

*В.А.Руденко, Л.М.Бєльська, І.О.Гнєдкова, О.Л.Пічкур,
С.А.Вєрбовська, Я.О.Похоленко*

КСЕНОГЕННА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТРАНСФІКОВАНИХ ГЕНОМ ІЛ-10 ЯК МЕТОД КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТА

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

Вступ. Експериментальне вивчення механізмів впливу та можливостей використання мезенхімальних стовбурових клітин і протизапальних цитокінів при нейродегенеративній патології ЦНС є важливим етапом для вибору обґрунтованої лікувальної тактики.

Мета. Дослідити функціональну активність Т- і В-клітин периферичної крові, розвиток клітинних і гуморальних нейроаутоімунних реакцій у щурів з індукованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) при лікуванні ксеногенними мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК) трансфікованими геном інтерлейкіна- 10 (ІЛ-10).

Матеріали і методи. Щури з індукованим ЕАЕ. Визначали проліферативну активність Т- і В-лімфоцитів, супресорну активність моноцитів/макрофагів, клітинні і гуморальні нейроаутоімунні реакції.

Результати. Лікування тварин з ЕАЕ субоципітальним введенням МСК, трансфікованих геном ІЛ-10 зумовлює тривале пригнічення функціональної активності Т-лімфоцитів, викликає активацію функції супресорів моноцитарного ряду на 35 добу з послідуною супресією їх активності. Лікування за допомогою МСК, трансфікованих геном ІЛ-10, не змінює динаміку розвитку клітинної нейросенсibiliзації у тварин з ЕАЕ, яка наростає на 60 добу, вірогідно зменшує титр антитіл в сироватці крові до гетерогенного білка НСЕ у всі терміни дослідження, а на 35-у добу рівень антитіл до гетерогенного білка S100. Проведене лікування не впливає на підвищений рівень антитіл до гомо- та гетерогенного ОБМ у всі терміни спостереження.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, трансфіковані мезенхімальні стовбурові клітини, ген ІЛ-10, антитіла до ОБМ.

Модель експериментального алергічного (аутоімунного) енцефаломієліту у щурів (ЕАЕ), яка дозволяє в певній мірі відтворити особливості гістопатології і нейрології розсіяного склерозу, досить широко використовується як метод дослідження нових терапевтичних підходів в лікуванні нейродегенеративних захворювань. В нашій роботі на експериментальній моделі ЕАЕ ми досліджували вплив мезенхімальних стовбурових клітин трансфікованих геном ІЛ-10 на функцію імунокомпетентних клітин, які відіграють важливу роль в розвитку ЕАЕ. Обґрунтуванням дослідження гено- і цитокінотерапії в лікуванні ЕАЕ є чисельні дані щодо впливу мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та ІЛ-10 на розвиток нейроаутоімунних реакцій та стимуляцію нейрорегенерації у тварин із захворюванням, яке розвивається (1,2,3,4,5,6).

Мета. Дослідити функціональну активність Т-, В- клітин периферичної крові; розвиток клітинних та гуморальних нейроаутоімунних реакцій у щурів з ЕАЕ при лікуванні ксеногенними МСК трансфікованими геном ІЛ-10 людини.

Матеріали і методи. ЕАЕ індукували у білих щурів гомогенатом спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (фірма «Sigma» USA) у відповідності до рекомендацій Давидової С.Г.(7). Були досліджені наступні групи експериментальних тварин: 1 група – щури з ЕАЕ без лікування; 2 група – щури з ЕАЕ ліковані МСК трансфікованими геном ІЛ-10 людини субокципітальним введенням на 17 добу від початку індукції. 3 група - інтактні щури. МСК отримували із пуповини людини. Методика розроблена в ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМНУ». Для введення МСК щурам використовували другий пасаж клітин поза організмом, вводили суспензію МСК, або МСК трансфіковані геном ІЛ -10 людини у кількості 2×10^6 клітин у об'ємі 0,1 мл. Визначення проліферативної активності лімфоцитів здійснювали в реакції бласттрансформації лімфоцитів та Т-клітинний мітоген ФГА (5 мкг/мл), В-клітинний 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. Нейро-аутоімунні реакції оцінювали в реакції бласттрансформації лімфоцитів на мозковий антиген (МА) щурів (100 мкг/мл) та за рівнем нейроаутоантитіл до основного білку мієліна щурів і нейроспецифічних гетерогенних білків ОБМ, НСЕ та S100, які визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Вірогідність відмінностей показників визначали за критерієм Стюдента.

