

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 611–018.46:616–056.3:616.832–002–092.9–091.8:591.882

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ І МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НЕРВОВИХ ВОЛОКОН СПИННОГО МОЗКУ

*С. Т. Акінола, С. А. Вербовська, В. В. Васлович,
Л. Д. Пічкур*

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова
НАМН України», м. Київ

Вступ. Застосування стовбурових клітин є перспективним напрямком в лікуванні запально-дегенеративних уражень, особливо з ціллю корекції аутоімунного стану та попередження руйнування або відновлення мієлінової оболонки аксонів.

Мета роботи. Дослідити вплив гемопоетичних і нейрогенних стовбурових клітин на перебіг ЕАЕ і процеси де- і ремієлінізації нервових волокон.

Матеріали і методи. Дослідження виконано на 46 самицях не лінійних білих щурів вагою 200–220 г, яких імунізували повним ад'ювантом Фрейнда. Сформовано 6 груп тварин. Двом групам тварин на 11 добу в/в вводили ГСК в кількості 20 і 10 млн. В інших двох групах в/в введення гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) доповнювали субоціпітальним введенням 2 млн. нейрогенних СК на 18 добу (пік захворювання). Оцінку перебігу ЕАЕ та важкості стану щурів проводили щоденно до 34 доби експерименту за 6 бальною шкалою. Електронно-мікроскопічні дослідження поперекових відділів спинного мозку тварин проводили на 35 і 60 добу експерименту. Визначали коефіцієнт відношення ширини мієлінової оболонки (шМО) до діаметра осьового циліндра (dОЦ). Статистичну обробку отриманих даних проводили з допомогою Microsoft Excel.

Результати. Після лікування ГСК на 11 добу поступово наростає тяжкість перебігу ЕАЕ, але у групах, які отримали по 20 млн ГСК на кожную тварину, клінічний перебіг ЕАЕ легший за групу спостереження № 1 та групи № 3 та № 5, які отримали по 10 млн ГСК. Застосування нейрогенних клітин субоціпітально прискорює регрес симптомів.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Остаточне одужання настає на 34 добу у всіх експериментальних групах. У більш ранні терміни дослідження зменшується периаксональний, міжламелярний набряк та демієлінізація. У пізні терміни дія ГСК нівелюється, нейрогенні клітини сприяють ремієлінізації.

Висновки. Нейрогенні СК збільшують рухову активність щурів, супресують клінічний розвиток ЕАЕ, сприяють зменшенню ступеня демієлінізації аксонів на 35 добу експерименту, а у віддаленому періоді (60 доба) — посилюють ремієлінізацію.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, стовбурові клітини, ремієлінізація.

Вступ. Лікування запально-дегенеративних захворювань є актуальною медичною проблемою [1]. Одним з шляхів вирішення цієї проблеми є розвиток генетичної та регенеративної медицини, який передбачає застосування з лікувальною метою методів клітинної терапії [11]. Терапія стовбуровими клітинами є новим напрямом лікування багатьох захворювань, але етичні та медичні проблеми обмежують розвиток цих методів. Так, серед медичних питань важливими є реакції відторгнення аlogenних ембріональних клітин, розвиток аутоімунної відповіді на специфічні антигени цих клітин [4].

Класичним методом попередження реакції відторгнення є створення стану імуносупресії [5]. Серед сучасних методів індукції супресорних впливів на імунну систему привертає увагу застосування стовбурових гемопоетичних (ГСК) та мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), джерелом яких може бути кістковий мозок дорослих тварин, печінка, пуповинна кров. [7]

Основною ціллю ушкоджуючих факторів (віруси, аутоантитіла) при демієлінізуючих ураженнях центральної нервової системи (ЦНС) є мієлінова оболонка відростків нервових клітин. Новим підходом до поновлення зруйнованої мієлінової оболонки аксонів є застосування трофічних факторів, клітин, які їх продукують та клітин-попередників олігодендроцитів [9]. Фетальна нервова тканина (ФНТ) вміщує усі ці фактори, а ефективність її компонентів інтенсивно вивчається [6]. Нейрохірургічні способи лікування розширюють можливості застосування компонентів ФНТ, оскільки трофічні фактори не проникають через гематоенцефалічний бар'єр, а доставка клітин-попередників олігодендроцитів безпосередньо у міста руйнування мієліну найбільш доцільна [11].

