

Abstract

V. V. Vaslovych¹,
L. D. Pichkur¹,
T. A. Malysheva¹,
S. T. Akinola¹,
S. A. Verbovska¹,
O. K. Toporova^{2,3},
N. S. Shuvalova²,

¹State Institution "Institute of Neurosurgery named after acad. A. P. Romodanov of NAMS of Ukraine", 32 Platon Mayboroda str., Kyiv, Ukraine, 04050;

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine, 67 Vyshgorodskaya str., Kyiv, Ukraine, 04114;

³Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., Kyiv, Ukraine, 03680

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE SPINAL CORD OF RATS WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS IN THE BACKGROUND OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND INTERLEUKIN-10

Introduction. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (UCd-MSc) are multipotent. They are able to migrate to the sites of central nervous system damage, contribute to the restoration of the number of endogenous oligodendrocytes, produce immunomodulatory effects and are able to synthesize antiinflammatory cytokines (IL-10).

Purpose. To investigate the effect of UCd-MSc and IL-10 on the processes of de- and remyelination of nerve fibers of the spinal cord of rats with experimental allergic encephalomyelitis at the ultrastructural level.

Materials and methods. The study was performed on 23 white female rats, weighting 210 g. The relapsing course of EAE was obtained by inserting Freund's adjuvant into the rat's hind limb pads. Six groups of animals were formed. 18 rats from EAE were intravenously or suboccipitally administered in different combinations of IL-10 (0.1 µg) and MSc no transfected (1 million) and MSc (1 million) transfected with the IL-10 gene. Electron microscopy was used to investigate the ultrastructural changes in the lumbar spinal cord of experimental animals at the 35th and 60th day of the experiment. Also, the ratio of the width of the myelin sheath (MS) to the diameter of the axial cylinder (AC) was determined on the semi-thin sections. Statistical analysis of the results was performed using non-parametric rank discriminant Kruskal–Wallis analysis followed by application of the U-Mann-Whitney criterion using STATISTICA 6.1 statistical software package.

Results. In animals of all experimental groups, the peak of EAE was observed for 19–20 days and developed a chronic remitting flow. In the comparison group (EAE), part of the oligodendrocytes already in the early stages are in a para apoptotic state, the degree of which increases over time. Reactive modified swollen forms of oligodendroglia, along with destructive, are more often represented in the study group III EAE + IL-10. Hypertrophic oligodendrocytes are more likely to be detected after the introduction of MScs. Oligodendrocytes of group V (EAE + MSK transfected with IL-10 gene) for 60 days of study have signs of functional tension (swollen mitochondria with crystals fragmentation). In all experimental animal groups, with the exception of the comparison group, a reduced degree and demyelination area with a simultaneous partial reduction of the intralaminar and almost complete – periaxonal edema. In the study group III (EAE + IL), none of the terms of the study showed normalization of the structure of myelin membranes. Figures of remyelination of nerve fibers in all experimental groups were detected already on the 35th day of the study. The ratio of the thickness of the myelin sheath to the diameter of the axial cylinder is statistically signifi-

cantly reduced relative to the comparison group in all treated groups except for the III (EAE + IL) for 35 days and III (EAE + IL) and V (EAE + MSC (T) at 60 days of the experiment.

Conclusions

- MSCs help reduce interlamellar, periaxonal edema and demyelination in animals with EAE.
- Suboccipital introduced into CSF IL-10 does not produce statistically significant effects, however, to some extent, strengthens the effect of MSC.
- In all animal groups and in all terms, MSCs promote stimulation of remyelination processes.

Keywords: experimental allergic encephalomyelitis, mesenchymal stem cells, morphological changes, interleukin-10.

Corresponding author: verbovskaya-svetlana@ukr.net

Резюме

В. В. Васлович¹,
Л. Д. Пічкур¹,
Т. А. Малишева¹,
С. Т. Акінола¹,
С. А. Вербовська¹,
О. К. Топорова^{2,3},
Н. С. Шувалова²,

¹ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», вул. Платона Майбороди, 32, м. Київ, Україна, 04050;

²Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, вул. Вишгородська, 67, м. Київ, Україна, 04114;

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, м. Київ, Україна, 03680

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛИТОМ ПІД ВПЛИВОМ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА ІНТЕРЛЕЙКІНА-10

Мета: дослідити зміни процесу демієлінізації в спинному мозку на ультраструктурному рівні у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) під дією мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10).

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 23 білих щурах-самцях, вагою 210 г, яким індукували ЕАЕ з рецидивуючим перебігом. Тваринам внутрішньовенно чи субокципітально вводили у різних поєднаннях ІЛ-10 (0,1 мкг) та МСК нетрансфіковані (1 млн.) та МСК (1 млн), трансфіковані геном ІЛ-10. Досліджували ультраструктурні зміни спинного мозку щурів на 35 і 60 добу експерименту. На напівтонких зрізах визначали коефіцієнт співвідношення ширини мієлінової оболонки (МО) до діаметра осевого циліндра (ОЦ) волокон спинного мозку (СМ). Статистичний аналіз результатів здійснювали з використанням непараметричного рангового дискримінантного аналізу Краскела–Уолліса з подальшим застосуванням критерію U-Манна–Уїтні за допомогою пакета статистичних програм STATISTICA 6.1

Результати. В усіх експериментальних групах, порівняно з контролем виявлено зменшення ступеня та площі зон демієлінізації зі зниженням виразності інтраламелярного і периаксонального набряку. Коефіцієнт співвідношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра статистично значуще зменшується у всіх групах, порівняно з контролем.

Висновки. Введений у ліквор субокципітально ІЛ-10 не справляє впливу, ознаки якого мають статистичну значущість, однак демонструє підсилення і потенціювання дії МСК. МСК сприяють зменшенню міжламелярного, периаксонального набряку та процесу демієлінізації у тварин з ЕАЕ. В усіх групах тварин в усі терміни дослідження МСК сприяють активації процесів ремієлінізації.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, мезенхімальні стовбурові клітини, морфологічні зміни, інтерлейкін-10.



Резюме

В. В. Васлович¹,
Л. Д. Пічкур¹,
Т. А. Малышева¹,
С. Т. Акинола¹,
С. А. Вербовская¹,
Е. К. Топорова^{2,3},
Н. С. Шувалова²,

¹ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины», ул. Платона Майбороды, 32, г. Киев, Украина, 04050;

²Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, ул. Вышгородская, 67, г. Киев, Украина, 04114;

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного, 150, г. Киев, Украина, 03680

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИНТЕРЛЕЙКИНА-10

Цель: изучить изменения процессов де- и ремиелинизации в спинном мозге на ультраструктурном уровне у крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ) под действием мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и интерлейкина-10 (ИЛ-10).

