тканини (ЖТ) – це великі клітини з великим, овальним, слабко базофільним ядром, великою кількістю відростків, добре розвиненим білок - синтезуючим апаратом, що виробляє колаген. Частина фібробластів є стовбуровими клітинами, які здатні проліферувати і диференціюватися [4,5,6]. У дослідженнях останнього десятиліття інтенсивно розробляються методи виділення, культивування та диференціювання МСК з ЖТ в остеогенні, адипогенні, міогенні та хондрогенні лінії за допомогою специфічних індукторів. Використання МСК з ЖТ з попереднім диференціюванням у нейрогенному напрямку *in vitro* та їх подальша ало- або ауто трансплантація гістосумісним пацієнтам вважається перспективним напрямком для використання МСК при різних захворюваннях людини [1,2,7].

МСК не мають HLA-II антигенів та коstimуючих рецепторів CD40, CD80, CD86. Встановлено, що МСК продукують трофічні чинники і мають імуномодулюючу функцію. МСК містять антигени HLA-I типу, а після дії на них інтерферону - експресують антигени HLA- II [1,3,5]. МСК супресують алогенні Т, NK і В клітини, активують дендритні клітини і ріст пухлин [3,8,9,10]. Класичні МСК експресують CD44, CD73 (SH3,

SH4), CD90 (Thy - 1), CD105 (SH2 Endoglin), CD106 (VCAM1) та позбавлені маркерів гемопоетичних ліній: c-kit, CD14, CD116, CD34, CD79L, CD19, HLA-DR. Усі МСК експресують ембріональні антигени Oct4, Nanog і стадіоспецифічний антиген SSEA4 [1,5,11].

Імунологічні властивості МСК обумовлені активністю PGE₂, NO, індоламин-2,3, діоксигенази. У МСК активний сигнальний шлях, пов'язаний з Toll рецепторами. Встановлено, що імуномодулюючі функції МСК обумовлені IL6 - залежним синтезом PGE₂ [11]. МСК сприяють розвитку Th2 - імунної відповіді. Імуносупресивний ефект МСК здійснюється опосередковано через Th1 - Th17 в Th2- імунну відповідь. МСК секретують чинники, супресуючі апоптоз і є промоторами васкуляризації і проліферації клітин [3,11]. Показано, що введення МСК супресує клінічні прояви багатьох аутоімуних захворювань в тому числі експериментального аутоімуного енцефаломієліту (ЕАЕ), пригнічує рівень запалення, зменшує демієлінізацію та має протекторний вплив на аксони [12]. Введення МСК з 20 по 22 день після індукції ЕАЕ у мишей знижує клінічні прояви захворювання, регулює вміст CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т клітин, TGF- 1 та IL-10 [74]. Внутрішньовенне введення МСК людини C57BL/6 мишам з індукованим ЕАЕ супресує клінічні прояви ЕАЕ та зменшує демієлінізацію [9,12]. В той же час механізм дії МСК на загальні та специфічні клітинні та гуморальні реакції при ЕАЕ вивчені ще не достатньо, тому метою даної роботи явилось вивчення впливу МСК на розвиток ЕАЕ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В наших експериментах було використано щурів виводку віварію НДІ нейрохірургії НАМН України. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», ухваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, 2004) на підставі правил «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях» (Страсбург, 1986). Для наркозу тваринам використовували дієтиловий ефір.