Мета. Дослідження впливу фетальних гемопоетичних (ГСК) і нейрогенних стовбурових клітин (НСК) на перебіг ЕАЕ і процеси де- і ремієлінізації нервових волокон.

Матеріали і методи. Для моделювання ЕАЕ були використані рекомендації Давидової Г.С. [3] зі зміною співвідношення компонентів ЕС, що дозволило отримати хронічний рецидивуючий перебіг ЕАЕ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

середнього ступеня тяжкості [8]. Саме хронічно рецидивуюча форма ЕАЕ дозволяє більш детально вивчити вплив різних факторів на перебіг демієлінізуючого процесу та уникнути летальності експериментальних тварин, яка за даними деяких дослідників при гострому ЕАЕ доходить до 30–60 % [8].

Для моделювання ЕАЕ використовували ад'ювант Фрейнда фірми Difco laboratories (Detroit, USA), який містить 2 мг мікробактерій туберкульозу на 1 мл ад'юванта. Тканину спинного мозку отримували під час розтину самок дорослих щурів, ретельно очищували від оболонок та піддавали механічній дезагрегації. У цілому, кількість мікробактерій туберкульозу в енцефалітогенній суміші (ЕС) складала $1,33 \pm 0,06$ мг на 1 тварину, а кількість мозкової тканини — 160 ± 10 мг. ЕС вводили в подушечки задніх кінцівок. Для стандартизації клінічного перебігу та вираженості трофічних розладів у щурів ЕАЕ моделювали з ретельним контролем кількості введеної ЕС та однаковим місцем інюкаляції в обидві задні кінцівки.

Дослідження було виконано на 46 самицях не лінійних білих щурів вагою 200–220 г розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМНУ». Сформовано 6 груп тварин (табл. 1), яких імунізували ЕС з співвідношенням ад'юванту до мозкової тканини 1,5:1.

Таблиця 1

Розподіл тварин і дизайн експерименту

| Клінічна група, № | Кількість тварин | Тип впливу |
|-------------------|------------------|--|
| 1 | 8 | Група спостереження (ЕАЕ) |
| 2 | 8 | Тварини, яким на 11 добу в/в введено ГСК 20 млн / тварину |
| 3 | 8 | Тварини, яким на 11 добу в/в введено ГСК 10 млн / тварину |
| 4 | 8 | Тварини, яким на 11 добу в/в введено ГСК 20 млн / тварину і 2 млн нейрогенних СК на 18 добу експерименту |
| 5 | 8 | Тварини, яким на 11 добу в/в введено ГСК 10 млн / тварину і 2 млн нейрогенних СК на 18 добу експерименту |
| 6 | 6 | Здорові тварини |

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Підготовка та вивчення клітинного складу суспензії гемопоетичних та нейрогенних клітин проводились у відділі молекулярної біохімії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Суспензію гемопоетичних клітин отримували з фетальної печінки щура (термін гестації 12–13 днів). Процентний вміст живих клітин в суспензії встановлювали із застосуванням вітального барвника трипанового синього шляхом підрахунку в камері Горяєва. Для подальших досліджень використовували лише зразки із вмістом живих клітин не менше 80 %. Загальна концентрація клітин в отриманій суспензії становила 40 млн/мл.

Суспензію нейрогенних клітин отримували з фетального мозку щурів (термін гестації 16–18 днів). Процентний вміст живих клітин в суспензії визначали за допомогою вітального барвника. Для подальших досліджень використовували лише зразки зі вмістом живих клітин не менше 70 %. Загальна концентрація клітин в отриманій суспензії становила 20 млн/мл. Для встановлення чисельності стовбурових нейрогенних клітин проводили імуногістохімічне виявлення нестин-позитивних (Nest+) та β -тубулін-позитивних клітин. Використано первинні антитіла до нестину (Dako, Данія). Візуалізацію зв'язування проводили за допомогою системи Multivision Polymer Detection (Dako, Данія).

