

Оригінальна стаття = Original article = Оригинальная статья

УДК 616.832-002-056.3:616.9-092-089.843:591.81

Особливості перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту після трансплантації стовбурових клітинПічкур Л.Д.¹, Семенова В.М.², Вербовська С.А.¹, Олексенко Н.П.³, Акінола С.Т.¹¹ Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна² Лабораторія культивування тканин, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна³ Відділ нейробіохімії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, УкраїнаНадійшла до редакції 02.02.17.
Прийнята до публікації 30.03.17.**Адреса для листування:**Пічкур Леонід Дмитрович,
Відділення відновлювальної
нейрохірургії, Інститут
нейрохірургії ім. акад. А.П.
Ромоданова, вул. Платона
Майбороди, 32, Київ, Україна,
04050, e-mail: wurra@yandex.ru**Мета.** Вивчити перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) після внутрішньовенного введення гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) та субокципітальної нейротрансплантації фетальних нейроклітин (ФН), їх вплив на інтенсивність процесів відновлення нервової тканини у щурів при ЕАЕ.**Матеріали і методи.** Дослідження проведене на 40 щурах, маса тіла 200 г. ЕАЕ моделювали з використанням повного ад'юванта Фрейнда. В основній групі 32 щурам внутрішньовенно вводили ГСК (10 млн. чи 20 млн. клітин) та субокципітально ФН (2 млн.). Клінічний перебіг ЕАЕ оцінювали в період до 110 діб. Тварин виводили з експерименту через 23, 35 діб та 2 міс після моделювання ЕАЕ. Препарати забарвлювали за Нісслем, гематоксилином та еозином, гематоксилином та пікрофуксином, проводили морфометрію.**Результати.** У групі №1 (без введення ГСК та ФН) одужання тварин не спостерігали, з 26-ї доби відзначений хронічний перебіг ЕАЕ. Тваринам групи №2 вводили ГСК у дозі 10 млн. клітин, пік клінічних проявів ЕАЕ спостерігали на 20-ту добу з поступовим одужанням тварин. У щурів групи №3 введення ГСК у дозі 20 млн. клітин статистично значуще сприяло швидшому регресу клінічних проявів у порівнянні з таким в групі №2. Одужання тварин, яким вводили ГСК і ФН, відбувалося статистично значуще швидше ніж тварин, у яких застосовували лише ГСК. У щурів групи №5 (ГСК у дозі 20 млн. клітин з подальшим інтраокулярним введенням ФН) спостерігали тимчасове статистично значуще погіршення стану після введення ГСК та швидке покращення стану після введення ФН — на 29-ту добу. В усіх тварин спостерігали тенденцію до зменшення кількості патологічно змінених нейроцитів та кількості гліоцитів.**Висновки.** Найбільш виражений позитивний вплив на перебіг захворювання, швидкість відновлення клінічного стану тварин і збереження нейронів відзначали при внутрішньовенному введенні 20 млн. ГСК з подальшим субокципітальним введенням ФН, особливо на 63-тю добу спостереження.**Ключові слова:** експериментальний алергічний енцефаломієліт; нейротрансплантація; гемопоетичні стовбурові клітини; фетальні нейроклітини.

Український нейрохірургічний журнал. 2017;(2):27-33.