Материалы и методы. Исследования проведены на 23 белых крысах – самках, весом 210 г, которым индуцировали ЭАЭ с рецидивирующим течением. Животным внутривенно или субокципитально вводили в разных комбинациях ИЛ-10 (0,1 мкг) и МСК не-трансфицированные (1 млн.) и МСК (1 млн.), трансфицированные геном ИЛ-10. Исследовали ультраструктурные изменения спинного мозга крыс на 35 и 60 сутки эксперимента. На полутонких срезах определяли коэффициент соотношения ширины миелиновой оболочки (МО) к диаметру осевого цилиндра (ОЦ) волокон спинного мозга (СМ). Статистический анализ результатов выполняли с использованием непараметрического рангового дискриминантного анализа Краскала–Уоллиса с последующим применением критерия U-Манна–Уитни при помощи пакета статистических программ STATISTICA 6.1.

Результаты. Во всех экспериментальных группах, по сравнению с контролем, выявлено уменьшение степени и площади зон демиелинизации со снижением выраженности интраамилярного и периаksonального набухания. Коэффициент соотношения толщины миелиновой оболочки к диаметру осевого цилиндра статистически значимо уменьшается во всех группах, по сравнению с контролем.

Выводы. Введённый в ликвор субокципитально ИЛ-10 не оказывает влияния, признаки которого были бы статистически значимы, однако ИЛ-10 демонстрирует усиление и потенцирование действия МСК. МСК способствуют уменьшению интраамилярного, периаksonального набухания и процесса демиелинизации у животных с ЭАЭ. Во всех группах животных во все сроки исследования МСК способствуют активации процессов ремиелинизации.

Ключевые слова: экспериментальный аллергический энцефаломиелит, мезенхимальные стволовые клетки, морфологические изменения, интерлейкин-10.

Автор, відповідальний за листування: verbovskaaya-svetlana@ukr.net

Вступ

Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) вважається моделлю розсіяного склерозу (РС). В основі розвитку цього захворювання лежать явища демієлінізації. Розвиток ЕАЕ супроводжується порушенням генетичної недоторканості імунної системи, що за деяких ситуацій призводить до розвитку різноспрямованих аутоімунних реакцій, за інших – до толерантності [1].

При енцефаломієліті надзвичайно важливу роль відіграє розвиток аутоімунних реакцій, які, в тому числі і за типом мімікрії, сприяють руйнуванню структур нервової системи.

Поглиблені знання про механізми розвитку демієлінізуючих захворювань на субклітинному і молекулярному рівнях стимулюють розробку нових сучасних методів патогенетичного лікування цих захворювань з використанням клітинної терапії [2].



Останнім часом в обґрунтуванні лікувальних схем демієлінізуючих захворювань ЦНС досліджується вплив і ефекти мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) різного походження [3].

Обґрунтуванням цьому служать результати експериментальних досліджень, в яких доведена здатність МСК до тривалого виживання, міграції у різні відділи ЦНС і позитивний вплив на клінічний перебіг ЕАЕ [4, 5].

Показано, що трансплантовані МСК при ЕАЕ у мишей сприяють відновленню кількості олігодендроцитів, відповідальних за ремієлінізацію ушкоджених нервових волокон [6].

МСК можуть диференціюватися в остеогенному, хондрогенному, адипогенному та нейрогенному напрямках і приймати активну участь у репарації пошкоджених тканин різних органів, серед яких – центральна нервова система (ЦНС) [7].

Стовбурові клітини здатні поповнювати кількісний склад клітин-попередників, забезпечуючи, тим самим, умови для ремієлінізації аксонів, відновлення будови нервової тканини і зменшення моторного дефіциту при запально-дегенеративних ураженнях ЦНС.

Доведено, що мультипотентні МСК сприяють активації ендогенних механізмів репарації за рахунок секреції розчинних трофічних факторів. Ефекти МСК, які виникають після трансплантації, можуть бути відтворені введенням кондиціонованого цими клітинами середовища [8].

Доведено, що МСК при демієлінізуючих захворюваннях справляють імуномодулюючий вплив без застосування імуносупресивної терапії [9].

Важливу роль в патогенезі демієлінізуючих уражень відіграють цитокіни [10]. Встановлено, що фактор некрозу пухлин, інтерлейкін-6 стимулюють продукцію прозапальних цитокінів, які приймають участь в ушкодженні ЦНС [10, 11].

Протизапальний інтерлейкін-10 (IL-10), продукується МСК, Т-хелперами 2-го типу, активує моноцити-макрофаги і регулює Т-клітини. Окрім цього, IL-10 інгібує продукцію Т-хелперів 1-го типу і прозапальних цитокінів [12]. Це стало підставою для клінічного застосування IL-10 при аутоімунних захворюваннях [13, 14].

Основною ланкою дії патогенних факторів (віруси, аутоантитіла) при демієлінізуючих ураженнях центральної нервової системи є мієлінова оболонка відростків нервових клітин. Новим підходом до активації відновлення повноцінної

мієлінової оболонки аксонів є застосування трофічних факторів, клітин, які їх продукують та клітин-попередників олігодендроцитів [14].

Нейрохірургічні способи лікування ЕАЕ розширюють можливості застосування МСК та протизапальних цитокінів, оскільки трофічні фактори не проникають через гемато-енцефалічний бар'єр, а адресна доставка МСК безпосередньо у зону руйнування мієліну найдоцільніша [4].

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідження впливу МСК і IL-10 на процеси демієлінізації нервових волокон спинного мозку на ультраструктурному рівні.

Матеріали і методи. Дослідження виконано на 23 самицях нелінійних білих щурів вагою 200–220 г розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМНУ» у відповідності з міжнародними правилами і нормами European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC та згідно принципів «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» от 21.20.2006.

ЕАЕ моделювали згідно методики, описаної в роботі [5], із хронічним рецидивуючим перебігом середнього ступеня тяжкості. Саме хронічна рецидивуюча форма ЕАЕ дозволяє більш детально вивчити вплив різних факторів на перебіг демієлінізуючого процесу та запобігти летальності експериментальних тварин.

Для моделювання ЕАЕ використовували ад'ювант Фрейнда фірми Difco laboratories (Detroit, USA), який містить 2 мг мікобактерій туберкульозу на 1 мл ад'юванта. Кількість мікобактерій 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 інокуляції в обидві задні кінцівки.