Для дослідження дозозалежності ГСК вводили внутрішньовенно 2 і 3 групи тварин з ЕАЕ перед клінічними проявами захворювання — на 11 добу від індукції демієлінізуючої патології в кількості 20 і 10 млн. відповідно. Частини тварин (групи № 4 і № 5) введення ГСК доповнювали субокципітальним введенням 2млн. нейрогенних СК на піку захворюваності (18 доба), відразу після дебюту виражених клінічних проявів ЕАЕ. Для внутрішньовенного введення ГСК на 11 добу після індукції ЕАЕ, тварину розташовували у фіксаторі, тильну поверхню основи хвоста обробляли толуолом, що дозволяло отримати набряк поверхневих вен, який суттєво полегшує внутрішньовенне введення ГСК. Для субокципітального введення нейрогенних СК на 18 добу після індукції ЕАЕ щурів наркотизували (початкова доза 2 % розчину тіопенталу складала 0,5 мл внутрішньочеревно, з поступовим титруванням по 0,1 мл). Задню поверхню шиї та потилицю тварин вистригали ножицями та тричі обробляли спиртовим розчином йоду. В положенні максимального згинання шиї, пунктували велику потиличну цистерну і за допомогою інсулінового шприца вводили 0,1 мл суспензії нейрогенних клітин (2 млн. нативних клітин).

Оцінку перебігу ЕАЕ та важкості стану щурів проводили щоденно до 32 доби експерименту, використовуючи 6-бальну шкалу: 0 балів — практично здорова тварина. Незначні зміни в неврологічному

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

статусі тварин оцінювали в 0,5 бала. 1 бал — знижений тонус хвоста, 2 бали — парапарез задніх кінцівок, 3 бали — важкий парапарез до плегії задніх кінцівок чи тетрапарез, 4 бали — передсмертний стан, 5 балів — смерть. Згідно шкали, було визначено, що щури, важкість стану яких оцінено 1–2 бали, належали до групи з легкою важкістю перебігу, 2 — 3 бали — до середньої важкості.

Для вивчення процесів де- і ремієлінізації нервових волокон з допомогою електронної мікроскопії проводили дослідження ультраструктурних змін поперекових відділів спинного мозку експериментальних тварин на 35 і 60 добу експерименту. Після введення токсичної дози тіопенталу натрію внутрішньочеревно, проводили забір фрагментів тканини поперекових відділів спинного мозку розміром 2 — 3 мм³, фіксували в суміші 4 % параформальдегіда, 2.5 % глютаральдегіда і 4 % сахарози на 0.1 молярному фосфатному буфері pH=7.4 з наступною дофіксацією в 1 % розчині чотирьохокису осмію, зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу і оксіпропілену і заливали в суміш епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками електронної мікроскопії. Ультратонкі зрізи товщиною 600 А виготовляли на ультратомах LKB і Reichardt-Jung. Для підвищення контрастності забарвлювали за Reynolds [10] і переглядали в електронному мікроскопі EM-400T фірми „PHILIPS”.

Для прицільного ультратомування і більш поглибленої оцінки одержаних даних, з епоксидних блоків виготовляли напівтонкі зрізи товщиною 1000 А, забарвлювали метиленовим синім-піронином і переглядали у світлооптичному мікроскопі Ахіорфот фірми „OPTON”.

Для оцінки ступеня демієлінізації нервових волокон поперекового відділу спинного мозку проводили морфометричну обробку серійних напівтонких зрізів на комп'ютерному аналізаторі зображень CAI-01ABH фірми „SELM” з використанням програмного забезпечення „Karra opto-electronics GmbH” при однаковому збільшенні (×800). Коefіцієнт відношення ширини мієлінової оболонки (шМО) до діаметра осьового циліндра (dOЦ) визначали з розрахунку довільно взятих 10 мієлінізованих аксонів на 1 випадок за формулою:

$$\text{шМО} / \text{dOЦ}$$

Статистичну обробку отриманих даних проводили на комп'ютері з допомогою програми Microsoft Excel. Статистична обробка результатів проведена за критерієм Вілконсона-Манна-Уїтні для малих сукупностей, критерієм Ст'юдента. Оскільки розподіл одержаних даних статистично значуще не відрізнявся від нормального, для статистичної обробки отриманих даних також застосовували параметричний метод варіаційної статистики — метод численних порівнянь за Шеффе. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0.05$. Також

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

вивчали вірогідності поліноміальної апроксимації при тривалих спостереженнях за піддослідними тваринами.

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

У тварин всіх досліджуваних нами експериментальних груп виявлено середню важкість стану (2.05–2.75 бали) і хронічний ремітуючий перебіг захворювання тварин з ЕАЕ.