The features of experimental allergic encephalomyelitis after stem cells transplantationLeonid D. Pichkur¹, Vira M. Semenova², Svitlana A. Verbovska¹, Natalia P. Oleksenko³, Samuel T. Akinola¹¹ Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine² Tissue Cultivating Laboratory, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine³ Neurobiochemistry Department, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, UkraineReceived, February 02, 2017.
Accepted, March 30, 2017.**Address for correspondence:**Leonid Pichkur, Restorative
Neurosurgery Department,
Romodanov Neurosurgery Institute,
32 Platona Maiborody St, Kyiv,
Ukraine, 04050, e-mail: wurra@
yandex.ru**The objective.** To study the course of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) after intravenous administration of hematopoietic stem cells (HSC) and suboccipital transplantation of fetal neurocells (FNC), and treatment impact on intensity of neural tissue renewing in rats with EAE.**Materials and methods.** The experiment included 40 rats, average weight 200 g. EAE was induced using complete Freund's adjuvant. In 32 rats with EAE we used intravenous HSK (10 million cells or 20 million cells) and suboccipital transplantation of FNC (0.1 ml). The EAE clinical course was estimated up to 110 days. The rats were taken from the experiment on 23rd, 25th days and in 2 months after EAE induction. The preparations were stained by Nisse, with hematoxylin, eosin and picro-fuchsin. Morphological and morphometric studies were performed.**Results.** Complete recovery was not observed, and on the 26th day of the experiment EAE was regarded as a chronic process. After allogeneic HSC administration (in dose 10 million cells) peak of clinical manifestations was observed on the 20th day of the experiment with animals' gradual complete recovery. Administration of allogeneic HSC in a dose of 20 million cells leads to significantly more rapid regression of clinical signs compared to the treatment with allogeneic HSC in a dose of 10 million cells. Animals' recovery after intravenous introduction of HSC and suboccipital transplantation of FNC was significantly more rapid than after treatment just with HSC. The treatment

with intravenous introduction of HSC (20 million cells) and suboccipital transplantation of FNC was associated with temporary significant deterioration after HSC administration and rapid recovery after FNC application (on the 29th day). In all treatment options we revealed the tendency to reduction of pathologically changed neurocyts and gliocyts number.

Conclusion. Suboccipital administration of allogeneic FNC improves the clinical condition of rats with EAE. The best results of experimental EAE treatment were observed at intravenous administration of HSC (20 million cells) followed by FNC neurotransplantation, particularly on the 63rd day.

Keywords: *experimental allergic encephalomyelitis; neurotransplantation; hematopoietic stem cells; fetal neurocells.*

Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;(2):27-33.

Особенности течения экспериментального аллергического энцефаломиелимита после трансплантации стволовых клеток

Пичкур Л.Д.¹, Семёнова В.М.², Вербовская С.А.¹, Олексенко Н.П.³, Акинола С.Т.¹

¹ Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Лаборатория культивирования тканей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

³ Отдел нейробиохимии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 02.02.17.
Принята к публикации 30.03.17.

Адрес для переписки:

Пичкур Леонид Дмитриевич,
Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050, e-mail: wurra@yandex.ru

Цель. Изучить течение экспериментального аллергического энцефаломиелимита (ЭАЭ) после внутривенного введения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и субокципитальной нейротрансплантации фетальных нейроклеток (ФН), их влияние на интенсивность процессов восстановления нервной ткани крыс при ЭАЭ.

Материалы и методы. Исследование проведено на 40 крысах, масса тела 200 г. ЭАЭ моделировали с использованием полного адьюванта Фрейнда. В основной группе 32 крысам внутривенно вводили ГСК (10 млн. или 20 млн. клеток) и субокципитально 2 млн. ФН. Клиническое течение ЭАЭ оценивали в сроки до 110 сут. Животных выводили из эксперимента на 23-и, 35-е сутки и через 2 мес после моделирования ЭАЭ. Препараты окрашивали по Нисслю, гематоксилином и эозином, гематоксилином и пикрофуксином, проводили морфометрию.

