

**Conclusions.** The eosinophil cationic protein level depends on the severity and activity of allergic inflammation in patients with pollen disease against the background of cholesterol imbibition of gallbladder and can be used for objective monitoring the allergen immunotherapy effectiveness.

**Key words:** pollen disease, cholesterol imbibition of gallbladder, eosinophil cationic protein, allergen immunotherapy.

**Ведомости об авторах:**

**Немировская Наталья Владимировна** - ассистент кафедры клинической, лабораторной иммунологии и аллергологии НМАПО имени П.Л.Шупика. Адрес: Киев, ул. Дорогожицкая, 9; Городская клиническая больница № 8, ул.Кондратюка, 8.

**УДК 616-056.3**

© КОЛЕКТИВ АТОРІВ, 2014

***В.А.Руденко, І.О.Гнедкова, Л.Д.Пічкур,  
С.А.Вербовська, Я.О.Похоленко***

**ВПЛИВ КСЕНОГЕННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ  
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА  
IL-10 НА ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У  
ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ  
ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТОМ  
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад.  
А.П. Ромоданова НАМН України»**

**Вступ.** Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) – експериментальна модель, яка має певні загальні риси з перебігом розсіяного склерозу (РС) у людей, що дозволяє використовувати її для з'ясування деяких ланок патогенезу РС та пошуку засобів його лікування. Останнім часом увага дослідників зосереджена на вивченні властивостей мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які здійснюють імуносупресивний ефект, проявляють нейропротективні властивості та на різних способах їх введення при індукованому ЕАЕ.

**Мета.** Дослідити функціональну активність лімфоцитів, супресорів макрофагально/моноцитарного ряду, нейтрофілів периферичної крові у щурів з ЕАЕ та у щурів з ЕАЕ після лікування нативними ксеногенними МСК у комбінації з інтерлейкіном – 10 (IL-10).

**Матеріали і методи.** Індукція ЕАЕ здійснена на білих щурах. Субоципітально вводили МСК у кількості 1x10<sup>6</sup> клітин та 0,1 мкг IL-10 в об'ємі 0,1 мл. Функціональну активність Т-, В- лімфоцитів оцінювали в реакції бласттрансформації лімфоцитів, нейтрофілів – за активністю внутрішнь-клеточної мієлопероксидази.

**Результати.** Виявлено, що у тварин з ЕАЕ та після проведеного лікувальня субоципітальним введенням ксеногенних МСК та IL-10 переважають зміни в активності Т-лімфоцитів (головним чином пригнічення їх функції) і ці зміни зберігаються тривалий період. МСК поглиблюють зниження проліферації Т-лімфоцитів та активності МП нейтрофілів периферичної крові щурів з ЕАЕ. Введення IL-10 спричинює активацію Т-клітин і нейтрофілів. Лікування ЕАЕ комбінацією IL-10 з ксеногенними МСК призводить до порушення функції супресорів моноцитарно/макрофагального ряду.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, експериментальний алергічний енцефаломієліт, інтерлейкін-10, функціональна активність, імунокомпетентні клітини.

### **ВСТУП**

Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) – експериментальна модель, яка має деякі загальні риси з перебігом розсіяного склерозу (РС) у людей, і частково відображає механізми розвитку запалення, наростання і регресу неврологічної симптоматики. Це, в свою чергу, дозволяє використовувати цю модель для з'ясування деяких ланок патогенезу РС, та пошуку засобів його лікування (8,9).

Пошук методів лікування нейрозапальних демієлінізуючих процесів, у тому числі РС людини, зосереджується на таких, які приводять до згасання нейроаутоімунних процесів шляхом імуномодуляції, імуносупресії та інших механізмів, а також до активації репаративних процесів в центральній нервовій системі. Останнім часом увага дослідників зосереджена на вивченні властивостей мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та різних способах їх введення при індукованому ЕАЕ (7).

**Мета роботи** - дослідити функціональну активність лімфоцитів, супресорів макрофагально/моноцитарного ряду, нейтрофілів периферичної крові у щурів з ЕАЕ та з ЕАЕ після лікування нативними ксеногенними МСК у комбінації з інтерлейкіном – 10 (IL-10).

### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Дослідження проведено на білих щурах. ЕАЕ індукували гомогенатом спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (фірма «Sigma» USA) у відповідності до рекомендацій Давидової С.Г.(1). Були досліджені наступні групи експериментальних тварин: 1 група –ЕАЕ без лікування; 2 група - лікування щурів з ЕАЕ МСК субоципітально на 17 добу від початку індукції; 3 група – лікування щурів з ЕАЕ IL-10 внутрішньовенно (в/в) на 10 добу та субоципітально на 17 добу; 4 група – лікування щурів з ЕАЕ IL-10 в/в на 10 добу та IL-10 разом із МСК субоципітально на 17 добу.

МСК отримували із пуповини людини. Методика розроблена в ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМНУ» (3). Для введення МСК щурам використовували другий пасаж клітин поза організмом, вводили МСК у кількості  $1 \times 10^6$  клітин у об'ємі 0,1 мл. IL-10 людини, отриманий в ДУ «Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ» вводили в кількості 0,1 мг у об'ємі 0,1 мл. МСК  $1 \times 10^6$  разом із IL-10 (0,1 мкг) вводили в об'ємі 0,1 мл.

Визначення проліферативної активності лімфоцитів здійснювали в реакції бласттрансформації лімфоцитів та Т-клітинні мітогени: ФГА (5 мкг/мл), Con A (5 мкг/мл), В-мітоген: декстран (100 мкг/мл). Для оцінки супресорної активності моноцитів/макрофагів у паралельних пробах, стимульованих ФГА, додавали індометацин (10 мкг/мл), який блокував синтез простагландинів. Метод визначення активності внутрішньоклітинної мієлопероксидази (М.П.) нейтрофілів крові проводили за методикою Саїдова М.З. та Пінегіна Б.П. (4). Вірогідність відмінностей показників визначали за критерієм Стьюдента.

У експериментальних тварин з індукованим ЕАЕ у фазу регресу неврологічної симптоматики (35 доба після індукції ЕАЕ) проліферативна відповідь лімфоцитів периферичної крові на Т-клітинні мітогени Con A і ФГА була достовірно зниженою порівняно з інтактними тваринами (Табл.1,2). Таке пригнічення функції Т-лімфоцитів зберігалось і на 63 добу дослідження. При введенні МСК щурам з індукованим ЕАЕ відмічалось збереження низького рівня проліферації лімфоцитів периферичної крові на Т-клітинні мітогени (ФГА, Con A) як на 35 так і на 63 добу дослідження.

У той же час, двоетапне введення ІЛ-10 спричинює на 35 добу активацію проліферації Т-лімфоцитів периферичної крові щурів до значень, які перевищують відповідні середні показники інтактних тварин та достовірно перевищують відповідні значення у групах щурів з ЕАЕ та ЕАЕ з введенням МСК. На 63 добу дослідження знову визначаються показники проліферації Т-лімфоцитів нижчі за контрольні, але вищі ніж у 1 та 2 групах тварин.

Комбіноване лікування щурів з індукованим ЕАЕ МСК та ІЛ-10 ( 4 група) супроводжується недостовірним пригніченням функції Т-клітин на Con A на 35 і на 63 добу дослідження, та достовірним зниженням проліферації лімфоцитів на ФГА на 63 добу дослідження.

**Таблиця 1**

**Проліферативна активність лімфоцитів периферичної крові щурів після різних схем лікування на 35 добу після індукції ЕАЕ ( M±m)**

Групи	Бласттрансформація лімфоцитів на Т-мітогени		Індекс індометацинчутливої супресії	Проліферативна відповідь на В-мітоген
	Con A %	ФГА %		
1 група (n=4)	33,1±4,9*	25,2±4,4*	1,4±0,89	52,7±4,5
2 група (n=4)	30,2±4,1	24,7±4,1*	1,22±0,21	36,7±7,1
3 група (n=4)	50,7±5,1**	59,7±5,1* **	1,2±0,11	60,2±4,1
4 група (n=4)	39,5±2,9	37,7±4,9	0,97±0,05*	55,1±1,5
Інтактні тварини (n=5)	45,5±4,1	44,4±5,1	1,3±0,11	58,6±4,5

**Примітка:** \* вірогідність відмінностей, по відношенню до групи інтактних

тварин  $p < 0.01$ ; \*\* вірогідність відмінностей між різними досліджуваними групами тварин  $p < 0,01$ .

