

we determined the presence of phenotypic signs of the connective tissue dysplasia syndrome and the degree of its severity. To construct a mathematical model of the individual prognosis of the probability of development of myopia in children we used the equation of binary logistic regression. The statistical significance of the model was calculated by the Omnibus Test. To assess the relative quality of the model, ROC analysis, as well as 95% CI, was used.

*Results and discussion.* To select the most significant signs associated with the risk of myopia, a method of step-by-step exclusion was used, which selected 7 factorial signs with certain regression coefficients. The model of the prognosis of the probability of development of acquired myopia in children included refractive corneal force, axial length of the eye, radius of curvature of the cornea, cornea diameter, reserve of relative accommodation, degree of connective tissue dysplasia, heredity of the disease. Classification ability of the model was determined according to the data of the training sample and amounted to 84.6%. At the same time, the probability of a positive result when using this model was 80.8%, and the probability of a true negative result – 88.5%. The sensitivity of the model was equal to 87.5%, and the specificity was 82.1%. The statistical significance of this model was confirmed by the Omnibus Test ( $\chi^2 = 24,479$ ;  $df = 7$ ;  $p < 0.001$ ). The evaluation of the quality of the model using the ROC analysis showed a good quality of the classification of characteristics: AUC was 0.897,  $p < 0.0001$  (95% CI 0.81-0.98).

*Conclusion.* The risk of acquired myopia was determined by a set of factors: individual anatomical-optical parameters of the eye, state of accommodation, heredity, which were closely related to the manifestations of connective tissue dysplasia.

*Prospects for further research* are to develop measures aimed at the prevention and timely detection of children prone to the development of acquired myopia.

**Key words:** myopia, children, prognostication, mathematical model.

Рецензент – проф. Безкоровайна І. М.  
Стаття надійшла 25.02.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-227-234

УДК 575:616-089.843:611-013.395:576.3/.4:616.832-002-056.3-092.9

<sup>1</sup>Цимбалюк В. І., <sup>1</sup>Пічкур Л. Д., <sup>1</sup>Вербовська С. А., <sup>1</sup>Акінола С. Т., <sup>1</sup>Васлович В. В., <sup>2</sup>Дерябіна О. Г., <sup>2,3</sup>Похоленко Я. О., <sup>2,3</sup>Топорова О. К., <sup>2</sup>Шувалова Н. С., <sup>2,3</sup>Кордюм В. А.

### ВПЛИВ КСЕНОГЕННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НАТИВНИХ І ТРАНСФІКОВАНИХ ГЕНОМ ІНТЕРЛЕЙКІНА-10 МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

<sup>1</sup>Відділення відновлювальної нейрохірургії, ДУ

«Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» (м. Київ)

<sup>2</sup>Відділ генних технологій, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України (м. Київ)

<sup>3</sup>Відділ регуляторних механізмів клітини, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

verbovskaya-svetlana@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Стаття містить результати досліджень, проведених в рамках НДР: «Дослідити вплив ксеногенної трансплантації нативних та трансфікованих мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту», № державної реєстрації 0113U000285 та «Дослідити біологічні властивості та визначити відновлювальний потенціал кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини при лікуванні рухових порушень в експерименті», № державної реєстрації: 0116U001030.

**Вступ.** На різних етапах патогенезу розсіяного склерозу (РС) і його моделі – експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) суттєву роль відіграє поєднання запалення, демієлінізації, дегенерації нейронів і аксонів. Нейродегенеративні зміни при РС виникають в умовах дефіциту трофічних фак-

торів та мієлінотворюючих клітин [1] і розвиваються під впливом різних субстанцій (цитокінів, протеаз, оксиду азоту (NO), продуктів перекисного окислення ліпідів тощо), які виділяють імунокомпетентні клітини, мікроглія, макрофаги та інші активовані клітини [2,3]. Безпосередній патогенний вплив вірусу або іншого, поки що невизначеного зовнішнього цитотоксичного чинника, стимуляція апоптозу олігодендроцитів і нейронів також спричиняють демієлінізацію і некроз. Тобто, патогенетичні зміни при цих захворюваннях складаються з одного боку з наявності агресивного деструктивного аутоімунітету, запальні прояви та інтенсивність якого прогресують, а з другого боку – з дегенеративно-дистрофічних явищ у вогнищах запалення у паренхимі ЦНС, процесів регенерації, які неадекватні ступеню дегенерації [4]. Тому розробка лікувальних стратегій повинна бути спрямована на забезпечення протизапальної дії,

супресії деструктивного аутоімунитету та створення сприятливих умов для поновлення мієліноутворення у ЦНС хворих.

Виходячи з цього, з урахуванням не високої ефективності існуючих методів лікування, протягом останніх років в експериментальних дослідженнях при запально-дегенеративних процесах ЦНС широко вивчається можливість використання стовбурових клітин (СК) [5].

Дані літератури засвідчують більш виражені імуносупресивні властивості мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пупкового канатика в порівнянні з аналогічними клітинами з інших джерел, що, поряд з іншими перевагами, свідчить про перспективність використання їх в регенеративній медицині [6].