Виділення та культивування клітин стромально-васкулярної фракції (СВФ) з жи-

рової тканини (ЖТ) проводили згідно загально-прийнятих методик [13]. Коротко суть методик - для отримання суспензії клітин ЖТ збагаченої мультипотентними стромальними клітинами, у наркотизованого ефіром щура стерильно забирали підшкірний жир з передньої черевної стінки (передочеревний жир) та подрібнювали його ножицями, інкубували в 0,075 % розчині колагенази (тип 1) протягом 60 хвилин при 37 °С, при постійному помішуванні. Фермент інактивували додаванням (1:1) середовища DMEM (Sigma) з 10% вмістом ембріональної телячої сироватки (ЕТС); клітини осаджували центрифугуванням (5-10) хв при 1000 об/хв. Рідку фазу, що містила зрілі жирові клітини, видаляли піпеткою Пастера, а осад ресуспендували в ростовому середовищі (DMEM + 10% ЕТС). Отриману суспензію клітин відмивали двічі в ростовому середовищі центрифугуванням 10 хв при 1000 об/хв, фільтрували крізь нейлоновий мішечок і після остаточного осадження ресуспендували в ростовому середовищі DMEM з 10% вмістом ЕТС та гінтоміцином [11].

Клітини висаджували на 35 мм пластикові чашки Петрі по $5-9 \times 10^6$ клітин на чашку в 3-5 мл. поживного середовища. Обережно без кругових рухів розподіляли суспензію рівномірно по всій поверхні дна чашки Петрі. Культури утримували в CO₂-інкубаторі в стандартних умовах (95 % вологості, 37 °С). На наступний день поживне середовище в культурах повністю замінювали на свіжу порцію з метою видалення неадгезованих елементів. Наступні зміни культуральних середовищ проводили кожні 3-4 доби. Перший пасаж (пересів) проводили при 50-70 % конфлюентності моношару (7-8) доба культивування). Для цього поживне середовище замінювали на 0,25 % розчин трипсину, інкубували 30 хв при 37 °С, осаджували центрифугуванням 10 хв при 1000 об/хв. Осад ресуспендували у ростовому середовищі і розсаджували по 1×10^6 клітин. Аналогічним способом отримували другий та наступний пасажі (максимально 3 пасажі).

Моделювання експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) щурів. ЕАЕ моделювали згідно методики [14,15]. Тварин наркотизували, тканину спинного мозку видаляли і поміщали в буферний розчин, що не містить іонів кальцію і магнію (CMF-буфер), звільняли від оболонки. Після механічної дезагрегації шматочки мозку розтирали у фарфоровій ступці до отримання однорідної маси. Гомогенат мозкової тканини в кінцевій концентрації (500мг/мл) і повний ад'ювант Фрейнда „DIFCO” (USA) в співвідношенні (1:1) змішували в ступці і вводили щурам вагою (200 ± 15) г по 0,1 мл в кожну лапу.

Після моделювання ЕАЕ на (5-у, 8-у) добу внутрішньоочеревно вводили клітини МСК ЖТ

щурів. Тваринам контрольної групи (1 група) вводили фізіологічний розчин. Клінічні спостереження за тваринами проводили щодобово протягом 1 міс. Для кожної експериментальної тварини визначали ступінь тяжкості захворювання з врахуванням розроблених критеріїв [15]. Враховували зменшення маси тіла, наявність набряків кінцівок і явища супутнього ад'ювантного артриту, стан сфінктерів, парези та паралічі кінцівок, порушення рівноваги, тощо. З урахуванням всіх критеріїв експериментальної тварини виставляли загальну оцінку тяжкості стану в балах. 0 балів - відсутність наявних клінічних проявів; 1 бал – знижений тонус хвоста; 2 бали - м'язова слабкість, атонія хвоста, трофічні розлади; 3 бали – значна атонія хвоста, порушення рівноваги, вимушені пози; 4 бали - клінічний парапарез або тетрапарез, розлади сечовипускання та дефекації; 5 балів – смерть [15].