Перебіг ЕАЕ у тварин в групі № 1 був за типом хронічного ремітуючого, з ремісіями та загостреннями через декілька діб. В групах № 2–5 спостерігались важкі паралічі до плегій в хвості та кінцівках, але смертності не було. У всіх групах, які отримали лікування, тобто з № 2 по № 5, погіршення стану тварин після операцій не спостерігалось. Перебіг захворювання представлено на рисунку. Після лікування ГСК на 11 добу, поступово наростала тяжкість клініки перебігу ЕАЕ, але у групах, які отримали по 20 млн. ГСК на кожну тварину, тобто у групах № 2 та № 4, клінічний перебіг ЕАЕ був легший за групу спостереження № 1 та групи № 3 та № 5, які отримали по 10 млн ГСК на кожну тварину.



Рис. Перебіг ЕАЕ у щурів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Лікування НСК на 18 добу змінювало клінічний перебіг ЕАЕ у групах № 4 та № 5, прискорюючи регрес симптомів, та контрастно відрізняючись від групи спостереження, яка взагалі не лікувалась, а тому має стабільну симптоматику ще з тиждень, з поступовим уданим покращенням, проте чітким переходом до хронічного перебігу.

Одужання тварин у групах, які отримали лікування НСК наставало швидше в групі № 1 та групах, які отримали лише ГСК, тобто № 2 і № 3. Остаточне одужання наставало на 34 добу у всіх групах, які лікувалися, а у групі спостереження № 1 до кінця спостереження відмічались клінічні прояви ЕАЕ з хронічним перебігом.

Нами також було проведено морфометричне дослідження впливу ГСК та НСК на морфофункціональний стан мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з ЕАЕ (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив стовбурових клітин на морфофункціональний стан мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини поперекових відділів спинного мозку щурів з ЕАЕ ($M \pm m$)

| Група | Товщина мієлінової оболонки / діаметр осевого циліндра, коефіцієнт | |
|---------------------------|--|-----------------|
| | 35 доба | 60 доба |
| Група № 1 (без лікування) | 0.54±0.01 | 0.51±0.02 |
| Група № 2 | 0.51±0.03 ** | 0.46±0.02 ** |
| Група № 3 | 0.46±0.02 * *** | 0.46±0.02 *** |
| Група № 4 | 0.4±0.02 * ** | 0.39±0.02 * ** |
| Група № 5 | 0.39±0.01 * *** | 0.34±0.02 * *** |
| Група № 6 (здорові щури) | 0.35±0.01 | 0.35±0.01 |

Примітка: * — статистично значуще між групою порівняння та групами, які отримали лікування ($P < 0.05$);

** — статистично значуще між групами дослідження № 2 та № 4 ($P < 0.05$);

*** — статистично значуще між групами дослідження № 3 та № 5 ($P < 0.05$).

Показник відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра ($tMO/dOЦ$) у нормі має бути майже незмінним, оскільки між шириною мієлінової оболонки і діаметром осевого циліндра повинна існувати тісна залежність. В умовах патології відношення $tMO/dOЦ$ корінним чином змінюється і, на нашу думку, може опосередковано характеризувати динаміку перебігу процесу демієлінізації у мієлінізованих аксонах, оскільки при демієлінізації щільність

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

розміщення витків мієліну порушується, що призводить до збільшення як ширини мієлінової оболонки, так і показника в цілому.

Згідно з одержаними морфометричними даними у групі дослідження з ЕАЕ без лікування (тобто, у групі № 1) спостерігалось статистично значуще зростання коефіцієнта $tMO/dOЦ$ відносно групи порівняння в усі терміни дослідження, максимальне значення цього показника зафіксовано на 35-ту добу.

На 35 добу спостерігається статистично значуща різниця між здоровими тваринами (групою спостереження № 6) та всіма групами, які досліджувалися, за винятком групи № 2, що корелює ультраструктурною візуалізацією — зменшенням периаksonального та міжламелярного набряку та зниженням кількості мієлінових оболонок з хвилястими і спіралеподібно закрученими ламелами. При цьому, унаочнюється статистично значуща різниця між групами дослідження № 2 та № 4, а також між групами № 3 та № 4.

На 60 добу різниця між групою порівняння та групами з різними дозами ГСК нівелюється, немає статистично значущих відмінностей і між самими цими групами, проте зберігається статистично значуща різниця між відповідними групами дослідження з лікуванням тільки ГСК або ГСК та нейротрансплантацією (тобто № 2 і № 4 та № 3 і № 5). У цей термін дослідження, групи № 4 і № 5 за своїми числовими значеннями наближаються до величин здорових щурів, статистично значуще не відрізняючись ні між собою, ні від групи порівняння, проте за ультраструктурними особливостями мієлінованих оболонок, які характеризуються частковим розволокненням, гомогенізацією і порушенням впорядкованості ламел є далекими таких, що спостерігаються у групі спостереження зі здоровими щурами.