МСК з Вартонових драглів добре проліферують *in vitro*, мають унікальні властивості (здатність до міграції, трансдиференціювання в клітини ектодермального походження, справляють системний і локальний імунomodуючий вплив за рахунок швидкого збільшення регуляторних лімфоцитів і зменшення кількості активованих антигенпрезентуючих клітин). Наряду з цим МСК здатні стимулювати синтез і самостійно синтезувати цілий ряд протизапальних цитокінів. Ці властивості можуть бути надзвичайно важливими для корекції аутоімунних станів.

При цьому існує кілька суттєвих обмежень. СК необхідно вводити в лікворні простори ЦНС, оскільки при системному введенні вони не здатні проникати через гемато-енцефалічний бар'єр [7]. СК здатні продукувати протизапальні цитокіни і стимулювати гліогенез. Збільшенню концентрації цих факторів може сприяти перенос відповідних генів у складі вірусних векторів, якими трансфікуються СК (*ex vivo* перенесення гена) [8].

Це своєрідний альянс клітинної та генної терапії, який дозволяє уникнути недоліків і посилити переваги обох методів. МСК мають значний відновний потенціал, який реалізується за рахунок секреції ними широкого спектра цитокінів та ростових факторів, модифікація клітин за допомогою генетичних конструкцій, кодуючих гени цих білків, дозволяє посилити паракринні ефекти трансплантованих клітин і підвищити їх терапевтичні властивості. Можливість використання СК та їхніх похідних у якості переносників терапевтичних генів із тривалістю їхньої експресії, що відносно регулюється, представляє величезний інтерес для лікування різних захворювань людини. Ушкоджуючі фактори вогнища запалення негативно впливають на життєдіяльність введених МСК [9], імовірно створюючи обмеження для повноцінної реалізації їх терапевтичного потенціалу. Тому перспективною видається ідея одночасного застосування МСК і зниження рівня запалення. Одним із ключових протизапальних цитокінів вважають інтерлейкін 10 (ІЛ-10). В окремих роботах показано ключову роль ІЛ-10 у попередженні розвитку та лікуванні аутоімунних станів та аутоімунних захворювань ЦНС [10]. Він безпосередньо інгібує експресію прозапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ІNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , а також пригнічує презентацію антигенів анти-

ген-презентуючими клітинами, зменшує активність цитотоксичних клітин кілерів, нормальних кілерів, моноцитів та макрофагів [11,12]. ІЛ-10 бере участь в усуненні запалення динамічним чином, впливає на залучення у область ушкодження власних мультипотентних клітин, а також клітин-попередників, що забезпечують первинну репарацію тканини. Завдяки цьому він оптимізує зону терапевтичної реалізації власних і трансплантованих СК [13]. Нами було зроблено припущення, що одночасне застосування МСК та ІЛ-10 зможе взаємно посилити їх терапевтичний ефект. Беручи до уваги особливості і унікальні властивості МСК Вартонових драглів пуповини, нами проведено експериментальне комплексне вивчення ефективності застосування МСК при вогнищевих ураженнях ЦНС щурів з модельованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) у комбінації з введенням ІЛ-10, з метою можливого створення нового імуногенетичного стану та корекції рухових порушень експериментальних тварин. МСК здатні тривало зберігати життєздатність у ЦНС тварин [14] і мають тропність до вогнищ ураження, що, на нашу думку, може бути корисним у випадку трансфекції у МСК генів, кодуючих синтез ІЛ-10.

Застосування генетично модифікованих стовбурових клітин, які забезпечують локальну доставку терапевтичного трансгена безпосередньо в організм, здатне забезпечити високий терапевтичний ефект при одночасному зниженні кількості та сили прояву побічних ефектів лікування.

**Мета роботи:** дослідити вплив нативних мезенхімальних стовбурових клітин Вартонових драглів пуповини людини та трансфікованих геном ІЛ-10 на клінічний перебіг ЕАЕ.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведені в лабораторії експериментальної нейрохірургії відділу експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» на 46 білих безплідних статевозрілих щурах-самцях вагою 200-230 г. Тварини розводки віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» утримували в стандартних умовах віварію із забезпеченням вільного доступу до води та їжі.

Всі процедури з дослідними щурами виконували 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) [15] і Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» от 21.10.2006 [16].

АЕ індукували гомогенатом спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (фірма «SIGMA», USA) згідно методики Г.С. Давидової із співвідношенням ад'юванту Фрейнда до мозкової тканини 1,6:1, що дозволило отримати хронічний рецидивуючий перебіг ЕАЕ середнього ступеня важкості. Енцефалитогену суміш вводили у подушечки кінцівок щурів із

розрахунку 50 мг енцефалітогенної суміші на кожну тварину.

Розподіл на експериментальні групи представлено в **табл. 1**. Щурів з ЕАЕ лікували внутрішньовенним чи субоципітальним введенням у різних поєднаннях МСК та ІЛ-10 і МСК, трансфікованих геном ІЛ – 10 (МСКТ). В наших попередніх роботах виявлено, що максимум клінічних проявів у тварин з ЕАЕ спостерігається на 17 добу після індукції ЕАЕ [17], тому ми виділили групу тварин, яким на 10-у добу внутрішньовенно вводили ІЛ-10 з метою протизапального впливу. На піку клінічних проявів на 16-у добу тваринам вводили МСК або МСКТ, розраховуючи оцінити протизапальний вплив і здатність МСК та МСКТ попереджувати процеси демієлінізації і пришвидшувати ремієлінізацію ЦНС на морфологічному рівні. Рекombінантний ІЛ-10 людини був отриманий в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України і люб'язно наданий для проведення експерименту.