Результаты. В группе №1 (без введения ГСК и ФН) полное выздоровление животных не наблюдали, с 26-х суток течение ЭАЭ было хроническим. В группе №2 вводили ГСК в дозе 10 млн. клеток, пик клинических проявлений наблюдали на 20-е сутки с постепенным выздоровлением животных. В группе №3 введение 20 млн. ГСК статистически значимо способствовало более быстрому регрессу клинических проявлений по сравнению с такими в группе №2. Выздоровление животных, которым вводили ГСК и ФН, происходило статистически значимо быстрее, чем у животных, которым вводили только ГСК. В группе №5 (ГСК в дозе 20 млн. клеток с последующим интратекальным введением ФН) наблюдали временное статистически значимое ухудшение состояния животных после введения ГСК и быстрое улучшение состояния после введения ФН — на 29-е сутки. У всех крыс наблюдали тенденцию к уменьшению количества патологически измененных нейроцитов и уменьшению количества глиоцитов.

Выводы. Наиболее выраженное позитивное влияние на течение заболевания, скорость восстановления клинического состояния животных и сохранность нейронов отмечены при внутривенном введении 20 млн. ГСК с последующим субокципитальным введением ФН, особенно на 63-и сутки наблюдения.

Ключевые слова: *экспериментальный аллергический энцефаломиелит; нейротрансплантация; гемопоэтические стволовые клетки; фетальные нейроклетки.*

Украинский нейрохирургический журнал. 2017;(2):27-33.

Вступ. Демієлінізація є патофізіологічним проявом різних захворювань, які поділяють на хвороби з наявним генетично детермінованим дефектом процесу закладання та формування мієліну (дисмієліноз) та хвороби з руйнуванням нормально синтезованого мієліну (мієлінокластичні). Саме до мієлінокластичних захворювань належать розсіяний склероз (РС), поствакцинальний та експериментальний енцефаломієліт, зокрема, ЕАЕ [1, 2].

На перебіг ЕАЕ впливають багато чинників, зокрема, продукти ембріофетоплацентарного комплексу

[1], аlogenна нервова тканина [3], компоненти ембріональної нервової тканини (ЕНТ) [4], стовбурові клітини кісткового мозку [5], ліпопротеїнові комплекси [6] тощо. Більшість дослідників вивчають вплив на ЕАЕ будь-яких чинників на висоті клінічних проявів захворювання [1, 3–5, 7, 8], вплив нейрогенних стовбурових клітин на процеси де- і ремієлінізації при ЕАЕ [3].

Перебіг ЕАЕ супроводжується порушенням генетичної недоторканості імунної системи, що за деяких ситуацій зумовлює аутоімунні реакції, за інших — толерантність [9].

При енцефаломієліті надзвичайно важливу роль відіграють аутоімунні реакції, які, в тому числі за типом мімікрії, беруть участь у руйнуванні структур нервової системи.

Для усунення аутоімунітету і попередження відторгнення нейрогенних клітин ми використали спосіб моделювання толерантності до аутоантигенів шляхом внутрішньовенного введення ГСК, здатних індукувати таку толерантність. Здатність стовбурових клітин живувати і зберігати властивості протягом тривалого часу після ксеногенної трансплантації встановлена нами раніше [10]. Таким чином, виникає стан мікрохімеризму. Гіпотетично мікрохімерні клітини мають бути недиференційованими, оскільки здатні циркулювати в організмі та заселяти різні органи, експресувати антигени, характерні для відповідних тканин, внаслідок чого їх вважають стовбуровими клітинами [11]. Мікрохімерні ГСК здатні диференціюватися у трофобласти, В- і Т-лімфоцити, моноцити, природні кілери (NK-клітини) у крові реципієнта. Фетальні мезенхімальні стовбурові клітини можуть диференціюватися в остеогенному, хондрогенному, біогенному, адипогенному та нейрогенному напрямках. Фетальні химерні клітини експресують маркери ендотеліально-го диференціювання VEGFR2+, CD31+, можуть брати активну участь у репарації пошкоджених тканин різних органів, зокрема, центральної нервової системи (ЦНС), в якій при деяких захворюваннях виявляють демієлінізацію [12].