Постановка реакції бласттрансформації лімфоцитів з мітогенами та нейроантигенами (РБТЛ) проводилась класичними методами з незначними доповненнями [16]. У піддослідних тварин після їх умертвіння медичним ефіром забирали стерильно периферичну кров із аорти та серця у 2,0 мл шприц змочений гепарином. Постановка реакції РБТЛ проводилася в центрифужних пробірках в об'ємі 0,5 мл в повному середовищі RPMI з 10% вмістом ЕТС куди вносили по 200,0 мкл крові. У середовище культивування додавали 5 мкг/мл мітогену конконаваліну (ConA), або специфічні нейроантигени: основний білок мієліну (ОБМ), загальний мозковий антиген щура або людини по 20 мкг/ мг. Клітини культивували 72 годин при 37 °С [16].

Після закінчення культивування клітини осаджували центрифугуванням, в кожну пробірку додавали по 0,5 мл 96 % етилового спирту, після інтенсивного струшування вміст пробірок виливали на предметні скельця, висушували і забарвлювали за Романовським. Відсоток бластних клітин підраховували в імерсійній системі мікроскопу при перегляді 200 клітин.

Рівень антитіл до основного білку мієліну (ОБМ) визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу і виражали в ум.од. [17].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартного комп'ютерного пакету «Аналіз даних» Microsoft Excel для Windows 1995, версія 7.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При моделюванні ЕАЕ у щурів контрольної групи (тварини з ЕАЕ) перші неврологічні симптоми захворювання у більшості тварин спостерігалися на 6-8-у добу після індукції ЕАЕ. Їх появи передувало зниження маси тіла і рухової активності. Пік клінічних проявів розвивався на (12-

15-у) добу. На піку клінічних проявів 55,5% тварин мали ступінь тяжкості (3 + - 4 +) балів (фото.1), 33,3 % - ступінь тяжкості (1+ - 2+) балів. Мало-симптомне протікання відмічено у 11,2 % тварин. У місцях введення ад'юванту спостерігалися явища запалення, які зберігалися протягом 3-х тижнів. До (25-ої - 28-ї) доби після індукції ЕАЕ, тварини поступово клінічно видужували.

Відомо, що системне введення МСК може призводити до гальмування ЕАЕ, а самі клітини можуть проходити крізь судинну стінку та гістогематичні бар'єри, в тому числі гематоенцефалічний бар'єр, знаходити вогнища деструкції тканини в організмі, потенціювати регенерацію та мієліноутворення [102].



Фото1. Клінічні прояви гострого експериментального аутоімунного енцефаломієліту, ступінь тяжкості 4+ (паразпарез, атонія хвоста)

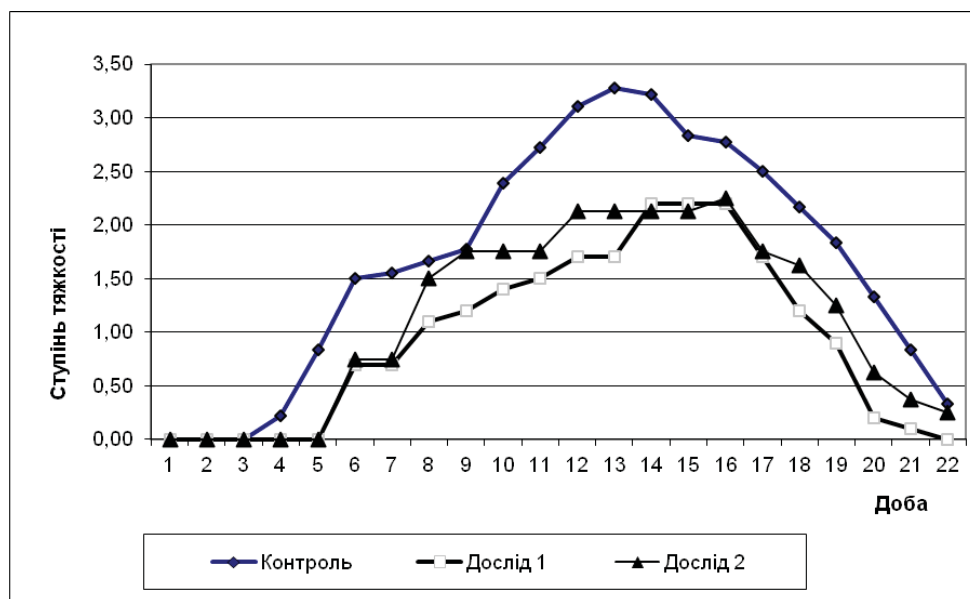
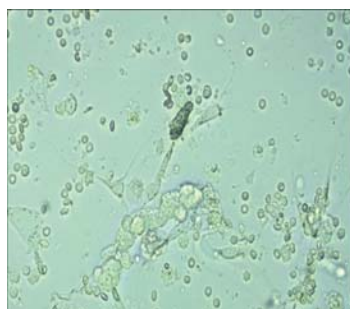