Отримання, ідентифікація, культивування, визначення життєздатності МСК проводили співробітники ДУ «ІГРМ НАМН» та Інституту молекулярної біології та генетики НАН України у відповідності до описаного раніше протоколу [18]. Для оцінки стану культур використовували інвертований мікроскоп «Leica DMIL» (Німеччина). FACS-аналіз експресії поверхневих маркерів МСК (CD105, CD90, CD73 – «BD», США) виконано на сортері «BD FACSAria» із застосуванням програмного забезпечення «BD FACSDiva» у відділі клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». Більш ніж 95% клітин 2-го пасажу були позитивними за вказаними маркерами.

МСК 2-го пасажу трансфікували плазмідом, що містить кДНК-овий варіант гена ІЛ-10 [19] і маркерний ген зеленого флуоресцентного білка (GFP) під регуляцією конститутивного промотора ранніх генів цитомегаловірусу (CMV). Трансфекцію проводили за допомогою трансфекційного реагенту TurboFect (Termo Scientific) за протоколом фірми-виробника. Через 24 години після початку трансфекційної процедури МСКТ відкріплювали від субстрату за допомогою розчину трипсину і ЕДТА, ресуспендували у фосфатному буфері в об'ємі 100 мкл і вводили експериментальним щурам субоципітально у кількості 1 млн клітин на тварину. Паралельну пробу аналізували методом проточної цитофлуориметрії на FACS Aria і визначали відсоток трансфікованих клітин за маркерним білком GFP. Ця величина становила 20%.

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 введення 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

**Таблиця 1.**

**Розподіл тварин в експерименті**

Група, №	Кількість тварин	Лікування
1	8	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2	14	Введення МСК (в кількості 1 млн) субоципітально на 17 добу
3	10	Введення МСКТ (в кількості 1 млн) субоципітально на 17 добу
4	14	Введення ІЛ-10 (в кількості 1 мкг/мл) внутрішньовенно на 10 добу, (1 мкг ІЛ-10 + 1 млн МСК) с субоципітально на 17 добу

розчином йоду. В положенні максимального згинання шиї пунктували велику потиличну цистерну і за допомогою інсулінового шприца вводили 0,1 мл суспензії МСК ( $1 \times 10^6$  нативних клітин).

Клінічні спостереження за тваринами проводили щоденно протягом 35 діб. Для кожної тварини окремо визначали ступінь тяжкості з урахуванням зовнішніх ознак та клінічного стану за такими ознаками: м'язовий тонус кінцівок, тонус хвоста, стан сфинктерів, наявність парезів та паралічів, артрити, трофічні зміни на кінцівках. Ступінь тяжкості оцінювали в балах, як описано [20]. У подальшому тварин обстежували 2 рази на тиждень до 65 доби.

Для статистичної обробки отриманих даних застосовували методи варіаційної статистики. Нормальність розподілу даних перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлкі. Для міжгрупового порівняння середніх значень використовували непараметричний критерій U-Манна-Уїтні. Для співставлення значень одного і того ж показника в різні проміжки часу застосовували непараметричний критерій Вілкоксона. З метою деталізації відновного процесу проводили аналіз динамічних рядів, де щоденний абсолютний приріст (спад) стану піддослідних тварин в балах визначали за формулою:

*Абс. приріст* =  $x_n - x_{n-1}$ , де  $n$  – доба спостереження; а прискорення приросту (спаду) обчислювали за

формулою:

*Прискорення приросту(спаду)* =  $(\text{абс.приріст}_n / x_{n-1}) * 100\%$

Усереднені величини представляли у вигляді  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє значення величини, а  $m$  – стандартна похибка середнього значення величини.

Для більшої наочності динаміки клінічного стану експериментальних тварин на графіках за допомогою стандартного програмного пакету MS Excel 2003 додатково будували тренди апроксимації часових послідовностей. Використовували поліноміальний алгоритм з мірою полінома – 6.

Статистичний аналіз і графічне представлення результатів виконували з використанням пакета програм MS Excel 2007 і STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., <http://www.statsoft.ru>).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Дослідження перебігу ЕАЕ засвідчило, що інкубаційний період до перших проявів ЕАЕ склав 10 діб. Вважа-



Рис. 1. Динаміка клінічного стану щурів групи №3 (лікування трансфікованими мезенхімальними клітинами (субоципітально)).



Рис. 2. Динаміка клінічного стану щурів групи №4 (лікування інтерлейкіном (внутрішньовенно) та інтерлейкіном і мезенхімальними клітинами (субоципітально)).



Рис. 3. Порівняння динаміки клінічного стану щурів груп №2 і №3.

ється, що при ЕАЕ спостерігається спонтанне видужання тварин. Така особливість є характерною для легкого перебігу ЕАЕ, при хронічному ремітуючому перебігу ЕАЕ у групі спостереження спонтанного одужання не настає. Дослідження перебігу ЕАЕ у контрольній групі тварин засвідчило розвиток середнього ступеня тяжкості захворювання (1,3 – 1,8 бали) з хронічним ремітуючим перебігом.