Дослідженнями функціональної активності лімфоцитів периферичної крові щурів з ЕАЕ без лікування та під впливом лікування трансфікованими геном ІЛ-10 ксеногенними МСК встановлено (табл. 1), що у експериментальних тварин з індукованим ЕАЕ у фазу регресу неврологічної симптоматики та у лікованих щурів на 35 і 60 добу дослідження проліферативна відповідь Т-лімфоцитів периферичної крові достовірно знижена. Супресорна активність моноцитів/ макрофагів, і в 1, і в 2 групі тварин була вірогідно вищою, ніж у інтактних тварин на 35 добу дослідження і пригнічувалась на 60 день спостереження. Проліферативна відповідь В лімфоцитів у досліджуваних групах щурів достовірно не відрізнялися від значень цих показників у інтактних тварин, крім групи тварин з індукованим ЕАЕ на 60-у добу спостереження, в якій відмічалось вірогідне пригнічення функції В-лімфоцитів.

Аналіз розвитку нейроаутоімунних реакцій до антигенів мозку клітинного типу показав, що на 35 добу дослідження значення проліферативної відповіді на МА у тварин 1 та 2 груп не відрізнялися від інтактних (табл. 2). У віддалені терміни, як після індукції ЕАЕ так і на тлі проведення клітинної терапії було відмічено зростання проліферативної відповіді лімфоцитів на МА. Ці дані показують, що у віддалені терміни після індукції ЕАЕ, а також після застосування трансфікованих геном ІЛ-10 МСК клітин відбувається активація клітинних аутоімунних реакцій. Вивчення рівня антитіл до білку ОБМ в сироватці щурів 1 та 2 групи в різні терміни після індукції ЕАЕ показало підвищення даного показника відносно контролю (3 група) у всі періоди дослідження (табл. 2). Відомо, що ОБМ є маркером мієліну і олігодендроцитів, має високу енцефалітогенну активність. ОБМ першим вилучається з мієліну, порушуючи його структуру і починаючи процес демієлінізації. Антитіла до ОБМ визначаються в спинномозковій рідині у 90-95% хворих на розсіяний склероз в активній фазі. Отримані нами дані підтверджують раніше опубліковані результати щодо достовірного підвищення рівня антитіл до ОБМ у тварин з ЕАЕ (8).

Таблиця 1

Проліферативна відповідь лімфоцитів щурів після індукції ЕАЕ і лікування трансфікованими МСК (М+м) (%)

Групи тварин	Відповідь на мітоген ФГА		Індекс індометацин-чутливої супресії (ІЧС)		Відповідь на мітоген декстран	
	Доба після індукції ЕАЕ					
	35	60	35	60	35	60
Група 1, n=8	32,1±3,1*	27,1±1,5*	1,65±0,09*	0,96±0,01	60,5±3,4	36,1±2,5*
Група 2, n=8	30,5±2,4*	23,5±2,9*	1,79±0,11*	0,99±0,01	59,7±8,1	41,2±5,4
Група 3, n=10	44,1±1,9	43,1±2,1	1,25±0,5	1,2±0,02	60,0±1,2	50,6±1,21

Примітка: * достовірність відмінностей, по відношенню до групи інтактних тварин $p < 0,01$; ** достовірність відмінностей між різними клінічними групами тварин $p < 0,01$.

Таблиця 2

Нейроаутоімунні реакції у щурів після індукції ЕАЕ та після лікування трансфікованими МСК

Дослідні групи	Проліферативна відповідь лімфоцитів на МА щурів (%)		Рівень антитіл до ОБМ щурів (ум.од.)	
	35	60	35	60
Доба після індукції ЕАЕ				
Група 1, n=8	10,5±1,8	17,1±2,1*	13,15±2,16	11,52±2,68
Група 2, n=8	9,1±1,1	20,5±4,5*	9,94±3,01	11,24±3,93
Група 3, n=10	9,6±1,1	8,1±1,1	5,86±1,85	5,86±1,85

Примітка: * достовірність відмінностей, по відношенню до групи інтактних тварин $p < 0,01$; ** достовірність відмінностей між різними клінічними групами тварин $p < 0,01$.