Активність індометацинчутливих супресорів в групах тварин, які досліджувались, в усі терміни спостереження змінюється в межах близьких до контрольних значень, крім групи тварин з проведеним комбінованим лікуванням МСК та ІL-10, в якій визначається порушення функції супресорів моноцитарно/макрофагального ряду (табл. 1, 2).

Проліферативна активність В-лімфоцитів на декстран (табл. 1, 2) у групі тварин з індукованим ЕАЕ у фазу регресу неврологічної симптоматики відповідає контрольним значенням інтактних тварин, але достовірно пригнічується на 63 добу спостереження. Введення тваринам МСК пригнічує функцію В-клітин тільки на 35 добу спостереження.

**Таблиця 2**  
**Проліферативна активність лімфоцитів периферичної крові щурів після різних схем лікування на 63 -у добу після індукції ЕАЕ**

Групи	Проліферативна відповідь на Т-мітогени		Індекс індометацинчутливої супресії	Проліферативна відповідь на В-мітоген
	Соп А%	ФГА%	лічс	Декстран %
1 група (n=4)	28,1±3,1*	27,8±1,2*	1,14±0,24	29,1±4,1*,**
2 група (n=4)	24,1±3,1*	26,5±2,9*	1,17±0,24	51,7±5,1
3 група (n=4)	33,5±4,1	35,1±2,1	1,2±0,11	46,2±4,1
4 група (n=4)	38,5±3,1	28,5±1,8*	1,19±0,21	50,5±4,1
Інтактні тварини (n=5)	45,5±4,1	44,4±5,1	1,3±0,11	58,6±4,5

**Примітка:** \* вірогідність відмінностей, по відношенню до групи інтактних тварин  $p < 0.01$ ; \*\* вірогідність відмінностей між різними досліджуваними групами тварин  $p < 0,01$

Лікування щурів з індукованим ЕАЕ введенням ІL-10 та комбіновано МСК з ІL-10 достовірних змін активності В-лімфоцитів не викликає.

Оцінка стану неспецифічних реакцій, які відіграють певну роль при розвитку запальних процесів у мозку за даними визначення функції нейтрофілів показала різнонаправлений ефект від введення МСК та ІL10 (табл. 3).

Функція нейтрофілів за даними активності внутрішньоклітинної МП нейтрофілів у щурів з ЕАЕ на етапі регресу клінічної симптоматики вірогідно не змінюється порівняно з контрольним значеннями.

Таблиця 3

## Активність мієлопероксидази нейтрофілів периферичної крові щурів з ЕАЕ після різних схем лікування(M+m) ум.од.

Групи тварин	Група 1 (n=4)	Група 2 (n=4)	Група 3 (n=4)	Група 4 (n=4)	Інтактні тварини, n=5
35 доба	19,4±3,46	15,12±1,80	33,78±1,28*,**	18,81±1,88	20,11±2,1
63 доба	16,91±0,65	13,61±3,54	22,19±1,25*,**	15,76±2,06	20,11±2,1

**Примітка:** \* вірогідність відмінностей, по відношенню до групи інтактних тварин  $p < 0.05$ , \*\*вірогідність відмінностей між різними досліджуваними групами тварин  $p < 0,05$

Введення МСК дещо пригнічує активність МП нейтрофілів і на 35 і на 63 добу дослідження. В той же час, ефект від введення МСК разом із ІL10 і на 35 і на 63 добу після індукції ЕАЕ не відрізняється від групи щурів з індукованим ЕАЕ. Не зовсім зрозумілим є вплив на функцію нейтрофілів у щурів з ЕАЕ дворазового введення ІL10 (в/в на 10 та субокипітального на 17 добу). У терміни обстеження на 35 і на 63 добу показники активності МП нейтрофілів вірогідно перевищують значення активності МП нейтрофілів на 35 добу як контрольних значень, так і щурів з ЕАЕ та лікованих МСК, а на 63 добу – всіх експериментальних груп, за винятком контрольної.

Отримані результати носять попередній характер, але вказують на те, що:

- при індукції ЕАЕ та після проведених лікувальних заходах переважають зміни функціональної активності Т-лімфоцитів (переважно пригнічення функції Т-клітин) і ці зміни зберігаються тривалий період.

- Трансплантація нативних ксеногенних МСК супроводжується збереженням низького рівня проліферації Т-лімфоцитів периферичної крові щурів з ЕАЕ, що може вказувати на низький рівень продукції прозапальних цитокінів.