Сформовано 6 груп тварин (табл. 1). 18 щурів з ЕАЕ внутрішньовенно чи субокципітально вводили у різних поєднаннях IL-10 та МСК, трансфіковані геном IL-10 згідно [4] та нетрансфіковані. Кожній тварині вводили 1 млн. ксеногенних МСК у 100 мкл фізіологічного розчи-



ну. При лікуванні ІЛ-10 кожній тварині вводили 0.1 мкг ІЛ-10 у фосфатному буфері загальною кількістю 100 мкл (Табл.1). У групі щурів №4 для субоципітального введення МСК разом з

інтерлейкіном 10, цитокін добавляли до 1 млн. клітин безпосередньо перед їх введенням у концентрації 1 мкг/мл, при цьому об'єм суміші залишався незмінним – 100 мкл.

Таблиця 1 – Розподіл тварин у експерименті

Група, №	Кількість тварин	Лікування
1	5	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2	4	Лікування ЕАЕ МСК (в кількості 1 млн в 100 мкл фіз.розчину) субоципітально на 17 добу
3	4	Лікування ЕАЕ ІЛ-10 (в кількості 1 мкг/мл) внутрішньовенно на 10 добу, ІЛ-10 субоципітально на 17 добу
4	5	Лікування ЕАЕ ІЛ-10 внутрішньовенно на 10 добу, ІЛ-10 та МСК субоципітально на 17 добу
5	5	Лікування ЕАЕ трансфікованими МСК (в кількості 1 млн в 100 мкл фіз.розчину) субоципітально на 17 добу

Для внутрішньовенного введення ІЛ-10 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 уведення суспензії.

Для субоципітального введення суспензії на 17 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 МСК (1 млн. нативних клітин).

Отримання ІЛ-10, МСК з Вартонових драглів пуповини людини, визначення їх проліферативної активності, життєздатності і вивчення фенотипових характеристик проводили співробітники Інституту молекулярної біології НАН України у відповідності до [15].

Клінічні спостереження за тваринами проводили до 65 доби. Для кожної тварини окремо визначали ступінь тяжкості в балах з урахуванням зовнішніх ознак та клінічного стану.

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, відразу після забою тварин проводили забір фрагментів тканини поперекових відділів спинного мозку розміром 1–2 мм³, фіксували в суміші 4% параформальдегіда, 2,5% глутаральдегіда і 4% сахарози на 0,1 молярному фосфатному буфері рН = 7,4 з наступною дофіксацією в 1% розчині чотирьохокису осмію [16] [Palladi, 1957], зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу і оксіпропілена і заливали в суміш епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками електронної мікроскопії [17]. Ультратонкі зрізи товщиною 70 нм виготовлялись на ультратомі ЛКВ [Швеція]. Для підвищення контрасту забарвлювалися за [18] і продивлялися в електронному мікроскопі ПЕМ 100-1 фірми „SELMI” (Україна) за прискорювальної напруги 75 кВ. Для прицільного ультратомування і поглибленішої оцінки одержаних даних з епоксидних блоків виготовлялись напівтонкі зрізи товщиною 100–150 нм, забарвлювалися метиленовим синім-піронином і продивлялися в світлооптичному мікроскопі AxioPhot фірми «OPTON» [Німеччина].

Оцінка ступеня демієлінізації, що спостерігалась в мієлінізованих нервових волокнах поперекового відділу спинного мозку, проводилась із застосуванням розробленого нами морфометричного критерію – коефіцієнта відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра [19] за допомогою морфометричної обробки поперечних напівтонких зрізів на комп'ютерному аналізаторі зображень



CAI-01ABH фірми „SELMI” [Україна] з використанням програмного забезпечення «Kappa opto-electronics GmbH» [Німеччина] при однаковому збільшенні (окуляр х 40, перехідник х 2, об'єктив х 10). Коефіцієнт відношення ширини мієлінової оболонки (МО) до діаметра осевого циліндра (ОЦ) визначався з розрахунку довільно взятих 30 мієлінізованих аксонів на 1 випадок за формулою: $МО/ОЦ$.

Для статистичної обробки отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних перевіряли за критерієм Шапіро–Уїлкі. Оскільки перевірка не підтвердила, що закон розподілу нормальний, для множинного міжгрупового порівняння середніх значень використовували непараметричний ранговий дискримінантний аналіз Краскела–Уолліса з подальшим застосуванням попарних порівнянь груп у діалозі тесту Краскела–Уолліса в STATISTICA 6.1, що еквівалентно множинним порівнянням за допомогою критерію U-Манна–Уїтні [20,21]. При цьому ураховували поправку Хольма–Бонферроні [22]. Реалізація процедури Хольма–Бонферроні виконана засобами MS Excel 2007.

Усереднені величини представляли у вигляді $M(25\%; 75\%) (n)$, де M – медіана; $(.)$ – інтерквартильний діапазон.

Статистичний аналіз і графічне представлення результатів виконували з використанням пакета програм STATISTICA 6.1.

Результати дослідження.

ЕАЕ (в подальшому – група порівняння) характеризується на електронно-мікроскопічному рівні деструктивними змінами клітин олігодендроглії та поширеною демієлінізацією, що є основною морфологічною ознакою енцефаломієліту і, за даними світової літератури та попередніх досліджень лабораторії електронної мікроскопії [1997–2011] є найвираженішою в спинному мозку експериментальних тварин на рівні поперекового відділу.

Олігодендроглія. На 35 добу в групі I ЕАЕ, в ділянках ураження найчастіше спостерігаються дегенеративні і деструктивні форми олігодендроцитів, що характеризуються різкою загальною осміюфілією клітини, де ледве вирізняються контури ядра. На тлі осміюфільної цитоплазми набухлі мітохондрії з втратою крист і різко розширений ЕПР виглядають просвітленими. Такі зміни відносяться до передапоптичних. Деструктивно змінений олігодендрогліоцит, як прави-

ло, оточений фрагментами дегенеруючих мієлінових волокон. Такі форми олігодендроглії часто зустрічаються в групі порівняння аж до 60 доби експерименту (рис.1.а). Зміни з боку клітин олігодендроглії експериментальних груп тварин у всі терміни дослідження носять поліморфний характер. Найчастіше зустрічаються реактивно змінені, і гіпертрофовані олігодендроцити. Цитоплазма олігодендрогліоцитів як правило, огортає кілька аксонів, окремі – новоутворені аксональні колатералі. Реактивно змінені форми олігодендроцитів, поряд з деструктивними, частіше представлені в групі дослідження III ЕАЕ + ІЛ-10, і характеризуються порівняно електронно-світлою цитоплазмою з розширеними каналцями і цистернами ЕПР і нечисленними набухлими мітохондріями і темним округлим або овальним ядром, заповненим як еу-, так глибокими гетерохроматину (Рис.1.в.). Гіпертрофовані олігодендрогліоцити в більшій мірі представлені в лікованих групах дослідження з використанням МСК. Ядро такої клітини овально-округлої форми, хроматин представлений як еу-, так і гетерохроматином, нерівномірно розподіленим по каріоплазмі. В окремих ядрах зустрічаються по 2 ядерець високоактивних типів – щільних або нуклеолонемних. Ядерно-цитоплазматичний індекс візуально зміщений у сторону цитоплазми. Канальці ЕПР дещо розширені. В цитоплазмі та на каналцях гранулярного ЕПР розташовані численні рибосоми. В цитоплазмі подекуди зустрічаються лізосоми. Великі порівняно осміюфільні округлі або довгасті мітохондрії характеризуються дещо набухлими кристами (рис.1.б,г).