Ми вивчили вплив на ЕАЕ субоципітального введення трансфікованих МСК (група дослідження №3). На рис. 1 приведено динаміку клінічного стану щурів, яким у ліквор великої потиличної цистерни трансплантували трансфіковані МСК, та щурів групи порівняння. Після субоципітального введення трансфікованих МСК щурам з ЕАЕ на 17 добу від початку експерименту, спостерігається статистично незначуще погіршення стану відразу після лікування (критерій U-Манна-Уїтні;  $p=0,8$ ) з  $1,1 \pm 0,13$  балів у групі порівняння до  $1,6 \pm 0,14$  балів у групі після введення МСКТ. Таке погіршення стану триває лише декілька днів і на 22 добу експерименту тяжкість перебігу у цій групі тварин, вже нижча ( $1,4 \pm 0,14$  бали) за тяжкість у групі спостереження, в якій настає пік клінічних проявів ЕАЕ ( $1,8 \pm 0,25$  бали) при статистично незначущій різниці (критерій U-Манна-Уїтні;  $p=0,2$ ). Далі спостерігається швидкий регрес клініки ЕАЕ у групі № 4 до повного клінічного одужання на 32 добу (критерій Вілкоксона;  $p=0,008$  на 26 добу, і  $p=0,005$  на 32 добу відносно 22 доби дослідження). При цьому тварини у цій групі реагували на лікування різноманітно – були тварини, які одужали швидше, були також такі тварини, у яких за відсутності клінічних проявів ЕАЕ спостерігалися трофічні розлади у кінцівках.

Загалом, з 22 доби від індукції ЕАЕ, у всіх експериментальних групах спостерігається позитивна динаміка перебігу захворювання з повним клінічним одужанням тварин. У тварин групи порівняння при цьому розвивається хронічний ремітуючий перебіг ЕАЕ.

У групі тварин №4, яким в дебюті захворювання (10 доба) внутрішньовенно введено ІЛ-10, після субоципітального введення МСК на піку захворювання (17 доба) тяжкість перебігу ЕАЕ статистично значуще збільшується у першу добу після трансплантації (рис. 2) – до  $2,07 \pm 0,17$  балів відносно  $1,1 \pm 0,13$  балів у групі порівняння (критерій U-Манна-Уїтні;  $p=0,04$ ). Це, очевидно, можна пояснити великою кількістю клітин, які потрапляють у ліквор потиличної цистерни щурів, та впливом

Аналіз динамічних рядів клінічного стану щурів з ЕАЕ та під впливом уведення МСК у різних комбінаціях

Доба	ЕАЕ бали	Абсолютний приріст (спад)	Прискорення (зниження) приросту %	ЕАЕ+МСК бали	Абсолютний приріст (спад)	Прискорення (зниження) приросту %	ЕАЕ+МСКТ бали	Абсолютний приріст (спад)	Прискорення (зниження) приросту %	ЕАЕ+ІЛ-10+МСК бали	Абсолютний приріст (спад)	Прискорення (зниження) приросту %
2	0	немає	немає	0	немає	немає	0	немає	немає	0	немає	немає
	0,15	0	немає	0,2	0,2	немає	0	0	немає	0,2	0,2	немає
6	0,2	0,15	33,3	0,25	0,05	25,0	0	0	немає	0,25	0,05	25
8	0,4	0,05	100	0,45	0,2	80	0,1	0,1	немає	0,4	0,15	60
10	0,5	0,2	25	0,45	0	0	0,25	0,15	150	0,55	0,15	37,5
12	0,75	0,1	50	0,8	0,35	77,8	0,7	0,45	180	0,9	0,35	63,6
14	0,9	0,25	20	0,9	0,1	12,5	1	0,3	43	1,1	0,2	22,2
16	1	0,15	11,1	1	0,1	11,1	1,2	0,2	20	1,3	0,2	18,2
18	1,1	0,1	10	1,5	0,5	50	1,6	0,4	33,3	2,07	0,8	59,2
20	1,3	0,1	18,2	1,5	0	0,0	2	0,4	25	1,9	-0,2	-8,2
22	1,8	0,2	38,5	1,4	-0,1	-6,7	1,4	-0,6	-30	1,3	-0,6	-31,6
24	1	0,5	-44,4	1,1	-0,3	-21,4	1	-0,4	-29	0,8	-0,5	-38,5
26	0,8	-0,8	-20	0,7	-0,4	-36,4	0,4	-0,6	-60	0,4	-0,4	-50
28	1	-0,2	25,0	0,6	-0,1	-14,3	0,2	-0,2	-50	0,2	-0,2	-50
30	0,2	0,2	-80	0,3	-0,3	-50	0,1	-0,1	-50	0,1	-0,1	-50
32	0,6	-0,8	200	0,07	-0,23	-76,7	0	-0,1	-100	0,07	-0,03	-30
34	1	0,4	67	0	-0,07	-100	0	0	немає	0	-0,07	-100

Примітка: Показники прискорення спаду і абсолютний спад стану піддослідних тварин позначені знаком «-».

наркотичних засобів. Зниження показника ступеню тяжкості стану експериментальних тварин групи №4 відбувалося швидше, у порівнянні з щурами групи №2, які отримали лише ксеногенні МСК. При цьому в групі №4 на в 26 добу показник знижувався відносно групи №2 – від  $0,7 \pm 0,13$  до  $0,4 \pm 0,14$  балів – (критерій U-Манна-Уїтні;  $p=0,2$ ), проте різниця виявилася статистично незначущою. У нашому дослідженні простежується сучасна тенденція у клітинній терапії – більша ефективність комбінованого застосування засобів із різним механізмом дії, наприклад, стовбурових клітин у комбінації з цитокінами.