Рис.1 Показники стану тварин з ЕАМ після внутрішньоочеревинного введення СВФ ЖТ щура (10-а доба культивування).

Для вивчення ефективності системного введення МСК щурам внутрішньоочеревинно на (6-у та 9-у) добу після індукції ЕАЕ вводили попередньо культивовані протягом 10-и діб клітини стромальної фракції. На (6 і 9-ту) добу після моделювання ЕАЕ дослідні групи тварин отримували клітинну терапію, а контрольна група тварин не отримувала терапію. Тваринам пер-

шої дослідної групи внутрішньоочеревно вводили $1,5 \times 10^6$ клітин СВФ ЖТ з фракції 1-ої години адгезії, що культивувались в умовах CO_2 інкубатора впродовж (9 і 13) діб відповідно. Данні клітини на момент їх забору мали характерну фібробластоподібну морфологію, і сформували конфлюентний моношар (фото 2), що є однією з ознак отримання МСК із ЖТ.



а)



б)

Фото 2. Клітини 1-ої години адгезії, першої (а) та 13 (б) діб культивування. Нативні препарати. Збільшення x40

Тваринам 2-ої дослідної групи також проводили двохкратне внутрішньоочеревне введення клітин СВФ ЖТ. В даному випадку тваринам вводили $1,5 \times 10^6$ клітин фракції 24-ох годинної адгезії, що культивувались в умовах CO_2 інкубатора впродовж 9 і 13 діб відповідно. Данні клітини також на момент їх забору мали характерну фібробластоподібну морфологію, і сформували конфлюентний моношар. На початку лікування МСК клінічна картина ЕАЕ тільки починала розгортатися, парези та паралічі були відсутні і ступінь тяжкості захворювання оцінювалась в (1+ та 2+) бали. Двохкратне внутрішньоочеревинне введення МСК супроводжувалось зміною тяжкості клінічного стану щурів відносно стану тварин групи тільки з індукованим ЕАЕ (рис. 1). На піку клінічних проявів в контрольній групі (тварини тільки з індукованим ЕАЕ) ступінь тяжкості захворювання в середньому склала $3,22 \pm 0,8$ бали, внутрішньоочеревинне введення СВФЖТ зменшувало клінічні прояви захворювання і ступінь тяжкості в даній групі становив $1,86 \pm 0,51$ бали. Тільки у 10 % тварин з ЕАЕ після внутрішньоочеревинного введення СВФЖТ розвинулись парези задніх кінцівок, 70 % тварин в даній групі мали легку ступінь клінічного перебігу ЕАЕ. Кількість тварин з важким перебігом ЕАЕ на 12-у добу спостереження в контрольній групі (тварини тільки з індукованим ЕАЕ) значно перевищувала показники дослідної групи, кількість тварин з малосимптомним протіканням ЕАЕ також вдвічі перевищувала показники дослідної групи. До 22-ї доби дослідження кількість щурів з тяжкою захворювання (1+2+) бали (слабкі клінічні прояви) серед тварин лікованих МСК склала

20%, а в контрольній групі (тварини з ЕАЕ) – 40 %. Кількість тварин з безсимптомним та малосимптомним ступенем тяжкості ЕАЕ (0-до 0,5) бали в даний термін дослідження в групі тварин після внутрішньоочеревинного введення СВФЖТ залишається в 2 рази меншою в порівнянні до показників контролю. Таким чином клітини СВФЖТ 10 добового культивування трансформувались в МСК, що відображено на приведеному фото а також гальмували розвиток ЕАЕ, таку здатність мали як швидко- та повільноадгезуючі клітини СВФ ЖТ.