Таким чином, з нашої точки зору, ГСК можуть сприяти формуванню толерантності і створювати сприятливі умови для виживання трансплантованих нейрогенних стовбурових клітин [13]. Це сприятиме продукції трофічних факторів та інтеграції ФН у тканину ЦНС реципієнта, замісному ефекту. Нейрогенні клітини здатні поповнювати склад клітин-попередниць, забезпечуючи умови для ремієлінізації аксонів, відновлення нервової тканини, зменшення моторного дефіциту при запально-дегенеративному ураженні ЦНС.

Мета роботи: вивчити вплив ГСК і нейрогенних стовбурових клітин на перебіг ЕАЕ та інтенсивність процесів відновлення нервової тканини в експерименті на щурах.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведене на 40 білих нелінійних щурах розводки віварію Інституту нейрохірургії, масою тіла 200–220 г. Всі процедури з дослідними тваринами виконували відповідно до міжнародних правил і норм European Communities Council Directives (1986, 86/609/EEC) та принципів Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей [14], Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" [15].

ЕАЕ моделювали шляхом підшкірної ін'єкції гомогенату спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда, що містив 3 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* з розрахунку 50 мг енцефалітогенної суміші на 100 г маси тіла тварини [16–18]. Енцефалітогенну суміш вводили у подушечки кінцівок фіксованих тварин.

Клінічний перебіг ЕАЕ оцінювали за такими ознаками: тонус м'язів кінцівок, тонус хвоста, стан сфинктерів, наявність парезу та паралічу, артриту, трофічних змін на кінцівках. Ступінь тяжкості оцінювали в балах (табл. 1). Клінічні спостереження за тваринами проводили щодня протягом 1 міс, у кожній тварини визначали ступінь тяжкості з огляду на зовнішні ознаки та клінічний стан. У подальшому тварин обстежували двічі на тиждень до 40-ї доби. Після зникнення клінічних проявів захворювання спостереження проводили 1 раз на тиждень до 63-ї доби. Тварин виводили з ек-

сперименту на 23-тю, 35-ту добу та через 2 міс після моделювання ЕАЕ.

У 32 щурів з ЕАЕ для аналізу залежності клінічного перебігу захворювання від кількості введених клітин внутрішньовенно вводили 0,25 мл суспензії (10 млн. клітин) і 0,5 мл суспензії (20 млн. клітин) алогенних ГСК з подальшим субоципітальним введенням ФН (2 млн. клітин в об'ємі 0,1 мл) (табл. 2).

Клітини вводили внутрішньовенно на 7-му добу після індукції ЕАЕ у хвостову вену фіксованих тварин. Субоципітальне введення здійснювали на 21-шу добу після індукції ЕАЕ, під загальним знеболенням шляхом введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща, в дозі 15 мг/кг) і кетаміну (Calypsol, Гедеон Ріхтер А.О., Угорщина, в дозі 10 мг/кг) внутрішньоочеревинно. Шерсть на шії вистригали ножицями, здійснювали пункцію великої потиличної цистерни, у лікворні простори вводили суспензію нейрогенних клітин.

Підготовку та вивчення клітинного складу суспензії ГСК та нейрогенних клітин проводили у відділі молекулярної біохімії.

Суспензію ГСК отримували з фетальної печінки щура (строки гестації 12–13 діб) за методом N. Shiojiri, M. Nitou [19]. Вміст живих клітин в суспензії визначали з застосуванням вітального барвника трипанового синього шляхом підрахунку в камері Горяєва [20, 21]. Для подальших досліджень використовували лише зразки з вмістом живих клітин не менше 80%. Загальна концентрація клітин в отриманій суспензії становила 40 млн. в 1 мл. Аналіз клітинного складу отриманої суспензії проводили на препаратах, забарвлених за Романовським—Гімза [22, 23].

Суспензію ФН щурів отримували за методом С.Н. Svedensen [20]. Вміст живих клітин в суспензії визначали за допомогою вітального барвника. Для подальших досліджень використовували лише зразки з вмістом живих клітин не менше 70%. Загальна концентрація клітин в отриманій суспензії становила 20 млн. в 1 мл.