Олігодендроцити групи V ЕАЕ + МСК(Т) на 60 добу дослідження вирізняються численними набухлими мітохондріями з фрагментацією крист, аж до часткової вакуолізації органел. Це все дозволяє оцінювати стан таких олігодендрогліоцитів як компенсаторне функціональне напруження [23]. Звертає на себе увагу і той факт, що кількість контактів окремих олігодендроцитів з мієліновими волокнами в площині зрізу в лікованих групах досягає 5 і більше (Рис.1.б, в, г, д). Наявність таких клітин засвідчує можливість здійснення ними нормальної мієлінізації. Встановлені нами зміни будови олігодендрогліоцитів можуть відображати зміни їх метаболізму і перебудову їх білок-синтезуючого апарату, зокрема, ядра та ядерець, ЕПР, апарату Гольджі, а також мітохондрій.



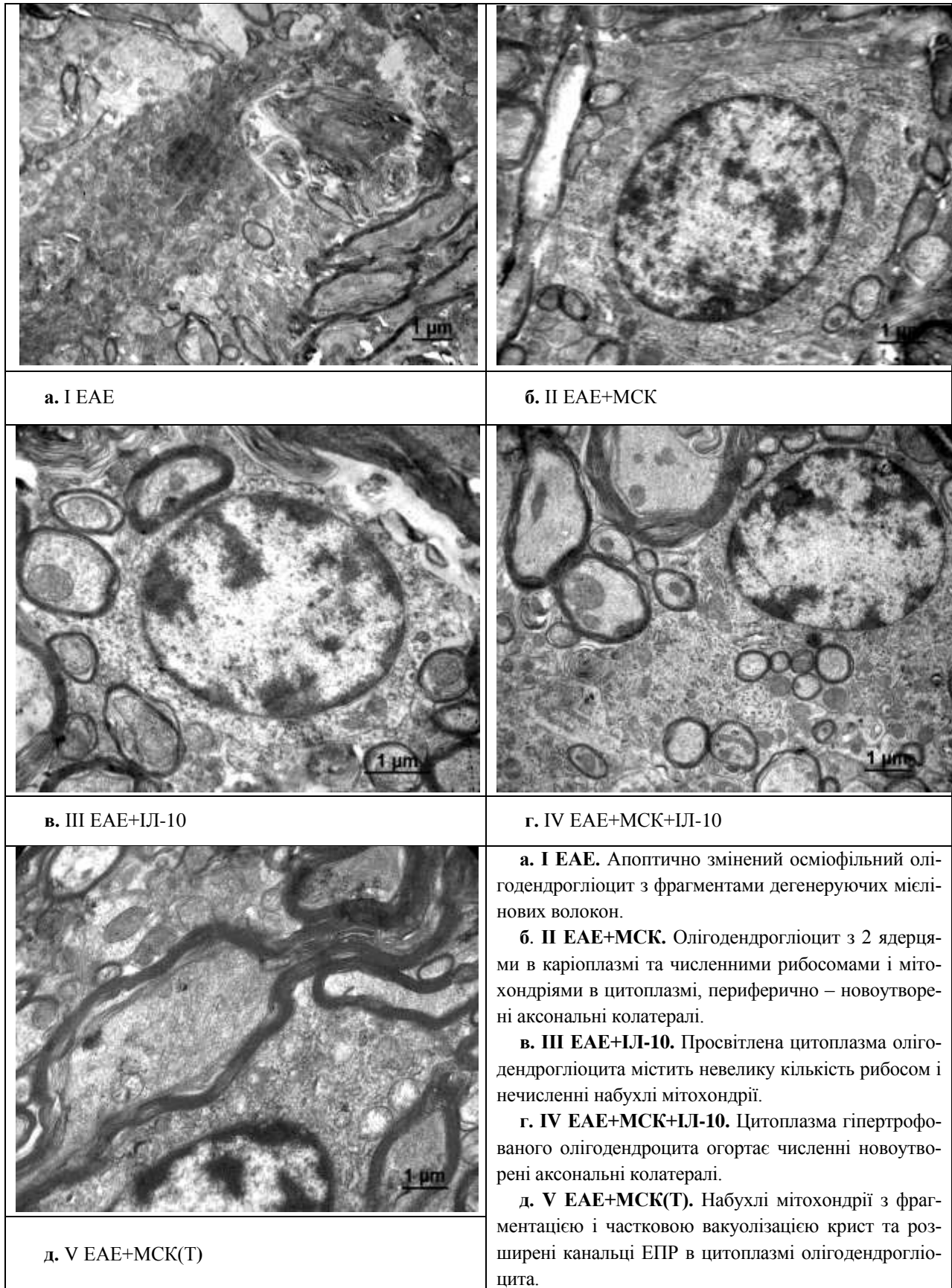


Рисунок 1 – Олігодендроглія. 60 доба. Електронні мікрофотографії

Де- і ремієлінізація. Електронно-мікроскопічне дослідження тканини спинного мозку щурів з ЕАЕ засвідчило поширену демієлінізацію осьових циліндрів на тлі помірного або значного периаksonального набряку. Внаслідок втрати частини цитоскелетних ультраструктур – мікротрубочок і нейрофіламентів, аксоплазма набуває часткового просвітлення. В той же час визначається різна ступінь набухання аксональних мітохондрій аж до повної їх вакуолізації. При цьому ушкодження мієлінової оболонки в даному експерименті характеризувалося вогнищевим розволокненням ламел, аж до часткового оголення осьового циліндру на тлі поширеного міжламелярного набряку; вогнищевим злипанням або частковим розщепленням і відшаруванням ламел з утворенням хвилястих або везикулярних форм. Периаksonально відмічена наявність великих вакуолей і фрагменти мієліноподібних структур (рис.2.а.).

Дослідження поперекового відділу спинного мозку тварин з індукованим ЕАЕ без лікування засвідчили, що і на 60 добу даного експерименту наростання ступеня виразності демієлінізації не виявили. Значним залишалось розволокнення мієлінових оболонок. Зберігалось порушення аксональних цитоскелетних структур, повна вакуолізація мітохондрій та помірний периаksonальний набряк (рис.3.а.).