При міжгруповому порівнянні перебіг ЕАЕ у експериментальних групах відрізняється. Регрес тяжкості стану ЕАЕ у щурів групи №3, починаючи з 22 доби дослідження, швидший ніж у групі №2, яким трансплантовано тільки МСК (рис. 3), та майже не відрізняється від групи №4, з двохетапним введенням ІЛ-10 і МСК. Суттєва різниця між експериментальними групами відмічена на 32 добу спостереження, де в групі №3 наступило клінічне одужання всіх тварин, на відміну від груп №2 і №4, в яких по 1 тварині мали залишкові прояви патологічного процесу. В цей термін дослідження спостерігалася статистично значуща різниця між експериментальними групами і групою порівняння – з  $0,6 \pm 0,18$  балів у групі порівняння до 0 балів у групі після введення МСКТ та по  $0,07 \pm 0,07$  у групах дослідження №2 і №4 (критерій U-Манна-Уїтні;  $p=0,04$ ), проте між самими експериментальними групами статистично значущих відмінностей відмічено не було.

Таким чином, перебіг ЕАЕ у експериментальних групах тварин клінічно відрізняється. Величина вірогідності апроксимації розподілу  $R^2$ , що в групі порівняння становить 0,84, а в експериментальних групах

варіює від 0,95 до 0,96, вказує на те, що математична модель явища, що досліджується, підібрана з високою точністю.

Для унаочнення особливостей перебігу ЕАЕ був проведений міжгруповий аналіз динамічних рядів експериментальних груп тварин. При порівнянні динамічних рядів групи №3, яким вводили МСКТ, і групи №4, яка отримала МСК і ІЛ-10, слід відмітити, що в цілому, обидві лінії на рисунках 1 і 2 відображають позитивну динаміку відновного процесу з повним клінічним одужанням експериментальних тварин у цих групах до 32 доби. Так, групи №3 і №4 (табл. 2) майже не відрізнялися числовими даними в балах в терміни 24-28 діб і їх динамічні ряди характеризувалися зниженням показника ступеню тяжкості стану у ці терміни відповідно від -0,4 до -0,2 балів та від -0,5 до -0,2 балів, а прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану на 28 добу становило для обох вищевказаних груп дослідження -50 %. При цьому група №2 у порівнянні з групою №3 за числовими даними в балах в терміни 24-28 діб виглядала дещо гірше зі зниженням показника ступеню тяжкості відповідно від -0,3 до -0,1 балів, а прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану для тварин групи дослідження №2 на 28 добу складало всього -14,3 % (табл. 2).

Отже, при любых схемах введення МСК сприяють повному одужанню тварин з ЕАЕ до 32 доби експерименту. Ці показники статистично значуще відрізняються від групи порівняння. Перебіг захворювання після введення нативних ксеногенних МСКТ легший, ніж у групі тварин після введення нетрансфікованих нативних МСК. Проте показники є статистично незначущими.

Таким чином, аналіз сучасних уявлень про патогенез запально-дегенеративних захворювань ЦНС і механізми відновлення ушкодженої нервової тканини, результати експериментальних досліджень і клінічні спостереження дозволяють вважати нейрохірургічні методи одним з перспективних способів лікування, що сприяє забезпеченню тканини мозку достатньою кількістю НТФ, відновленню кількості попередників олігодендроцитів, забезпечує доставку алогенних стовбурових нейрональних і прогеніторних клітин, зумовлює зменшення вираженості запалення у ЦНС у гострому періоді захворювання, пригнічення клітинної аутоімунної відповіді на мієлінасоційовані білки.

### Висновки

1. Отримана нами модель відповідає хронічній рецидивуючій формі ЕАЕ, що дозволяє детально вивчити вплив різних факторів на клінічний перебіг захворювання і уникнути летальності експериментальних тварин.

2. Застосування МСКТ, протизапального ІЛ-10 і МСК у різних комбінаціях сприяє повному клінічному одужанню тварин до 32 доби експерименту відносно групи порівняння, де спонтанного клінічного одужання не наступає.

3. Аналіз динамічних рядів засвідчує більшу ефективність лікування у групі тварин №3 та групи №4, яким на 10 добу внутрішньовенно вводили ІЛ-10, а на 17 добу – МСК та ІЛ-10, навіть не зважаючи на статистично значуще тимчасове погіршення стану тварин після субоципітального введення МСК та інтерлейкіну. Прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану в цих групах дослідження на 28 добу становило -50 %.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші найбільшці дослідження будуть направлені на вивчення здатності трансфікованих мезенхімальних стовбурових клітин синтезувати інтерлейкін-10 *in vitro* та *in vivo*. В залежності від отриманих результатів, можлива клінічна апробація методу при запально-дегенеративних ураженнях ЦНС.