Слід зазначити, що між відповідними групами, які отримали лікування різними дозами ГСК (а саме, між № 2 і № 3 та № 4 і № 5) у жоден із термінів дослідження статистично значущої різниці відмічено не було, хоч ультраструктурно стан мієлінованих оболонок у відповідних групах дослідження з дозою гемоклітин 20 млн. (тобто № 2 і № 4) здавався кращим.

На підставі аналізу морфофункціонального стану мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з ЕАЕ можна говорити про те, що у більш ранні терміни дослідження на перший план виходить супресивна дія ГСК, морфологічним проявом чого є зниження периаksonального і міжламелярного набряку та зменшення демієлінізації, а у пізніші терміни дія ГСК нівелюється, і включається реакція, опосередкована впливом НСК, що проявляється посиленням процесу ремієлінізації, тобто збільшенням площі, зайнятої ремієлінованими нервовими волокнами з більш тонким шаром мієліну.

Таким чином, нами розроблено підхід до лікування ЕАЕ з застосуванням фетальних нейрогенних стовбурових клітин, отриманих із аlogenної нервової тканини плода. Цей підхід є ефективним з точки зору застосування нейрогенних клітин із високим відновлювальним потенціалом, які можуть продукувати трофічні фактори, мігрувати у зони ураження ЦНС та тривало зберігатись в організмі тварин, що було доведено раніше [11], і інтегруватись у ЦНС реципієнта. Вони можуть також здійснювати замісний ефект, поповнюючи кількісний склад попередників клітин нервової системи, забезпечуючи тим самим умови для ремієлінізації аксонів, зменшення моторного дефіциту у тварин з ЕАЕ [5].

Одним із факторів, які стримують використання вищеописаного підходу до лікування тварин з ЕАЕ, є наявність нейроантиспецифічних процесів в імунній системі, які виявляються при імунологічному обстеженні перед початком та на етапах лікування. Згідно з результатами наших попередніх досліджень [7], ознаки антиспецифічних процесів до нейробілків виявляються у 70 % тварин з ЕАЕ. Очевидно, що наявність антиспецифічних реакцій при ЕАЕ не тільки віддзеркалює ступінь ураження тканини ЦНС, а також є варіантом стану імунної системи конкретної хворої тварини. На нашу думку, важливо запобігати застосуванню методик клітинної терапії при захворюваннях ЦНС із вираженими ознаками аутоімунітету до нейробілків. Крім того, лікування запально-дегенеративних уражень ЦНС у частини хворих може опосередковано створювати умови для розвитку імунної відповіді на циркулюючі антигени, внаслідок чого можуть з'являтися лабораторні ознаки аутоімунітету до нейробілків і відповідно виникають сумніви щодо призначення чергового курсу клітинної терапії. Нейрогенні клітини, які вводяться інтратекально, в умовах деструктивного аутоімунітету можуть швидко інактивуватися чи гинути, їхній відновний вплив за таких умов може бути не достатнім.

Тому запропонований спосіб лікування ЕАЕ нейрогенними стовбуровими клітинами ми удосконалили за рахунок усунення лабораторних ознак аутоімунітету перед власне лікуванням. З цієї метою застосовано спосіб індукції толерантності до аутоантігенів шляхом внутрішньовенного введення клітинних суспензій, які містять гемопоетичні стовбурові клітини, здатні індукувати таку толерантність. Таким чином, створюються умови для ефективного відновного впливу стовбурових ембріональних нейрогенних клітин на перебіг ЕАЕ і стан мієлінових оболонкок нервових клітин спинного мозку щурів, що і встановлено у наших дослідженнях.