Для встановлення кількості стовбурових нейрогенних клітин за допомогою імуногістохімічного методу виявляли нестин-позитивні (Nest⁺) та β-тубулін-позитивні клітини [20, 21]. Використовували первинні антитіла до нестину (Dako, Данія). Візуалізацію зв'язування здійснювали за допомогою системи Multivision Polymer Detection (Dako, Данія).

Для морфологічної оцінки клітинного складу сірої речовини спинного мозку тварин, у яких моделювали

Таблиця 1. Шкала тяжкості ЕАЕ.

Кількість балів	Прояви
0	Відсутність клінічних проявів
1	Зниження тону хвоста
2	Слабкість або легкий параліч задніх кінцівок
3	Тяжкий параліч задніх або всіх кінцівок
4	Термінальний стан
5	Смерть

Таблиця 2. Розподіл тварин по групах.

Група	Лікування
1	Контрольна, ЕАЕ без лікування
2	ГСК (0,25 мл суспензії, 10 млн. клітин)
3	ГСК (0,5 мл суспензії, 20 млн. клітин)
4	ГСК (0,25 мл суспензії, 10 млн. клітин) та нейротрансплантація (2 млн. клітин в об'ємі 0,1 мл)
5	ГСК (0,5 мл суспензії, 20 млн. клітин) та нейротрансплантація (2 млн. клітин в об'ємі 0,1 мл)

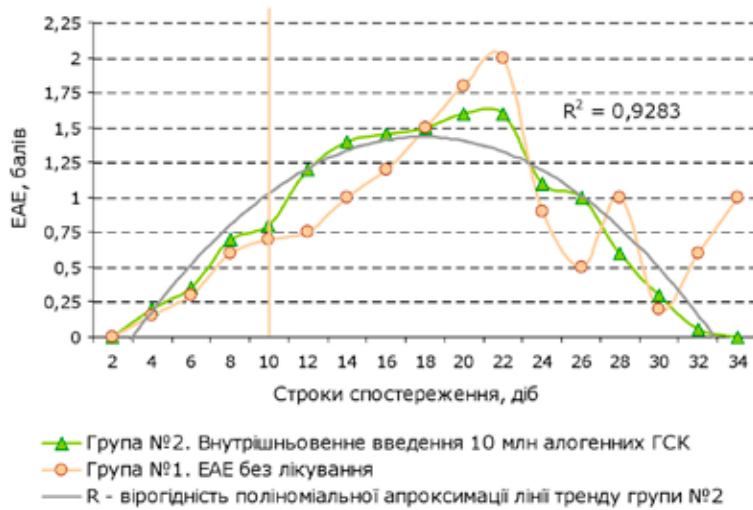


Рис. 1. Динаміка клінічного стану щурів, яким внутрішньовенно вводили 10 млн. алогенних ГСК.



Рис. 2. Динаміка клінічного стану щурів, яким вводили 20 млн. алогенних ГСК.



Рис. 3. Динаміка клінічного стану щурів групи №4, яким внутрішньовенно введено 10 млн. алогенних ГСК та субоципітально 2 млн. ФН.

EAE, у різних серіях дослідів відібрані найбільш якісні гістологічні препарати з приблизно однаковою товщиною зрізів, які забарвлювали тіоніном за Нісслем, гематоксиліном та еозином, гематоксиліном та пікрофуксином. Клітинами (нейроцити, гліоцити) зі зміненою цитологією вважали клітини з деформованим ядром, вакуолізацією, гіперхроматозом або хроматолізом, зменшеним об'ємом ядра, деформацією цитоплазми та тигролізом — ознаками, характерними для ішемічних змін. Клітини рахували у світлооптичному мікроскопі (цитоаналізатор зображення „IBAS-2000”, Німеччина) після виведення зображення на телемонітор. Загалом обраховані 180 полів зору, майже 8 тис. клітин.