Введення МСК трансфікованих геном ІЛ-10 супроводжувалось зменшенням рівня атитіл до ОБМ на 35-у добу після індукції ЕАЕ, проте у 1 та 2 групах, що досліджувались, даний показник перевищував контрольні значення. На 60-у добу дослідження не встановлено розбіжностей в рівні антитіл до ОБМ між лікованими та не лікованими тваринами, проте зберігається підвищення даного показника порівняно з контролем (табл. 2).

Отримані дані, певною мірою, підтверджують численні дослідження, в яких показано, що МСК мають низьку імуногенність, пригнічують диференціювання дендритних клітин, проліферацію Т лімфоцитів і продукцію Т лімфоцитами прозапальних цитокінів [9]. Встановлено також, що МСК пригнічують активність мієлін-антиген специфічних Т лімфоцитів[10]. Результати наших досліджень в деякій мірі можуть пояснюватись тим, що МСК впливають на певні патогенетичні ланки розвитку і спонтанної регресії ЕАЕ, пригнічують синтез прозапальних цитокінів і активність аутоімунних реакцій на 35 добу після індукції ЕАЕ. Проте у віддалені терміни на 60 у добу відбувається активація аутоімунних реакцій. Дослідження впливу субоципітального введення трансфікованих геном ІЛ-10 МСК на рівень антитіл до гетерогенних нейроспецифічних білків – нейрональних, гліальних, основного білку мієліну, дозволило виявити певні особливості. Як видно з даних наведених в таблиці 3 на 35-у добу після індукції ЕАЕ в сироватці крові виявляється триразове підвищення антитіл до білку S100 та дворазове підвищення до НСЕ. В даний період дослідження виявлено також підвищення рівня антитіл до гетерогенного ОБМ. Введення МСК трансфікованих ІЛ-10 супроводжується статистично вірогідним зменшенням рівня антитіл до НСЕ та білку S100 на 35-у добу дослідження. Спостерігається в даний період дослідження і зниження рівня антитіл до гетерогенного ОБМ. На 60-добу спостереження у 1 групі тварин рівень антитілоутворення до ОБМ, S100 та NSE залишається підвищеним у порівнянні з контрольними тваринами (табл. 3). У 2 групі тварин проведене лікування вірогідно не впливає на рівень антитіл до ОБМ, S100, проте зменшує рівень антитіл до НСЕ, що відмічається на 60-у добу дослідження. Таким чином у тварин з індукованим ЕАЕ у фазу регресу неврологічної симптоматики визначається підвищення рівня антитіл до нейроспецифічних білків: ОБМ, НСЕ та S100. Введення МСК трансфікованих геном ІЛ-10 зменшує рівень антитілоутворення до НСЕ та S100 на 35-у добу спостереження та рівень антитіл до НСЕ на 60-у добу після індукції ЕАЕ.

Таблиця 3

Рівень антитіл до гетерогенних нейроспецифічних білків у щурів з ЕАЕ та після введення МСК трансфікованих геном ІЛ10 (ум.од.)

Групи тварин	Рівень антитіл до ОБМ (бичачий)		Рівень антитіл до S100 (бичачий)		Рівень антитіл до НСЕ (бичачий)	
	Доба після індукції ЕАЕ					
	35	60	35	60	35	60
Група 1, n=8	18,47± 3,79*	16,51 ±1,65	16,21± 2,36*,**	13,7± 0,44	16,71± 0,2*,**	12,14 ±0,12
Група 2, n=8	14,24± 2,22	18,5± 1,37*	8,1± 1,37*	10,36± 1,96	8,19± 0,23	8,05± 0,52
Група 3, n=10	6,6 ± 0,45		5.54± 0,79		8,35 ± 0,66	

Примітка: * - вірогідність відносно контролю ($p < 0,05$) ; ** - вірогідність між дослідними групами ($p < 0,05$).

Висновки. Лікування тварин з ЕАЕ за допомогою субоципітального введення МСК, трансфікованих геном ІЛ-10 зумовлює тривале пригнічення функціональної активності Т-лімфоцитів, викликає активацію функції супресорів моноцитарного ряду на 35 добу з послідуочим пригніченням їх активності. Лікування за допомогою МСК, трансфікованих геном ІЛ-10, не змінює динаміку розвитку клітинної нейросенсибілізації у щурів з ЕАЕ, яка наростає на 60 добу дослідження. Субоципітальне введення щурам з ЕАЕ МСК, трансфікованих геном ІЛ-10, вірогідно зменшує титр антитіл в сироватці крові до гетерогенного білка НСЕ впродовж 60 діб та рівень антитіл до гетерогенного білка S100 на 35-у добу дослідження і не впливає на підвищений рівень антитіл до гомо- та гетерогенного ОБМ у всі терміни спостереження.