Висновки. Нами отримана адекватна модель ЕАЕ з хронічним перебігом захворювання. Субокципітальне застосування нейроген-

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

них СК на піку клінічних проявів ЕАЕ після попереднього введення внутрішньовенно ГСК покращує рухову активність щурів і супресує клінічний розвиток ЕАЕ. Нейрогенні СК у тварин з ЕАЕ сприяють зменшенню ступеня демієлінізації аксонів на 35 добу експерименту, а у віддаленому періоді (60 доба), супроводжується посиленням відновлення, проліферації та гіпертрофією олігодендроцитів з утворенням клітинних кластерів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Багинский Ф.В., Галиновская Н.В., Усова Н.Н. [и др.]. Рассеянный склероз: современное состояние проблемы (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии. — 2010. — № 3(25). — С. 75–80.
2. Гольцев А.М. Застосування кріоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу як коректорів аутоімунних захворювань на моделі експериментального алергійного енцефаломієліту (ЕАЕ) / Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. [та ін.]. // Трансплантологія. — 2003. — Т.4. — № 1. — С. 207–209.
3. Давыдова Г.С. Вопросы направленного моделирования аллергического энцефаломиелимита / Г.С.Давыдова // Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. — Минск: Наука и техника, 1975. — С. 24 — 33.
4. Дражина Н.П. Эффективность и безопасность применения аутологичной трансплантации мультипотентных мезенхимальных клеток при рассеянном склерозе / Дражина Н.П., Усс А.Л., Миланович Н.Ф. [и др.] // Хирургия. Восточная Европа. — 2012. — № 4(04). — С. 72–82.
5. Лисяный Н.И. Коррекция аутоиммунного демиелинизирующего процесса у крыс клетками аллогенного головного мозга новорожденных животных / Лисяный Н.И., Маркова О.В. // Иммунология. — 2003. — № 1. — С.15–19.
6. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. / Под ред. Ю. А. Зоули, Н. И. Лисяного. — К., 2005. — 364 с.
7. Руденко В. А. Вплив ксеногенної трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин та IL-10 на показники клітинного імунітету у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / В. А. Руденко, І. О. Гнедкова, Л. Д. Пічкур [та ін.] // Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупіка. — К., 2014. — Вип. 23, кн.2. — С. 434 — 441.
8. Arianna Scuteri. Therapeutic Administration of Mesenchymal Stem Cells Abrogates the Relapse Phase in Chronic Relapsing-Remitting EAE / Scuteri [et al.] // J. Stem. Cell Res. Ther. — 2015. -№ 5:2 <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.1000262>
9. Bathina S., Das U.N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications // Arch. Med. Sci. — 2015. — Vol. 11, N6. — P.1164–1178.
10. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol.— 1963.— Vol. 17.— P. 208–212.
11. Distribution of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly in the central nervous systems of the EAE rats / M. V. Kovalchuk, O. G. Deryabina, L. D. Pichkur [et al.]. // Biopolymers and Cell. — 2015. — V.31, N5. — P.371 — 378.

Исследование влияния стволовых клеток на клиническое течение экспериментального аллергического энцефаломиелита и морфофункциональное состояние нервных волокон спинного мозга

С. Т. Акинола, С. А. Вербовская, В. В. Васлович, Л. Д. Пичкур

**ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова
НАМН Украины», г. Киев**

Вступление. Использование стволовых клеток является перспективным направлением лечения воспалительно-дегенеративных поражений, особенно с целью коррекции аутоиммунного состояния и предотвращения повреждения или восстановления миелиновой оболочки аксонов.

Цель работы. Изучить влияние гемопоэтических и нейрогенных стволовых клеток на течение ЭАЭ и процессы де- и ремиелинизации нервных волокон.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 46 самках нелинейных белых крыс весом 200–220 г, которых иммунизировали полным адьювантом Фрейнда. Сформировано 6 групп животных. Двум группам животных на 11 сутки в/в вводили ГСК в количестве 20 и 10 млн. В других группах в/в введение ГСК дополняли субокципитальным введением 2 млн. нейрогенных СК на 18 сутки (пик заболевания). Оценку течения ЭАЭ и тяжести состояния крыс проводили ежедневно до 34 суток эксперимента по 6-балльной шкале. Электронно-микроскопические исследования поясничных отделов спинного мозга животных проводили на 35-е и 60-е сутки эксперимента. Определяли коэффициент отношения ширины миелиновой оболочки (шМО) к диаметру осевого цилиндра (dOC). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Microsoft Excel.

Результаты. После лечения ГСК на 11 сутки постепенно нарастает тяжесть течения ЭАЭ, но в группах, которые получали по 20 млн ГСК на каждое животное, клиническое течение ЭАЭ легче, чем в группе наблюдения № 1 и в группах № 3 и № 5, которые получали по 10 млн ГСК. Использование нейрогенных клеток субокципитально ускоряет регресс симптомов. Окончательное выздоровление происходит на 34 сутки во всех экспериментальных группах. В более ранние сроки исследования уменьшается периаксональный, межламеллярный отёк и демиелинизация. В более поздние сроки действие ГСК нивелируется, нейрогенные клетки усиливают ремиелинизацию.