- Лікування тварин з індукованим ЕАЕ ІL10 спричинює активацію імункомпетентних клітин, а саме Т-клітин і нейтрофілів, що побічно вказує на підвищення продукції прозапальних і антизапальних цитокінів. З точки зору імунопатогенезу ЕАЕ така імунна відповідь може характеризувати ремітуючий характер перебігу захворювання.

- Лікування ЕАЕ комбінацією ІL10 з ксеногенними МСК призводить до порушення функції супресорів моноцитарно/макрофагального ряду.

- Пригнічення функції В-лімфоцитів при розвитку ЕАЕ відбувається у віддалений термін - на 63 добу.

В багатьох роботах та оглядах присвячених функції МСК, і зокрема їх імуносупресивній дії, зазначається що здійсненні такого ефекту реалізується як через прямі міжклітинні взаємодії між МСК та імунними клітинами, так і через секрецію МСК імунорегуляторних цитокінів (2).

Очевидно, що при оцінці отриманих нами даних також необхідно враховувати, що лікувальні засоби (МСК, ІL-10) вводили субоцкпітально, тобто минаючи гемато-енцефалічний бар'єр і цим створювалась можливість безпосереднього впливу ІL-10 та цитокінів, що продукуються МСК на центри, які регулюють взаємодію між периферичними імункомпетентними органами та ЦНС, і які відіграють провідну роль в модуляції нейрозапалення та в ініціації розвитку та прогресії деяких неврологічних захворювань (5,6). Крім того при такому сумісному введенні важко врахувати вплив ІL-10 на функцію МСК. Подальші дослідження розкриють ці механізми більш широко.

### Література

1. Давыдова Г.С. Применение адьюванта с различным качеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Г.С.Давыдова // Острый энцефаломиеелит в эксперименте и клинике. - Минск: Наука и техника, 1969.-С. 32-37.

2. Лисяный Н.И. Иммуносупрессивные и антигенные свойства мезенхимальных стволовых клеток // Імунологія та алергологія: Наука і практика. –2012.–№4.–С.4-11.

3. Патент 74171, Україна, МПК С12N 5/00. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з матриксу пуповини людини / Маслова О.О., Шувалова Н.С., Сухорада О.М., Дерябіна О.Г., Кордюм В.А. (UA); заявник та патентовласник ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН У» (UA). – № u201201939; заявл. 21.02.2012; опубл. 25.10.2012, Бюл. № 13.

4. Саидов М.З. Спектрофотометрический способ определе-ния активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках / Саидов М.З., Пинегин Б.П. // Лаб. Дело.-1991.-№3.-С.56-60.

5. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury / Zhang R., Liu Y., Yan K. [et al.] // J. Neuroinflammation. – 2013. – № 10. - P. 106. Published online Aug 23, 2013. doi: 10.1186/1742-2094-10-106.

6. Interleukin-10 modulates the synthesis of inflammatory mediators in the sensory circumventricular organs: implications for the regulation of fever and sickness behaviors. / Harden L.M., Rummel C., Luheshi G.N. [et al.] // J. Neuroinflammation. – 2013. - N 10. - P. 22. Published online Feb 6, 2013. doi: 10.1186/1742-2094-10-22.

7. Jumah M.A. Al. The immunomodulatory and neuroprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): A model of multiple sclerosis (MS) / Jumah M.A. Al., A.H. Abumaree. // Int. J. Mol. Sci.-2012.-Vol.13, №7.-P. 9296-9331.

8. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells / Klose J., Nils Schmidt O., Melms A. [et al.] // J. Neuroinflammation. – 2013. -N 10. - P. 117. Published online Sep 22, 2013. doi: 10.1186/1742-2094-10-117.

9. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy of multiple sclerosis / J.J.Auletta, A.Barthlomew, R. Mariarz [et al.] // Immunotherapy.-2012.-Vol. 4, №5.-P.529-547.