Література

1. Kassis I. Mesenchymal Stem Cells (MSC) derived from mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors / I. Kassis, P. Petrou, M. Halimi, D. Karussis / *Immunol. Lett.* – 2013. p: S0165-2478(13)00081-3. doi: 10.1016.
2. Zhu J. Transplanting of mesenchymal stem cells may affect proliferation and function of CD4(+)T-cells in experimental autoimmune encephalomyelitis / J. Zhu, J. Zhang, Q. Li [et al.] // *Exp. Clin. Transplant.* – 2012. – Vol.10, N.5. – P. 492-500.
3. Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis / D. Gordon, G. Pavlovska, J.B. Uney [et al.] // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2010. – Vol. 69, №11. – P.1087-1095.
4. Иммуносупрессивный потенциал мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелиитом при кокультивировании с митоген/миелин-стимулированными спленоцитами / М.М. Зафранская, Д.Б. Нижегородова, М.Ю. Колобова [и др.] // *Медицина: научно-практический рецензируемый медицинский журнал в Беларуси.* – 2010. – №3. – С. 85–88.
5. Constantin G. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / G. Constantin // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 12. – P. 1101–1103.
6. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. / J.Klose, N. Schmidt, A.Melms [et al.] // *Journal of Neuroinflammation.* – 2013. – V.10. – P.117.
7. Давыдова Г.С. Применение адьюванта с различным количеством БЦЖ для воспроизведения ЭАЭ у крыс / Г.С. Давыдова // *Острый энцефаломиелит в эксперименте и клинике.* – Минск: Наука и техника, 1969. – С. 32–37.
8. Лісяний М.І. Дослідження гуморальних аутоімунних реакцій до нейроспецифічних білків у разі експериментального алергічного енцефаломієліту на етапах патогенезу та імюнокорекції алогенною нервовою тканиною / М.І. Лісяний, Л.Д. Любич, О.В. Маркова, Л.М. Бельська // *Фізіол. журн.* – 2002. – Т. 48, №1. – С. 15–24.
9. Dittmar Th. Stem Cell Biology in Health and Disease / Thomas Dittmar, Kurt S. Zänker // Springer Netherlands: Springer Science. - 2009. – 426 p.
10. 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. - V.4, N.5. – P.529 – 547.

*В.А.Руденко, Л.Н.Бельська, І.А.Гнедкова, А.Л.Пичкур,
С.А.Вербовська, Я.О.Похоленко*

**Ксеногенна трансплантація мезенхімальних
стволових кліток трансфецированих геном ІЛ-10 як
метод кліткової терапії експериментального
алергічного енцефаломієліта**

ГУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова НАМН України

Вступлення. Експериментальне вивчення механізмів впливу і можливості використання мезенхімальних стоволових кліток і противовоспалительних цитокінів при нейродегенеративній патології ЦНС являється важливим етапом для вибору об'єктованої лічєбної тактики.

Цель. Ісследовать активність Т- і В-клєток периферическої крові, розвиток кліткових і гуморальних нейроаутоімунних реакцій у крис с індукцирваним експериментальним алергічєским енцефаломієлітом (ЕАЭ) при лічєнні ксеногенними мезєнхімальними стоволовими клітками (МСК) трансфєцирваними гєном інтерлєйкіна -10 (ІЛ-10).

Матеріали і методи. Крисы с індукцирваним ЕАЭ. Опредєляли проліферативну активність Т- і В-лімфоцитів, супресорну активність моноцитів/макрофагов, кліткові і гуморальні нейроаутоімунні реакції.