Вивчення рівня аутоантитіл до нейроспецифічного білку ОБМ в сироватці щурів в різні терміни після індукції ЕАЕ показало статистично вірогідне підвищення даного показника відносно контролю (інтактні тварини) у всі періоди дослідження (табл.1). При цьому в період маніфестації клінічних проявів ЕАЕ рівень аутоантитіл до ОБМ у тварин з важким перебігом ступінь тяжкості (3+-4+) бали був дещо вищий порівняно до відповідних показників у тварин з легким перебігом енцефаломієліту ступінь тяжкості (1+-2+) бали. Внутрішньоочеревинне введення клітин СВФЖТ на початку розвитку ЕАЕ (5-а та 8-а) доба після індукції енцефаломієліту супроводжувалось зменшенням рівня антитіл до ОБМ: значення даного показника у щурів з ЕАЕ різного ступеню тяжкості становив ($21,76 \pm 1,99$) ум.од., а у лікованих тварин ($14,37 \pm 5,30$) ум.од., проте у всіх групах, що досліджувались, даний показник вірогідно статистично перевищував контрольні значення (інтактні тварини). Дана тенденція зберігається і на 22-у добу після індукції ЕАЕ.

Таблиця 1

Рівень аутоантитіл до нейроспецифічного білку ОБМ (ум.од) у щурів з ЕАЕ після внутрішньоочеревинного введення клітин стромальної фракції жирової тканини

Групи тварин	15-а доба після індукції ЕАЕ	22-а доба після індукції ЕАЕ
ЕАЕ (n=9)	$21,76 \pm 1,99^*$	$17,56 \pm 1,84^*$
ЕАЕ + введення клітин СВФЖТ (n=10)	$14,37 \pm 5,30^*$	$11,94 \pm 2,93$
Контроль (інтактні тварини) (n=4)	$4,91 \pm 1,79$	

Примітка: * - різниця показника відносно контролю (P<0,05).

Необхідно відзначити, що при дослідженні тварин з важким перебігом ЕАЕ як лікованих, так і не лікованих на 15-у добу після індукції ЕАЕ нами не отримано статистично вірогідної різниці в рівні антитіл до ОБМ.

Проліферативна відповідь на стандартний міоген Соп А периферичних лімфоцитів на

висоті клінічних проявів ЕАЕ і у щурів на тлі лікування МСК на 16 - у добу не відрізнялась від контрольних значень (табл.2) і лише на 22 добу виявлено зниження проліферації лімфоцитів на цей мітоген. У групах тварин яким вводили МСК виявлено суттєву пригніченню проліферації лімфоцитів на стандартний мітоген.

Таблиця 2

Проліферативна активність лімфоцитів щурів з індукованим ЕАЕ на етапах лікування клітинами МСК зі СВФ, виділеними з ЖТ щурів.