Выводы. Нейрогенные СК усиливают двигательную активность, супрессируют клиническое развитие ЭАЭ, способствуют уменьше-

нию степені демієлінізації аксонов на 35 сутки експеримента, а в отдалённом періоді (60 сутки) — посилюють ремієлінізацію.

Ключевые слова: експериментальний алергічний енцефаломиєліт, ствольові клітки, ремієлінізація.

Research into influence of stem cells on the clinical course of experimental allergic encephalomyelitis and morphofunctional state of nerve fibers of the spinal cord

S. T. Akinola, S. A. Verbovs'ka, V. V. Vaslovich, L. D. Pichkur

**State Institution Romodanov Neurosurgery Institute
National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv**

Introduction. Stem cells application is a promising direction in treatment of inflammatory and degenerative lesions, especially for the purpose of autoimmune condition correction and prevention or reparation of damage to the myelin sheath around axons.

Goal. To study the influence of hematopoietic (HSC) and neurogenic (NSC) stem cells on the course of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and nerve fibers de- and remyelination.

Materials and methods. The research was performed on 46 female outbred white rats weighing 200–220 g which had been immunized with Freund's complete adjuvant. We formed six groups of animals. On the 11th day two groups of animals were intravenously injected with HSC at a dose of 20 and 10 million. In other groups intravenous injections of HSC were supplemented with suboccipital NSC at a dose of 2 million on the 18th day (peak of the disease). EAE course and severity of rats' condition were evaluated on 6-point scale daily up to 34th day of the experiment. Rats' lumbar spine tissue was taken for the electron microscopic study on the 35th and 60th days of the experiment. We determined the ratio of the myelin sheath (wMS) width to the axial cylinder diameter (dAC). Statistical processing of the obtained data was carried out using Microsoft Excel.

Results. After 11 days of HSC treatment EAE severity gradually increased, but in animals which received HSC at a dose of 20 million the EAE clinical course was less severe than in groups 1, 3 and 5 (HSC at a dose of 10 million). Suboccipital NSC contributed in accelerated EAE symptoms regression. All experimental groups made a full recovery on the 34th day. A reduction in periaxonal, interlamellar edema and demyelination was observed in earlier periods of the study. In later terms, HSC effects were leveled off, neurogenic cells enhanced remyelination.

Conclusions. NSC promoted enhanced motor activity, suppressed EAE clinical manifestations, decreased the extent of axons demyelination at day 35 of the experiment. Long-termed (at day 60) effects of NSC included enhanced remyelination.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis; stem cells; remyelination.

Відомості про авторів:

Акінола Самуель Толувані — аспірант ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, тел.: (044) 483–12–53.

Вербовська Світлана Анатоліївна — науковий співробітник відділення відновлювальної нейрохірургії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, тел.: (044) 483–12–53.

Васлович Вікторія Володимирівна — науковий співробітник лабораторії електронної мікроскопії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, тел.: (044) 483–12–53.

Пічкур Леонід Дмитрович — доктор медичних наук, керівник науково-організаційного відділу з групою епідеміології та прогнозування нейрохірургічних захворювань ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32, тел.: (044) 483–12–53.

УДК 616.831.484–006:615.28:612.015

ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ ЧУТЛИВОСТІ КЛІТИН ЗЛОЯКІСНИХ ГЛІОМ ДО АЛКІЛУЮЧИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ IN VITRO З УРАХУВАННЯМ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНУ O⁶-МЕТИЛГУАНІН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ

**О. Я. Главацький, І. Г. Васильєва, І. М. Шуба, Н. Г. Чопик,
О. С. Галанта, О. І. Цюбко**

**ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова
НАМН України”, м. Київ**

Вступ. Резистентність злоякісних гліальних пухлин до антибластичної хіміотерапії пов’язують з високим рівнем експресії гену ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT), тому при визначенні індивідуальної чутливості клітин гліом до хіміопрепаратів з алкілюючим механізмом дії необхідно враховувати наявність експресії даного гену.

Мета — дослідити індивідуальну чутливість клітин злоякісних гліом до алкілюючих хіміопрепаратів з урахуванням особливостей експресії даного гену.