### Література

1. Abdurakhmanova RF, Izzatov HN, Khadibayeva GR, Sharipova BA, Kakharova MH. Rasseyanny skleroz: etiologiya, patogenez i klinika (chast I). Vestn. poslediplomnogo obrazovaniya v sfere zdravookhraneniya. 2016;3:68-74. Dostupno: <http://www.vestnik-ipovszrt.tj/?p=2436> [in Russian].
2. Selmi C, Barin JG, Rose NR. Current trends in autoimmunity and the nervous system. J Autoimmun. 2016;75:20-9. DOI: 10.1016/j.jaut.2016.08.005. PMID: 27545842.
3. Pichkur LD, Verbovska SA, Akinola ST, Chytayeva HY. Osnovni patohenetychni mekhanizmy protsesu demielinizatsiyi v TSNS ta mozhlyvosti yoho korektsiyi. Ukr. nevrolohichnyy zhurnal. 2017;2:12-9. Dostupno: [http://www.ukrneuroj.com.ua/svzhij\\_nomer.php?nid=43](http://www.ukrneuroj.com.ua/svzhij_nomer.php?nid=43) [in Ukrainian].
4. Schmidt TE. Rasseyanny skleroz: etiologiya, faktory riska, patogenez, klinika i progressirovaniye (po materialam kongressa Ectrms). Nevrol. zhurn. 2014;19(1):49-54. [in Russian].
5. Adami R, Scesa G, Bottai D. Stem cell transplantation in neurological diseases: improving effectiveness in animal models. Front Cell Dev Biol. 2014;2:17. DOI: 10.3389/fcell.2014.00017. PMID: 25364724. PMCID: PMC4206985.
6. Maslova OO, Shuvalova NS, Sukhorada OM, Zhukova SM, Deryabina OG, Makarenko MV, et al. Heterogeneity of Umbilical Cords as a Source for MSC. Dataset Papers in Biology. Volume 2013 (2013), Article ID 370103. Available from: <http://dx.doi.org/10.7167/2013/370103>
7. Dulamea AO. Role of oligodendrocyte dysfunction in demyelination, remyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. Adv Exp Med Biol. 2017;958:91-127. DOI: 10.1007/978-3-319-47861-6\_7. PMID: 28093710.
8. Levy M, Boullis N, Rao M, Svendsen CN. Regenerative cellular therapies for neurologic diseases. Brain Res. 2016;1638(Pt A):88-96. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.06.053. PMID: 26239912. PMCID: PMC4733583.
9. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol. 2005;46(7):1339-50. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.05.079. PMID: 16198853.
10. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. Int Immunol. 2004;16(2):249-56. PMID: 14734610.
11. O'Neill EJ, Day MJ, Wraith DC. IL-10 is essential for disease protection following intranasal peptide administration in the C57BL/6 model of EAE. J Neuroimmunol. 2006;178(1-2):1-8. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2006.05.030. PMID: 16872684. PMCID: PMC3399771.
12. Huss DJ, Winger RC, Cox GM, Guerau-de-Arellano M, Yang Y, Racke MK, et al. TGF- $\beta$  signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. Eur J Immunol. 2011;41(10):2987-96. DOI: 10.1002/eji.201141666. PMID: 21728174. PMCID: PMC3478765.
13. Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. Exp Hematol. 2012;40(9):761-70. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.05.006. PMID: 22634392.
14. Pichkur LD, Kovalchuk MV, Deryabina OH, Verbovska SA, Akinola ST, Shuvalova NS, et al. Vyzhyvannya transplantovanykh mezenkhimal'nykh stovburovykh klityn vartonyvykh drahliv pupovyny lyudyny v tseentralniy nervoviy systemi shchuriv pry eksperymentalnomu alerhichnomu entsefalomyeliti pislya yikh suboktsypitalnoho vvedennya. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;3:30-5. Dostupno: <http://theunj.org/article/download/112102/107234> [in Ukrainian].
15. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes [Internet]. Council of Europe. 2017 [cited 24 May 2017]. Available from: <https://rm.coe.int/168007a67b>.
16. Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennya» vid 21.02.2006 No 3447-IV [Internet]. Verkhovna Rada of Ukraine. 2017 [cited 24 May 2017]. Dostupno: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/3447-15> [in Ukrainian].
17. Tsybalyuk VI, Velychko OM, Verbovska SA, Pichkur LD, Shuvalova NS. Vplyv mezenkhimalnykh stovburovykh klityn z Vartonovoho studnya pupovyny lyudyny ta interleykinu-10 na povedinkovi reaktsiyi shchuriv z eksperymentalnym alerhichnym entsefalomyelitom. Cell and organ transplantology. 2015;3(1):40-5. DOI: 10.25305/unj.45290 [in Ukrainian].
18. Tsybalyuk VI, Deryabina JG, Shuvalova NS, Maslova OO, Pokholenko YO, Toporova OK, et al. Fenotypovi zminy i proliferatyvnyy potentsial mezenkhimalnykh stovburovykh klityn z Vartonovykh drahliv pupovyny lyudyny v umovakh kultyvuvannya. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2015;2:17-24. DOI: 10.25305/unj.45290 [in Ukrainian].

19. Okuneyev OV, Palyvoda OH, Konstantynova HO, Irodov DM, Pokholenko YO. Klonuvannya interleykinu-10 lyudyny (hIL-10) ta doslidzhennya vplyvu skladu pozhyvnoho seredovyshcha na yoho syntez u klitynakh E.coli. Zbirnyk tez VII Mizhnarodnoyi naukovoyi konferentsiyi «Molod i postup biolohiyi»; 2011 April 5-8; Lviv, Ukraine. Lviv (UA): Ivan Franko National University of Lviv; 2011. s. 167. [in Ukrainian].
20. Pichkur LD, Semenova VM, Verbovska SA, Oleksenko NP, Akinola ST. Osoblyvosti perebihu eksperymentalnoho alerhichnoho entsefalomyelitu pislya transplantatsiyi stovburovykh klityn. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;2:27-33. DOI: 10.25305/unj.104500 [in Ukrainian].