Статистична обробка отриманих даних проведена за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні для малих сукупностей [24] та критерієм Ст'юдента. Використовували програму Microsoft Excel. Вивчали вірогідності поліноміальної апроксимації за тривалого спостереження за тваринами (міра поліному — 2). Апроксимація — наближений опис кореляційної залежності змінних відповідним рівнянням функціональної залежності, що передає основну тенденцію залежності або її «тренд» [24].

Результати та їх обговорення.

Динаміка клінічного стану щурів, яким вводили алогенні ГСК у дозі 10 млн. клітин, та щурів групи спостереження наведена на **рис. 1**. Через 12 дб після лікування спостерігали статистично значуще прискорення відновлення тонусу м'язів кінцівок в експериментальних тварин у більш ранні строки та більш динамічне, ніж у щурів контрольної групи. Слід звернути увагу, що у перші дні після трансплантації алогенних ГСК стан щурів погіршувався, проте, статистично незначуще. В подальшому спостерігали формування EAE з піком клінічних проявів на 20-ту добу з поступовим одужанням тварин. У групі №1 одужання тварин не спостерігали, з 26-ї доби перебіг EAE був хронічним.

Отже, введення щурам алогенних ГСК у дозі 10 млн. клітин супроводжувалося поступовим поліпшенням стану та прискоренням одужання, з тимчасовим статистично незначущим погіршенням стану після застосування клітин.

У зв'язку з цим, а також для вивчення залежності клінічного ефекту від кількості введених ГСК, вивчений вплив на перебіг EAE внутрішньовенного введення ГСК у більшій дозі — 20 млн. клітин (**рис. 2**). Через 10 дб після лікування спостерігали статистично значуще прискорення відновлення тонусу м'язів кінцівок в експериментальних тварин. Також у перші дні після трансплантації алогенних ГСК стан тварин статистично значуще погіршувався. У подальшому спостерігали формування EAE з піком клінічних проявів на 19-ту добу з поступовим одужанням тварин.

Крім того, відзначений статистично значущий регрес проявів ЕАЕ та одужання тварин групи №3, швидший за такий в групі №2.

Таким чином, у щурів групи №3 після введення 20 млн. алогенних ГСК клінічний стан тимчасово статистично значуще погіршувався з подальшим одужанням на 32-гу добу експерименту. Клінічний перебіг захворювання у щурів, яким вводили алогенні ГСК у дозі 20 млн. клітин (група №3), статистично значуще не відрізняється від такого в групі тварин №2.

Результати впливу алогенних ФН (в 0,1 мл суспензії 2 млн. нейрогенних клітин вводили субоципітально) на 21-шу добу спостереження після попереднього внутрішньовенного введення 10 млн. ГСК (група №4) і 20 млн. ГСК (група №5) представлені на **рис. 3 і 4**. У тварин групи №4 у перші дні після введення алогенних ГСК клінічний стан статистично незначуще погіршувався, у подальшому спостерігали (також, статистично незначуще) погіршення стану після введення ФН. Проте, одужання тварин відбувалося статистично значуще швидше, ніж щурів у групах №2 і №3.

У групі №5 у перші дні після введення алогенних ГСК стан щурів статистично значуще погіршувався, проте, у подальшому, після нейротрансплантації, погіршення стану щурів статистично значуще не відбувалося. Одужання тварин, яким вводили ГСК у більшій дозі та ФН, відбувалося швидше — на 29-ту добу, а лінія тренду мала більш експансивний напір.

Таким чином, стан щурів, яким вводили ГСК у дозі 10 млн. клітин з подальшим інтратекальним введенням ФН, характеризувався тимчасовим статистично незначущим погіршенням після кожного лікування. Проте, слід мати на увазі, що тварин перед субоципітальним введенням ФН наркотизували, що, на тлі клінічних проявів ЕАЕ, також зумовлювало погіршення їх клінічного стану. У цілому, регрес проявів ЕАЕ при застосуванні алогенних ГСК у дозі 10 млн. клітин з подальшим введенням ФН статистично значуще швидший, ніж у тварин груп №2 і №3.