Результати досліджень в лікованих групах відносно групи порівняння на 35 добу засвідчують зменшення ступеню та площі демієлінізації з одночасним частковим зниженням інтрамієлярного і майже повним – периаksonального набряку. Відмінності ультраструктури осьових циліндрів в лікованих групах в основному були зумовлені зниженням ступеня набухання аксонів і нормалізацією стану внутрішньоаксональних мітохондрій. Так в аксоплазмі груп дослідження II ЕАЕ + МСК і IV ЕАЕ + МСК + ІЛ-10 поряд з набухлими мітохондріями з частковою фрагментацією та вакуолізацією крист, характерна поява новоутворених невеликих осміюфільних органел зі щільними кристами (рис.2,3.б,г.). В групі V ЕАЕ + МСК(Т) на 60 добу дослідження крім вищеописаних змін ультраструктури мітохондрій ми виявили мітохондрії, кристи яких були закручені в спіралеподібну структуру при збереженні утворюючих її подвійних мем-

бран (рис.3.д). Деякі автори розглядали такі структури як гіпертрофовані регенеруючі мітохондрії, інші дослідники вважали наявність таких структур доказом дистрофічних змін клітин, зокрема, в м'язах і нирках, де їх присутність корелювала зі зниженою активністю цитохромоксидази [3, 4, 24]. Зниження активності цього ключового для мітохондрій ферменту, у свою чергу, може свідчити про те, що поява концентричних крист є морфологічною ознакою зниження енергетичних можливостей цих органел і клітини в цілому.

Периаksonальний набряк більшості мієлінізованих волокон груп дослідження II ЕАЕ + МСК і IV ЕАЕ + МСК + ІЛ-10, виявлявся на 35 добу дослідження і, в основному, зникав до 60 доби після початку експерименту. До 60 доби відмічалася і нормалізація ультраструктур цитоскелету значної кількості аксонів стосовно всіх лікованих груп, що ультраструктурно проявлялась у відновленні числа мікротрубочок і нейрофіламентів. Осібно стоїть група дослідження III ЕАЕ + ІЛ, де в жоден з термінів дослідження не було відмічено нормалізації структури мієлінових оболонок, а також група V ЕАЕ + МСК(Т) на 60 добу дослідження. При цьому мієлінові оболонки характеризувались ознаками суттєвого міжламелярного набряку з частковим порушенням впорядкованості ламел (рис.2.в,е; рис.3.в). Гістоархітектоніка мієлінізованих нервових волокон білої речовини поперекових відділів спинного мозку в залежності від групи і терміну дослідження представлена на рис.2 і 3.

Структурні ознаки ремієлінізації нервових волокон у всіх групах дослідження починали з'являтися вже на 35 добу дослідження, при цьому новоутворена мієлінова оболонка вирізнялася наявністю тоншого, чим в контролі шару мієліну, що можна трактувати як ознаку ремієлінізації. Ремієлінізація нервових волокон здійснювалась своєрідними відростками олігодендрогліоцитів в основному за рахунок утворення внутрішніх витків мієліну (рис.2.д,е.). Аксони в зоні ремієлінізації містили щільні, можливо, новоутворені, округлі мітохондрії з дещо набухлими кристами. Збільшення площі, зайнятої ремієлінізованими аксонами, відносно групи порівняння в більшій чи меншій мірі виявлялися на 60 добу в усіх лікованих групах дослідження.