Результати. Лічєння експериментальних крис с індукцирваним алергічєским енцефаломієлітом с помістю субокципитального введєння МСК трансфєцирваних гєном ІЛ-10 обуславлює длітєльне угнетєння функціональної активності Т-лімфоцитів, вызивєє активацию функції супресорів моноцитарного ряду на 35 сутки с послєдуючим угнетєнням їх активності. Лічєння с помістю МСК трансфєцирваними гєном ІЛ-10 не вплиєє на динаміку розвитку кліткової нейросєнсібілізації у живєтних с ЕАЭ, котрає нарастаєє на 60 сутки, достовєрно снижаєє титр антитєл в сывороткє крові к гєтерогєнному бєлку НСЕ во все сроки ісследования, а уровень антитєл к гєтеро-гєнному бєлку S100 тєлько на 35 дєнь ісследования. Проводимєє лічєння не вплиєє на повїшенний уровень антитєл к гємо- і гєтерогєнному бєлку ОБМ во все сроки наблюдєнія.

Ключєвые слова: експериментальний алергічєский енцефаломієліт, трансфєцирванні мезєнхімальні стоволові клітки, гєн ІЛ-10, антитєла к ОБМ.

*V.A. Rudenko, L.N. Belskaia, I. O. Gnedkova, O.L. Pichkur,
S.A. Verbovska, Ya.O. Poholenko*

**Xenogenic transplantation of mesenchymal stem cells
transfected by IL-10 gene as a method of cell therapy of
experimental allergic encephalomyelitis**

**SI “Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov
of NAMS of Ukraine”, Kyiv**

Introduction. Experimental study of mechanisms of the influence and possibility of usage of mesenchymal stem cells and anti-inflammatory cytokines in neurodegenerative pathology of CNS is an important stage for the selection of appropriate treatment tactics.

Aim. To study the activity of T- and B-cells in peripheral blood, the development of cellular and humoral neuroautoimmune responses in rats with induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE) with treatment by xenogenic mesenchymal stem cells (MSCs) transfected by gene Interleukin-10 (IL-10).

Materials and methods. T and B-lymphocytes proliferative activity, suppressive activity of monocytes/macrophages, cellular and humoral neuroautoimmune reactions in rats with induced EAE were researched.

Results. Treatment of experimental rats with induced allergic encephalomyelitis via suboccipital administration of MSCs transfected by IL-10 gene that causes prolonged inhibition of the functional activity of T-lymphocytes, causes activation function of suppressor of monocytic series on 35th day followed by inhibition of their activity. Treatment with MSCs transfected by gene IL-10 does not affect the dynamics of cell neuro-sensitisation in animals with EAE, which increases on 60th day, significantly reduces the titer of antibodies in the blood serum of heterogeneous NSE protein in all study time and the level of antibodies to heterologous proteins S100 only on 35th day of the study. Conducted treatment does not affect the increased level of antibodies to the homo- and heterogeneous protein MBP in all time of observation.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, transfected mesenchymal stem cells of IL-10 gene, MBP antibodies.

Відомості про авторів:

Руденко Валентина Андріївна - к.б.н., провідний науковий співробітник ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: 04050, м.Київ, вул.. Платона Майбороди, 32, тел.: (044) 483-36-84.

Бельська Людмила Миколаївна - к.б.н., старший науковий співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Гнедкова Ірина Олександрівна - к.мед.н., ст. н. співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Пічкур Олександр Леонідович - науковий співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Вербовська Світлана Анатоліївна - молодший науковий співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Похоленко Яніна Олександрівна - науковий співробітник ДУ «ІГРМ НАМН України».

УДК 616.71-018.4

© СЕ-ФЕЙ, 2015

Се-Фей

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОЇ РАДІАЛЬНОЇ УДАРНО- ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ НА ІМУННІ МАРКЕРИ СИРОВАТКИ КРОВІ У КРОЛИКІВ З ТРАВМОЮ КІСТКИ

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л.Шупика, м.Київ

Актуальність. Екстракорпоральна ударно-хвильова терапія (ЕХУХТ) активує кісткоутворюючі процеси, однак механізм цього ефекту до теперішнього часу не в'яснений, окремі роботи свідчать про інтенсифікацію імунокомпетентних клітин.

Мета. Вивчення впливу ЕРУХТ на активність імуних клітин при експериментальній травмі кісток.

Матеріали та методи. У 24 кроликів в асептичних умовах створювали дефект метадіафізу великогомілкової кістки шляхом її перфорації. Тварини дослідної групи отримували на зону травми кістки 4 сеанси ЕРУХТ, тварини контрольної групи ЕРУХТ не отримували. В обох групах тварин до травми і через 2, 15, 30 і 45 днів після травми в сироватці крові вивчали цитотоксичну активність лімфоцитів, цитотоксичну активність макрофагів.