### **ВПЛИВ КСЕНОГЕННОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НАТИВНИХ І ТРАНСФІКОВАНИХ ГЕНОМ ІНТЕРЛЕЙКІНА-10 МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ**

**Цимбалюк В. І., Пичкур Л. Д., Вербовська С. А., Акінола С. Т., Васлович В. В., Дерябіна О. Г., Похолєнко Я. О., Топорова О. К., Шувалова Н. С., Кордюм В. А.**

**Резюме.** Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) здатні стимулювати олігодендрогенез, секрецію проти-запальних цитокинів, впливати на процеси де- і ремієлінізації у ЦНС при експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ). *Мета роботи:* дослідити вплив нативних МСК Вартонових драглів пуповини людини та трансфікованих (МСКТ) геном інтерлейкіна 10 (ІЛ-10) на клінічний перебіг ЕАЕ. *Об'єкт і методи.* Дослідження проведено на 46 білих щурах-самицях вагою 200-230 г. Рецидивуючий перебіг ЕАЕ індукували введенням у подушечки задніх лапок гомогенату спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (фірма «SIGMA», USA). Тварин розподілили на 4 групи з різною схемою внутрішньовенного або субоципітального введення ІЛ-10, МСК та МСКТ. Синтез рекомбінантного ІЛ-10 та трансфекцію плазмідом, що містить кДНК-овий варіант гена ІЛ-10, в МСК Вартонових драглів пуповини людини 2-го пасажу проведено в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. Ступінь тяжкості клінічного стану оцінювали в балах. Статистичну обробку даних проводили за допомогою MS Excel 2007 і STATISTICA 6.1. *Результати.* У тварин всіх експериментальних груп виявлено середню важкість стану (1,3 – 1,8 бали) на піку захворюваності (20 – 22 доба) і хронічний ремітуючий перебіг захворювання.

Застосування МСКТ (гр.3), протизапального ІЛ-10 і МСК (гр.4) у різних комбінаціях сприяє повному клінічному одужанню тварин до 32 доби експерименту. Порівняння динамічних рядів засвідчує більшу ефективність застосування на 10 добу внутрішньовенно ІЛ-10 і на 17 добу – МСК з ІЛ-10 та субоципітально МСКТ.

Прискорення спаду показника ступеню тяжкості клінічного стану в гр. 3 і 4 на 28 добу становило для обох вищевказаних груп дослідження – 50%.

**Ключові слова:** експериментальний алергічний енцефаломієліт, мезенхімальні стовбурові клітини, інтерлейкін-10, трансфекція гена, ксенотрансплантація.

### **ВЛИЯНИЕ КСЕНОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ НАТИВНЫХ И ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ ГЕНОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА**

**Цимбалюк В. І., Пичкур Л. Д., Вербовская С. А., Акінола С. Т., Васлович В. В., Дерябіна О. Г., Похолєнко Я. О., Топорова О. К., Шувалова Н. С., Кордюм В. А.**

**Резюме.** Мезенхімальні стовбурові клітини (МСКТ) способны стимулировать олігодендрогенез, секрецию противовоспалительных цитокинов, влиять на процессы де- и ремиелинизации в ЦНС при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ). *Цель работы:* изучить влияние нативных МСК Вартонового студня пуповины человека и трансфицированных (МСКТ) геном интерлейкина 10 (ИЛ-10) на клиническое течение ЭАЭ. *Объект и методы.* Исследования проведены на 46 белых крысах-самках весом 200-230 г. Рецидивирующее течение ЭАЭ индуцировали введением в подушечки задних лапок гомогената спинного мозга крыс с полным адъювантом Фрейнда (фирма «SIGMA», USA). Животных разделили на 4 группы с разными схемами внутривенного или субоципитального введения ИЛ-10, МСК и МСКТ. Синтез рекомбинантного ИЛ-10 и трансфекцию плазмидой, содержащей кДНК-овый вариант гена ИЛ-10, в МСК Вартонового студня пуповины человека 2-го пассажа проведено в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Степень тяжести клинического состояния оценивали в баллах. Статистическую обработку данных проводили с использованием MS Excel 2007 и STATISTICA 6.1. *Результаты.* У животных всех экспериментальных групп выявлено среднюю тяжесть состояния (1,3 – 1,8 балла) на пике заболевания (20 – 22 сутки) и хроническое ремитирующее течение заболевания. Введение МСКТ (гр.3), противовоспалительного ИЛ-10 и МСК (гр.4) в разных комбинациях способствует полному клиническому выздоровлению животных до 32 суток эксперимента. Сравнение динамических рядов свидетельствует о большей эффективности использования на 10 сутки внутривенно ИЛ-10 и на 17 сутки – МСК с ИЛ-10 и субоципитально МСКТ.

Ускорение снижения показателя степени тяжести клинического состояния животных в гр. 3 и 4 на 28 сутки составляло – 50%.

**Ключевые слова:** экспериментальный аллергический энцефаломиелит, мезенхимальные стволовые клетки, интерлейкин-10, трансфекция гена, ксенотрансплантация.