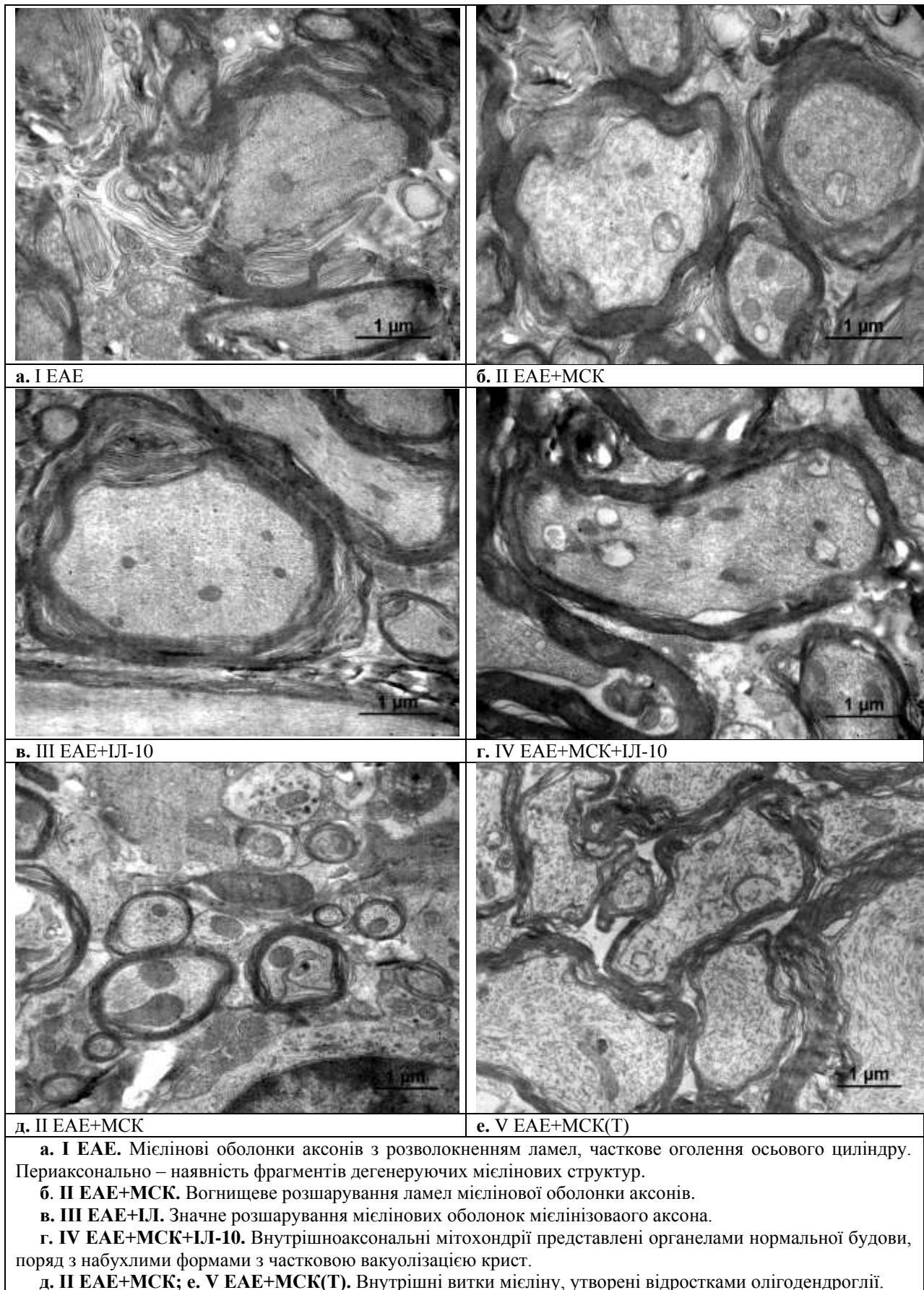


Рисунок 2 – Де- і ремієлінізація. 35 доба. Електронні мікрофотографії

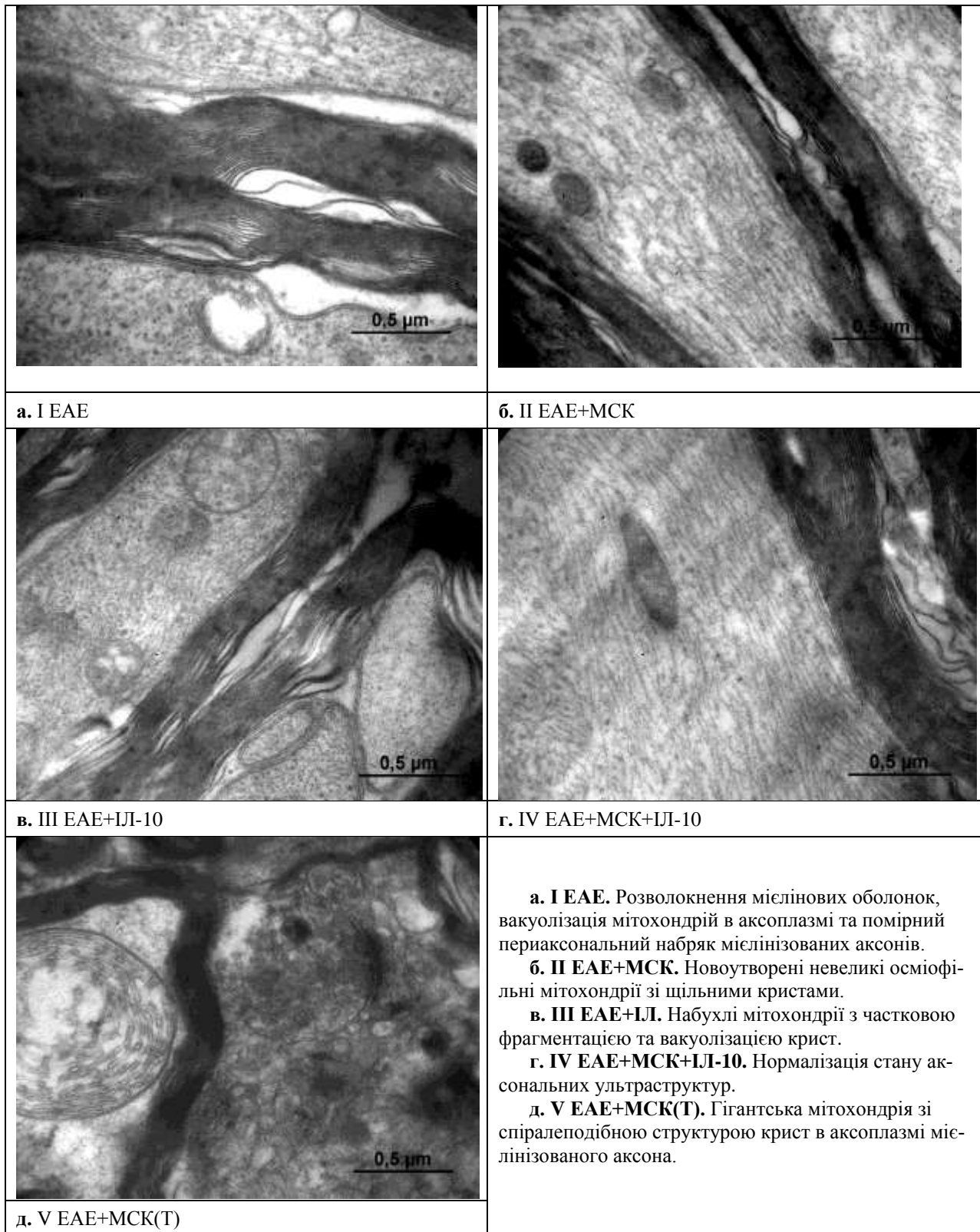
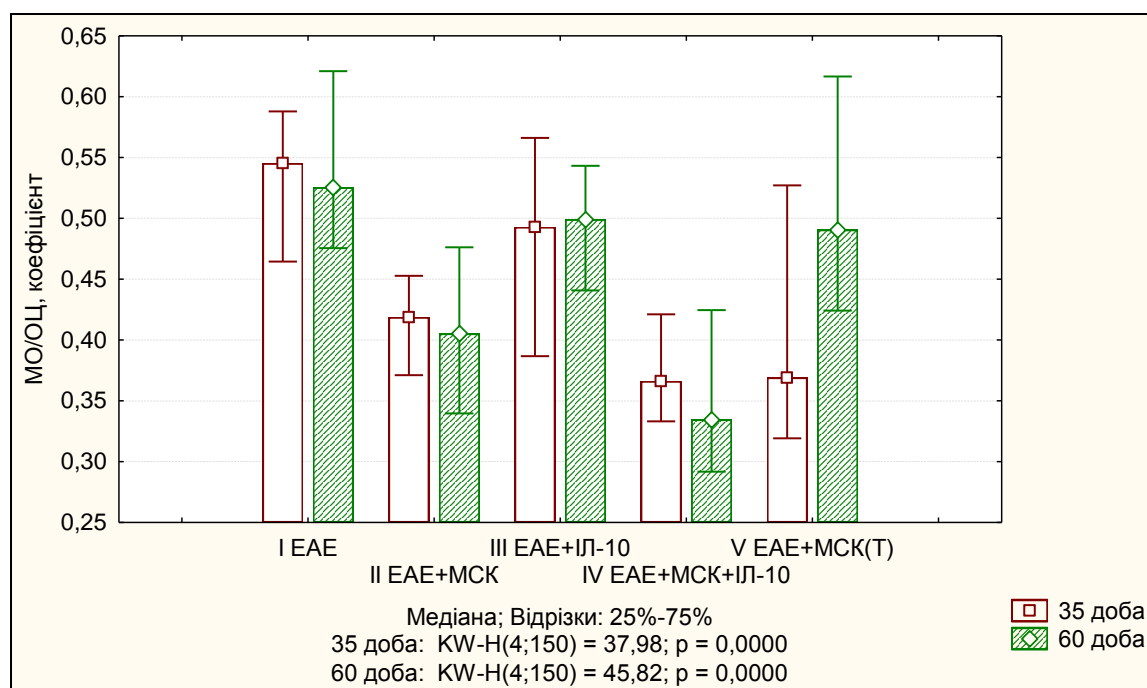