Найменування груп тварин	Проліферативна відповідь лімфоцитів на мітоген і білки мозку			
	СопА	МАл	МАкр	ОБМ
ЕАЕ-16-е доба з неврологічними симптомами n=4	37,5± 8,1**	10,5± 2,5*,**	26,5± 4,9*	14,2± 2,7*
ЕАЕ + МСК-16-е доба з невро-логічними симптомами n=4	29,3± 4,7**	23,1± 3,5*,**	25,1± 7,9*	21,3± 5,7*
ЕАЕ -22-е доба без неврологічних симптомів n=4	13,3± 8,1 **, *	23,3± 4,5**	35,5± 8,9**	22,7± 8,7
ЕАЕ+ МСК-22-е доба без неврологічних симптомів n=5	15,1± 8,1**, *	11,8± 8,9**	3,8± 2,1**	16,3± 7,5
ЕАЕ+ МСК-1 година адгезії 22-е доба n=5	8,5± 1,5*	14,2± 2,4	10,6± 4,5	9,5± 1,5
ЕАЕ + МСК-24 годин адгезії 22-е доба n=5	5,3±2,1*	19,3± 3,9	9,1± 3,1	14,3± 3,5
Інтактні щури n=5	32,1± 2,1*	10,1± 1,2*	5,1±1,1*	8,1± 1,1*

*достовірність відмінностей, по відношенню до групи контролю P<0,01

**достовірність відмінностей між різними клінічними групами тварин P<0,01

У щурів дослідної групи з ЕАЕ, які отримали МСК було відмічено достовірне збільшення показників проліферативної відповіді периферичних лімфоцитів на МА людини (23,1± 3,5) %, що достовірно вище за значення у інтактних щурів (10,1± 1,2) % і значення в групі тварин з ЕАЕ без лікування (10,5± 2,5) %.

Проліферативна відповідь лімфоцитів на МА щурів була достовірно вище в обох клінічних групах на 16-у добу після індукції ЕАЕ, в порівнянні з інтактними щурами (табл.2). Проліферативна відповідь на ОБМ також достовірно була підвищена на 16 добу при клінічних проявах ЕАЕ і складала (14,2± 2,7) % у щурів з ЕАЕ і (21,3± 5,7) % у щурів з ЕАЕ і лікуванні МСК, що достовірно вище, ніж у інтактних тварин.

У тварин з індукованим ЕАЕ і спонтанним регресом неврологічної симптоматики на 22 добу були відмічені найвищі показники проліферативної відповіді мононуклеарів на нейроспецифічні білки (МАл, МАкр, ОБМ), тоді, як усі варіанти отриманих МСК з СВФ, виділеною з ЖТ щурів, на 22 добу знижували показники до значень, близьких у інтактних тварин, що свідчить про тривалу імуносупресію яка була викликана МСК. Особливістю цієї імуносупресії є те, що пригнічується не лише специфічна імунна

відповідь на мозкові антигени, а й загальна імунна відповідь на неспецифічний мітоген, на Соп А. У роботі були використані три нейроантигени – загальний мозковий антиген людини, щура та телячий основний білок мієліну, який отримано із спинного мозку телят. На всі три антигени була імунна відповідь в тесті бласттрансформації лімфоцитів тварин з ЕАЕ, серед яких найвищою була імунна відповідь на мозковий антиген щурів, за нею - на ОБМ та загальний мозковий антиген людини. Введення МСК щурам з ЕАЕ приводило до пригнічення проліферації лімфоцитів на ці антигени.

У роботі показано, що гальмування МСК розвитку ЕАЕ розпочинається не відразу і на 16 добу за рівнем проліферації лімфоцитів та рівнем аутоантитіл не видно ще ознак імуносупресії і лише на 22 добу суттєво гальмується імунна відповідь. Це може свідчити як про поступову імуносупресивну дію МСК, так і про можливість пригнічувати вже сформовану імунну реакцію в організмі та довготривале збереження імуносупресії. Гальмівною активністю володіли як МСК отримані при одно-, так і 12- годинній адгезії СВФ ЖТ, що вказує на можливість отримання МСК при різних термінах адгезії до пластику та можливість їх практичного використання не

лише в гострий період демелінізуючого процесу, а й уперіод ремісії з метою зменшення нейросенсибілізації та пригнічення аутоімунної відповіді.