### **EFFECT OF XENOGENEIC TRANSPLANTATION OF NATIVE GENE TRANSFECTED INTERLEUKIN 10 MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS**

**Tsybaliuk V. I., Pichkur L. D., Verbovska S. A., Akinola S. T., Vaslovich V. V., Deriabina E. G., Pokholenko I. O., Toporova O. K., Shuvalova N. S., Kordium V. A.**

**Abstract.** The mesenchymal stem cells (MSC) of the Warton's jelly of the human umbilical cord give immunomodulatory effects, stimulate oligodendrogenesis, secretion of anti-inflammatory cytokines, and decrease demyelination in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis (EAE). These properties can be extremely important for the correction of autoimmune states.

**Aim of the study.** To study the influence of the umbilical cord –derived MSC and anti-inflammatory IL-10 on EAE's course. **Object and methods.** The study was conducted on 46 white, non-breeding, sexually mature female rats weighing 200-230 g. The recurrent course of the EAE was induced via injection of homogenate of the rat's spinal cord with Freund's adjuvant (produced by "SIGMA", USA) into the hind limb on the plantar surface. Animals were divided into 4 groups with different intravenous or suboccipital injection scheme IL-10, MSC and MSCT. All animals were divided into 4 groups depending on the MSC and IL-10 treatment scheme. Synthesis of recombinant IL-10 and transfection with plasmid containing the cDNA variant of the IL-10 gene in MSC of Warton's jelly of the human umbilical cord dangers of the 2nd passage were conducted at the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine. The degree of gravity of the clinical condition was evaluated in balls. Statistical processing of the data was performed using MS Excel 2007 and STATISTICA 6.1. **Results.** In animals of all experimental groups, the average severity of the condition (1.3 – 1.8 points) was found at the peak of the illness (20-22 days) and the chronic remitting course of the disease. In the comparison group (No. 1), the peak of clinical manifestations was observed at 22 days. In rats of group 2 after transplantation of xenogeneous MSCs for 17 days from the induction of EAE, the state deteriorated statistically insignificantly. The peak of clinical manifestations EAE was displaced for 20 days. Next, there was a gradual regress of the EAE clinic with a complete clinical recovery for 32 days. The course of EAE up to the peak of clinical manifestations in group № 4, which received two-stage treatment with interleukin and MSC, similar to the course of EAE in group № 2. However, after suboccipital administration of interleukin and MSC at day 17th, the severity of the EAE course increases significantly in the first two days followed by a statistically insignificant faster improvement compared to group № 2. A similar dynamics of recovery is observed in-group № 3, which was introduced with suboccipital administration of MSCT. Acceleration of the decline of the indicator of the severity of the clinical condition in groups 3 and 4 was for both of the above-mentioned study groups – 50% on the 28-th day. **Conclusions.** The use of MSCT, anti-inflammatory IL-10 and MSC in various combinations promotes complete clinical healing of animals up to 32th days of experiment. Comparison of dynamic rows shows a greater efficacy of intravenous use of IL-10 for 10th day and 17th day – of MSC with IL-10 and suboccipital MSCT.

**Key words:** experimental allergic encephalomyelitis, mesenchymal stem cells, interleukin-10, transfection of the gene, xenotransplantation.

Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.  
Стаття надійшла 19.03.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-234-238

УДК 577.35+577.352

<sup>1</sup>Шалай Я. Р., <sup>1</sup>Мандзинець С. М., <sup>1</sup>Гренюх В. П., <sup>2</sup>Фінюк Н. С., <sup>1</sup>Бабський А. М.

### ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ В КЛІТИНАХ ЛІМФОМИ НК/Љу і ГЕПАТОЦИТАХ ЗА ДІЇ НОВОСИНТЕЗОВАНОГО ПОХІДНОГО ТІАЗОЛУ

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка (м. Львів)

<sup>2</sup>Інститут біології клітини НАН України (м. Львів)

yarunash@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Роботу виконували у рамках держбюджетної теми 0116U001533 «Енергетичні процеси у мітохондріях ракових клітин та гепатоцитів за дії азолів і похідних фурану з протипухлинною активністю».

**Вступ.** Онкологічні захворювання займають друге місце серед причин смертності населення після серцево-судинних захворювань. Однією з найбільш поширених форм неоплазії є лімфома, яка становить 55,6% усіх випадків раку крові [1]. Лімфома – це група гематологічних захворювань лімфатичної тканини, для якої характерне збільшення лімфатичних вузлів і неконтрольоване нагромадження у внутрішніх органах ракових лімфоцитів. Лімфому Немет-Келлера (НК/Љу) широко використовують як модель раку

за дослідження ефектів різних протипухлинних хіміотерапевтичних препаратів [2].

Відомо, що неоплазматична трансформація тканин супроводжується зміною окисно-відновної рівноваги внаслідок зростання рівня активних форм Оксигену (АФО). Це призводить до активації процесу пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [3,4]. ПОЛ проходить у всіх мембранних структурах, у т.ч. мітохондріях, мікросомах, оболонках еритроцитів, лізосомах і мембранах ендоплазматичного ретикулулу.

Триває інтенсивний пошук нових ефективних протипухлинних препаратів [5]. Особливою групою речовин, яким притаманний широкий спектр дії, є похідні тіазолів, які проявляють окрім антипухлинної [6-10,11,12] також антибактерійну, протигрибкову, противірусну, протизапальну, протисудомну та ан-