Рисунок 3 – Де- і ремієлінізація. Мітохондрії. 60 доба. Електронні мікрофотографії

Морфометрія. Для статистичного аналізу впливу різних схем клітинної терапії на морфофункціональний стан мієлінових оболонок нервових волокон білої речовини спинного мозку поперекових відділів щурів з модельованим ЕАЕ використовували ДА Краскела–Уолліса, згідно з яким для показника МО/ОЦ на 35 добу експерименту – $H(4, N = 150) = 37,98$, $p = 0,0000$; і, оскільки $p < 0,05$, то групи досліджен-

ня статистично високозначуще різняться між собою. При цьому за даними міжгрупового порівняльного аналізу, урахуовуючи поправку Хольма–Бонферроні, відносно групи з ЕАЕ на 35 добу спостерігається статистично значуща різниця між цією групою та всіма лікованими групами, за винятком групи дослідження III ЕАЕ + ІЛ-10 (графік 1).



Графік 1 – Динаміка змін коефіцієнту відношення товщини мієлінової оболонки до діаметра осевого циліндра у білій речовині спинного мозку щурів з ЕАЕ під впливом різних схем введення МСК та ІЛ-10

Так, в лікованих групах спостерігалось статистично значуще зниження показника МО/ОЦ відносно групи з модельованим ЕАЕ для групи II ЕАЕ + МСК в 1,3 разу (з 0,55 (0,46;0,59) до 0,42 (0,37;0,45), критерій U-Манна–Уїтні; $p = 0,002$), і для груп IV ЕАЕ + МСК + ІЛ та V ЕАЕ + МСК(T) – в 1,5 разу (відповідно до 0,37 (0,33;0,42) і до 0,37 (0,32; 0,52), критерій U-Манна–Уїтні; $p = 0,0000$). При цьому для групи III ЕАЕ + ІЛ-10 числовий показник МО/ОЦ виглядає дещо гіршим – 0,49 (0,39; 0,57), і є статистично незначущим за рахунок значного посилення ступеня розсіювання інтерквартильного розмаху. В групах II, IV і V прослідковується зв'язок між зниженням показника МО/ОЦ та зменшенням периаksonального і міжламлярного набряку та зниженням кількості патологічно змінених мієлінових оболонок в мієлінізованих аксонах на ультраструктурному рівні. В цей термін спостерігається статистично значуща

різниця між лікованими групами дослідження: IV ЕАЕ + МСК + ІЛ-10 і V ЕАЕ + МСК(T) відносно III ЕАЕ + ІЛ-10 (критерій U-Манна–Уїтні; відповідно $p = 0,005$; $p = 0,05$), при цьому між самими вищевказаними групами статистично значущих відмінностей немає.

На 60 добу, на відміну від попереднього терміну дослідження, суттєве посилення ступеня розсіювання показника МО/ОЦ відмічене у всіх групах, що вивчалися, морфологічним еквівалентом чого була поліморфність ультраструктурних змін мієлінізованих оболонок аксонів, що характеризуються як частковим розволокненням, гомогенізацією і порушенням впорядкованості ламел – ознаками демієлінізації, так і підвищенням впорядкованості останніх та наявністю численних нервових волокон з тоншим, чим в контролі, шаром мієліну – проявами ремієлінізації.



Згідно з ДА Краскела–Уолліса для показника МО/ОЦ на 60 добу експерименту – Н (4, N = 150) = 45,8; $p = 0,0000$; тобто групи дослідження, як і в попередній термін, статистично високочисельно різняться між собою. При цьому заданими міжгрупового порівняльного аналізу, зберігається статистично значуща різниця між групою порівняння I ЕАЕ та лікованими групами. Так показник МО/ОЦ для групи II ЕАЕ + МСК відносно I ЕАЕ знижувався в 1,3 разу (з 0,53 (0,48;0,62) до 0,41 (0,34;0,48); критерій U-Манна–Уїтні, $p = 0,0001$), а для групи IV ЕАЕ + МСК + ІЛ-10 – в 1,6 разу (до 0,33 (0,29;0,42); критерій U-Манна–Уїтні, $p = 0,0000$). Між групою порівняння та групами III ЕАЕ + ІЛ і V ЕАЕ + МСК(Т) показник МО/ОЦ знижувався всього в 1,1 разу (відповідно до 0,50 (0,44; 0,54) і до 0,49 (0,42; 0,62)), і статистично значущої різниці не виявляв. В цей термін дослідження, як і в попередній, наявні статистично значущі відмінності між групою III ЕАЕ + ІЛ-10 та ін-

шими лікованими групами (критерій U-Манна–Уїтні, для II ЕАЕ + МСК і IV ЕАЕ + МСК + ІЛ-10 відповідно $p = 0,02$, і $p = 0,0001$), крім групи V ЕАЕ + МСК(Т), що до 60 доби показала досить значне статистично значуще зростання показника МО/ОЦ відносно 35 доби – в 1,3 разу (критерій U-Манна–Уїтні, $p = 0,001$).

Загалом, в цьому експерименті в групах з модельованим ЕАЕ в терміни дослідження 35 і 60 діб числові значення коефіцієнта МО/ОЦ майже не відрізнялися і між ними немає статистично значущих відмінностей. Так само, серед лікованих груп, за винятком групи V ЕАЕ + МСК(Т), в різні терміни дослідження зниження коефіцієнта МО/ОЦ відносно групи порівняння було несуттєвим і статистично незначущим.

Таким чином, найвагомішим фактом, встановленим нами, є значне зменшення коефіцієнта МО/ОЦ в лікованих групах відносно групи порівняння в усі терміни експерименту.

Висновки

Отже, вивчення структурних ознак демієлінізації за умов лікування тварин з ЕАЕ різними схемами введення МСК та ІЛ-10 дозволяє узагальнити дані і припустити, що:

- МСК демонструють позитивний вплив вже у ранні терміни дослідження, морфологічним проявом чого є зниження ступеня міжламлярного і периаksonального набряку та сприяють активації процесу ремієлінізації.

- В лікованих групах процес демієлінізації призупиняється за деяким винятком групи ЕАЕ + ІЛ-10, відносно групи порівняння, почи-

наючи з терміну дослідження 35 діб.

- Введений у ліквор субокипітально ІЛ-10 не справляє впливу, ознаки якого мають статистичну значущість, однак при комплексному застосуванні демонструє підсилення й потенціювання дії МСК

Слід зауважити, що навіть у віддалені терміни від початку експерименту морфологічні дослідження засвідчили не повну нормалізацію ультраструктурної організації мієлінізованих аксонів і клітинних елементів речовини спинного мозку в лікованих групах.