*В.А.Руденко, И.А.Гнедкова, Л.Д.Пичкур,  
С.А.Вербовская, Я.А. Похолоенко*

**Влияние ксеногенной трансплантации мезенхимальных  
стволовых клеток и IL-10 на показатели клеточного  
иммунитета у крыс с экспериментальным аллергическим  
энцефаломиелитом**

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

**Введение.** Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) – экспериментальная модель, имеющая некоторые общие черты с течением рассеянного склероза у людей (РС), что позволяет использовать ее для выяснения некоторых звеньев патогенеза РС и поиска способов его лечения. Последнее время внимание исследователей сосредоточено на изучении свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые проявляют иммуносупрессивные, нейропротективные свойства и на различных способах их введения при индуцированном ЭАЭ.

**Цель.** Изучить функциональную активность лимфоцитов, супрессоров моноцитарно/макрофагального ряда, нейтрофилов периферической крови крыс с ЭАЭ и крыс с ЭАЭ после лечения нативными ксеногенными МСК в комбинации с интерлейкином-10 (IL-10) .

**Материалы и методы.** Индукция ЭАЭ а проводилась на белых крысах. Субокипитально вводили МСК в количестве  $1 \times 10^6$  клеток и 0,1 мкг IL-10 в объеме 0,1 мл. Функциональную активность Т-, В- лимфоцитов оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов, нейтрофилов – по активности внутриклеточной миелопероксидазы.

**Результаты.** Выявлено, что у животных с ЭАЭ и после проведенного лечения субокипитальным введением ксеногенных МСК и IL-10 превалируют изменения в функциональной активности Т-лимфоцитов (в основном угнетение их функции) и эти изменения сохраняются длительный период. МСК усугубляют снижение пролиферации Т-лимфоцитов и активности МП нейтрофилов периферической крови крыс с ЭАЭ. Введение IL-10 способствует активации Т-клеток и нейтрофилов. Лечение ЭАЭ комбинацией IL-10 с ксеногенными МСК ведет к нарушению функции супрессоров моноцитарно/макрофагального ряда.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, интерлейкин-10, функциональная активность, иммунокомпетентные клетки.

**V. Rudenko, I. Gnedkova, L. Pichkur, S. Verbovska, Ya. Pokholenko**  
**Influence of xenogenic transplantation of mesenchymal stem cells and IL- 10 on cellular immunity in rats with experimental allergic encephalomyelitis**

**The State Insititution Institute of neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of AMS of Ukraine**

**Introduction.** Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is an experimental model, which has some similarities with multiple sclerosis in humans (MS). This makes possible to use EAE for investigating MS pathogenesis and determining its proper treatment. Recently, researchers' attention is focused on the study of the properties of mesenchymal stem cells (MSCs), which has an immunosuppressive effect and neuroprotective properties, and various methods of administration at induced EAE.

**Aim.** To study the functional activity of lymphocytes, monocyte/macrophage suppressors, peripheral blood neutrophils in rats with EAE and rats with EAE after treatment by native xenogeneic mesenchymal stem cells in combination with IL- 10.

**Materials and Methods.** Experimental allergic encephalomyelitis was induced in white rats. MSCs and IL- 10 were injected via suboccipital puncture: MSCs in an amount of  $1 \times 10^6$  cells and 0.1 mcg, IL-10 in a volume of 0.1 ml. There were measured T- and B- lymphocytes blast-transformation reaction and neutrophils intracellular myeloperoxidase.

**Results.** The changes in functional activity of T-lymphocytes (mainly inhibition of their function) were found to be prevalent in animals with EAE and after treatment by xenogenic MSCs and IL-10. These changes remain for a long period. MSCs exacerbate decreased proliferation of T - lymphocytes and the activity of peripheral blood neutrophils myeloperoxidase in rats with EAE. IL -10 promotes activation of T cells and neutrophils. The treatment of EAE by IL-10 and xenogeneic MSCs combination leads to dysfunction of monocyte/macrophage suppressors.

**Key words:** mesenchymal stem cells, experimental allergic encephalomyelitis, IL-10, functional activity, immunocompetent cells.

**Відомості про авторів:**

**Руденко Валентина Андріївна** - пров. н. с. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: Київ, вул. П.Майбороди, 32.

**Гнедкова Ірина Олександрівна** – с.н.с. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: Київ, вул. П.Майбороди, 32.

**Пічкур Леонід Дмитрович** – пров. н. с. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: Київ, вул. П.Майбороди, 32.

**Вербовська Світлана Анатоліївна** – н. с. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: Київ, вул. П.Майбороди, 32.

**Похолєнко Яніна Олександрівна** – н. с. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: Київ, вул. П.Майбороди, 32.