ВИСНОВКИ

1. Двохразове внутрішньоочеревне введення МСК, які отримані після 10 добового культивування СВФ ЖТ, на початку розвитку ЕАЕ у щурів суттєво зменшує клінічні прояви ЕАЕ.
2. Встановлено статистично вірогідне підвищення рівня антитіл до ОБМ у щурів з ЕАЕ в період клінічної маніфестації захворювання, яке зберігається і в період спонтанного одужання. Введення клітин МСК супроводжується зменшенням рівня аутоантитіл до ОБМ у всі терміни дослідження.
3. МСК з жирової тканини, які отримані при одно- та 24-годинній адгезії до пластику, практично однаково пригнічували проліферативну відповідь периферичних лімфоцитів і активність аутоімунних реакцій у щурів з індукованим ЕАЕ на 22 добу.
4. МСК одержані з жирової тканини можуть бути використані в як перспективний засіб у лікуванні аутоімунної патології нервової системи, а саме розсіяного склерозу

ЛІТЕРАТУРА

1. Кирик В.М., Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы)/ В.М. Кирик., Г.М. Бутенко // Журн. АМН України. - 2010. -Т.16, №4. - С.576-604.
2. Зозуля Ю. А. Перспективы использования мезенхимальных стволовых клеток в восстановительном лечении заболеваний ЦНС / Ю. А. Зозуля, В. М. Семенова, Д. М. Егорова// "Журн. НАМН України", Клінічна медицина. 2011. — Т. 17, № 4. — С. 343–352.
3. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications / S. Ghannam C, Bouffi, F.Djouad., [et al.]// Stem Cell Res. Ther.- 2010.-V.1, №2. P.372-382.
4. Петренко А. Ю. Стволовые клетки из жировой ткани / А. Ю. Петренко, Э. Н. Иванов, Ю. А. Петренко // Біотехнологія.-, 2008.- Т. 1, №4, 2008, С.39-48.
5. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека./ М.М. Зафранская., Н.В.Ламовская., Д.Б. Нижегородова и др.// Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2010. - №4. -С.86-93.

6. E Planat-Benard V. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives / V. Planat-Benard, J.S. Silvestre, B. Cousin et al. // Circulation. — 2004. —V. 109. — P.656-663.
7. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека для компенсации неврологического дефицита у крыс, вызванного введением 3-нитропропионовой кислоты/А.В. Куликов, М.С. Степанова., С.Л. Стволинский [и др]. // Клеточные технологии в биологии и медицине. -2008. - №2. - С.83-89.
8. Pro-inflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high fat feeding/ T.K.Chatterjee L.L Stoll, G.M. Denning.[et al]. // Circ.Res.-2009. -V.104,№4. -P.541-549.
9. Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in b Pro-inflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high fat feeding/ T.K.Chatterjee L.L Stoll, G.M. Denning.[et al]. // Circ.Res.-2009. -V.104,№4. -P.541-549.
10. Торможение роста карциномы Герена у крыс после введения мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека и биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток / Д. В. Черкашина, А. С. Лебединский, Ю. А. Петренко [и др.] //Ж. АМН України", Теоретична медицина .- 2010- Т.16, № 3. — С. 492–506.
11. Chen P. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells / P. Chen // Journal of Biomedical Science. 2011, — 18, № 49. — P. 1-11.
12. Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis/ D. Gordon, G. Pavlovska, Uney JB, Wraith DC, Scolding NJ. // J Neuropathol Exp Neurol.- 2010.- V;69(11):P.1087-95.
13. Петренко А. Ю. Стромальные клетки-предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / А. Ю Петренко., Ю. А Петренко., Н. Г. Скоробогатова [и др.] // Журн. АМН України. — 2008. — 14, № 2. — С. 354–365.
14. Shin T. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages/ T.Shin, M.Ahh., Y.Matsumoto// Anat.Cell.Biol.-2012.- V.45,№3.-P.141-148.
15. Бельська Л.М. Вивчення активності фагоцитуючих клітин мозку при експеримен-

тальному алергічному енцефаломієліті та його корекції. Автореф.дис.канд.біол. наук.- К.2003.-20 с.