References (список літератури)

1. Starzl TE. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14607-14. doi: 10.1073/pnas.0404829101. PMID: 15319473. PMCID: PMC521985.
2. Pichkur LD, Verbovskaya SA, Akinola ST, Chitaeva GE. [The main pathogenetic mechanisms of the demyelination process in the central nervous system and the possibility of its correction.] *Ukr. neurological journal*. 2017;(2):12–19. Ukrainian. http://www.ukrneuroj.com.ua/svzhij_nomer.php?nid=43.
3. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, [et al] Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2624-35. doi: 10.1002/stem.194. PubMed PMID: 19676124.
4. Kovalchuk MV, Deryabina OG, Pichkur LD, Verbovskaya SA et al. Distribution of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly in the central nervous systems of the EAE rats. *Biopolymers and Cell*. 2015;31(5):371 – 378. doi: 10.7124/bc.0008F9.
5. Tsymbaliuk VI, Velychko OM, Pichkur OL, Verbovska SA et al. Effects of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and interleukin-10 on behavioral responses of rats with experimental allergic



- encephalomyelitis. *Cell and organ transplantation*. 2015; 3(1): 40-45. <http://transplantation.org/2015-3-1-uk/article-4>.
6. Theotokis P, Kleopa KA, Touloumi O, Lagoudaki R et al. Connexin43 and connexin47 alterations after neural precursor cells transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*. 2015 Oct;63(10):1772-83. doi: 10.1002/glia.22843. Epub 2015 Apr 27. DOI: 10.1002/glia.22843. PMID: 25914045.
 7. Muja N, Cohen M, Zhang J, Kim H et al. Neural precursors exhibit distinctly different patterns of cell migration upon transplantation during either the acute or chronic phase of EAE: A serial MR imaging study. *Magn Reson Med*. 2011 Jun;65(6):1738-49. doi: 10.1002/mrm.22757. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21305597 PMCID: PMC3190231.
 8. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell induce Th2 polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009 Aug 15;57(11):1192-203. doi: 10.1002/glia.20841. PMID: 19191336 PMCID: PMC2706928.
 9. Barhum Y, Gai-Castro S, Bahat-Stromza M, Barzilay R et al. Intracerebroventricular transplantation of human mesenchymal stem cells induced neurotrophic factors attenuates clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2010 May;41(1):129-37. doi: 10.1007/s12031-009-9302-8. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19902385.
 10. Fedulov AS, Borisov AV, Moskovskikh YV, Zafranskaya MM. et al. [Autologichnaya transplantatsiya mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok kak metod modifikatsii klinicheskogo techeniya rasseyannogo skleroza] *Nevrologiya i neyrokhirurgiya. Vostochnaya Yevropa*. 2016;4:516-22. ISSN 2226-0838.
 11. Zheleznikova GF, Scripchenko NV, Ivanova GP, Surovzeva AV et al. [Faktery immunopatogeneza rasseyannogo skleroza] *Ros. Immunolog. zhurn*. 2015;9(3):261-82. ISSN: 1028-7221. <https://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1554991&selid=25474994>.
 12. Zafranskaya MM, Nizheharodava DB, Ivanchyk HI, Borisov AV et al. [Dinamika tsitokinov u patsiyentov s rasseyannym sklerozom do i posle kletochnoy terapii.] *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2014; 3:82-91. ISSN: 2412-320X. DOI: 10.14427/jipai.2014.3.82. <https://elibrary.ru/item.asp?id=22860604>.
 13. Shchokina EG, Shtrygol SY, Drogovoz SM. Achievements and Prospects of Cytokine and Anti-Cytokine Therapy. *Scientific Journal of the Ministry of Health of Ukraine*. 2013;1(2): 121-29. http://irbis-nbuv.gov.ua/.../cgiirbis_64.exe?..
 14. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*. 2015 Dec 10;11(6):1164-78. doi: 10.5114/aoms.2015.56342. Epub 2015 Dec 11. PMID: 26788077 PMCID: PMC4697050.
 15. Tsymbaliuk V, Deriabina E, Shuvalova N, Maslova O. et al. [Phenotypical changes and proliferative potential of mesenchymal stem cells from humans Wharton's jelly in the cultivation conditions.] *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2015;(2):17-24. Ukrainian. doi: 10.25305/unj.45290.
 16. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med*. 1952 Mar;95(3):285-98. PMID: 14927794 PMCID: PMC2212069.
 17. Gayyer G. *Elektronnaya gistokhimiya*. Per. s nem. M.: Mir, 1974. 488 p. http://www.studmed.ru/gayer-g-elektronnaya-gistohimiya_362a532de03.html.
 18. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963 Apr;17:208-12. PMID: 13986422 PMCID: PMC2106263.
 19. Tsymbalyuk VI, Markova OV, Pichkur LD, Vaslovych VV et al., vynakhidnyky; Natsionalnyy medychnyy universytet, patentovlasnyk. [Sposib otsinky stupenya demiyelinizatsiyi aksoniv pry eksperymentalnomu alerhichnomu entsefalomiyeliti] Patent Ukrayiny 17499. 2006. Ver 15.
 20. Rebrova OYu. [Statistical analysis of medical data. Application of the



- application package STATISTICA.] М.: Media Sphere; 2002. http://www.studmed.ru/rebrova-oyu-statisticheskij-analiz-medicinskih-dannyh_0149fe87d1d.html. Russian.
21. Shabanov DA. [Onlayn-konspekt kursa "Biometricheskaya obrabotka dannykh v zoologii i ekologii"]. 2011. adres dostupa: <https://batrachos.com/biometria>.
 22. Mastitskiy SE, Shitikov VK. [Statisticheskij analiz i vizualizatsiya dannykh s pomoshch'yu R.] 2014. Elektronnaya kniga, adres dostupa: <http://r-analytics.blogspot.com>. http://www.soc.univ.kiev.ua/sites/default/files/library/eload/mastitsky_and_shitikov_2014_r_tutorials.pdf.
 23. Polenov AL, Onishchenko IL, Krasnovskaya IA. [Morfofunktsional'nyy analiz yadernogo apparata nonapeptidergicheskikh neyrosekretornykh kletok gipotalamusa pozvonochnykh] *Tsitologiya*. 1996;38(1):28-38.
 24. Schröder JM, Sommer C. Mitochondrial abnormalities in human sural nerves: fine structural evaluation of cases with mitochondrial myopathy, hereditary and non-hereditary neuropathies and review of the literature. *Acta Neuropathol*. 1991;82(6):471-82. PMID: 1785260.

(received 19.02.2018, published online 01.04.2018)

(одержано 19.02.2018, опубліковано 01.04.2018)