16. Гнедкова И.А., Лисяный Н.И., Гнедкова М.А. Изучение иммунорегуляторных свойств эмбриональных клеток головного мозга мышей С57В1/6//Имунологія та алергологія.– 2008, №1.–С.68-72.
17. Черенько Т.М. Сенсibiliзация к нейроспецифическим белкам у больных с закрытой черепно-мозговой травмой: Автореф дис. канд.мед. наук.- К., 1989.-26 с

РЕЗЮМЕ

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИМУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА У КРЫС

Лисяны й Н.И. Бельская Л.Н. Гнедкова И.А. Станецкая Д.М.

В статье приведены данные о культивировании стромально- васкулярной фракции клеток жировой ткани и получения мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые использовали для лечения крыс с ЭАЭ . Установлено , что двухразовое введение МСК

на 5 и 8 сутки после индукции ЕАЕ уменьшает тяжесть заболевания и подавляет гуморальные и клеточные нейроаутоимуннии реакции в отдаленном периоде заболевания. МСК полученные из жировой ткани могут быть использованы в качестве перспективного средства в лечении аутоиммунной патологии нервной системы, а именно рассеянного склероза

SUMMARY

EFFECT MESENCHYMAL STEM CELLS FAT TISSUE ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITISs IN RATS

Lisyanyy N.I., Bielska L.N., Hnidkova I.A., Stanetska D.N.

This paper presents data on the cultivation of stromal -vascular fraction of adipose tissue cells and obtaining mesenchymal stem cells (MSCs), which are used to treat rats with EAE . Established that two single administration of MSCs for 5 and 8 days after induction of EAE reduces the severity of the disease and suppresses humoral and cellular responses neuroautoimmunity response in the late period of the disease. MSCs derived from adipose tissue can be used as a promising tool in the treatment of autoimmune pathology of the nervous system such as multiple sclerosis.

АНТИЭНДОТОКСИНОВЫЙ ИММУННЫЙ СТАТУС И УРОВЕНЬ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК НА ГЕМОДИАЛИЗЕ

БЕЛОГЛАЗОВ В. А., КЛИМЧУК А. В.

ГУ « Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», кафедра внутренней медицины № 2, г. Симферополь.

Темпы распространенности хронической болезни почек (ХБП) растут во всем мире как следствие увеличения заболеваемости сахарным диабетом, гипертонической болезнью и старения населения [7,12]. По мере прогрессирования почечного повреждения с увеличением стадии ХБП развиваются метаболические изменения в организме больного, приводящие к росту оксидативного стресса и иммунным нарушениям [9]. У пациентов с ХБП развивается сложное взаимодействие между врожденным и приобретенным иммунитетом, в котором иммунная активация (гиперцитокинемия и острофазовый ответ) и подавление иммунитета (нарушенный ответ на инфекцию и дисбаланс адаптивного иммунитета) сосуществуют [8]. Известно, что у пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью (ТХПН) на гемодиализе (ГД) присутствуют

следующие мультифакторные биологические и клеточные дисфункции: активация мононуклеарных клеток, активация комплемента, синтез и высвобождение цитокинов, активных форм кислорода, высокий уровень хронического воспаления [10]. Общеизвестно, что хроническое воспаление играет решающую роль в развитие сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются основной причиной смертности пациентов с ХБП на ГД [14]. Развитие осложнений у пациентов с ХБП на ГД тесно связано с иммунной дисфункцией.

В качестве триггерных факторов индукции системного воспаления может выступать эндотоксин (ЭТ) грамотрицательных бактерий, который попадая в кровяное русло при транслокации из кишечника способен запускать провоспалительные реакции. Однако, это действие может блокироваться иммунной системой орга-