Під час морфометричного оброблення результатів гістологічного дослідження тканини спинного мозку у кожному полі зору рахували загальну кількість нейронів, нейронів зі зміненою і нормальною цитологією, а також кількість гліоцитів. Кількість патологічно змінених нейронів помітно зменшувалася у дослідних групах тварин порівняно з такою в групі №1, особливо на 35-ту добу дослідження, з поступовим збільшенням їх кількості в групах №2 і №4 на 63-тю добу. Так, у групі №1 вона становила $7,7 \pm 1,1$, в групі №5 — $3,7 \pm 0,5$. При введенні тваринам тільки ГСК або ГСК у дозі 10 млн. клітин з ФН кількість патологічно змінених нейроцитів наближалась до такої в групі №1 (**рис. 5, 6**). На 63-тю добу кількість

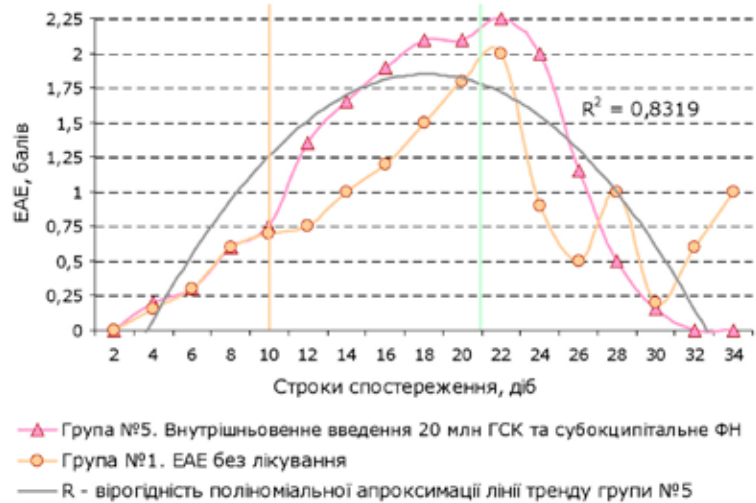


Рис. 4. Динаміка клінічного стану щурів групи №5, яким вводили 20 млн. алогенних ГСК та субоципітально 2 млн. ФН.

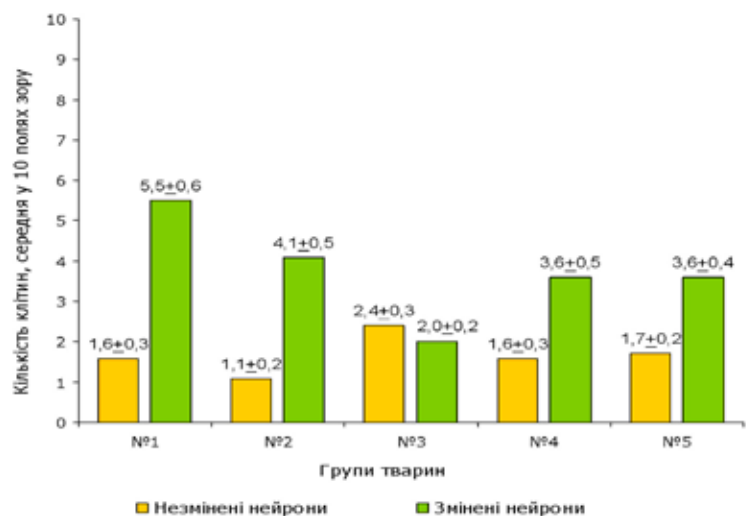


Рис. 5. Морфологічна оцінка клітинного складу спинного мозку у щурів з ЕАЕ на 35-ту добу.

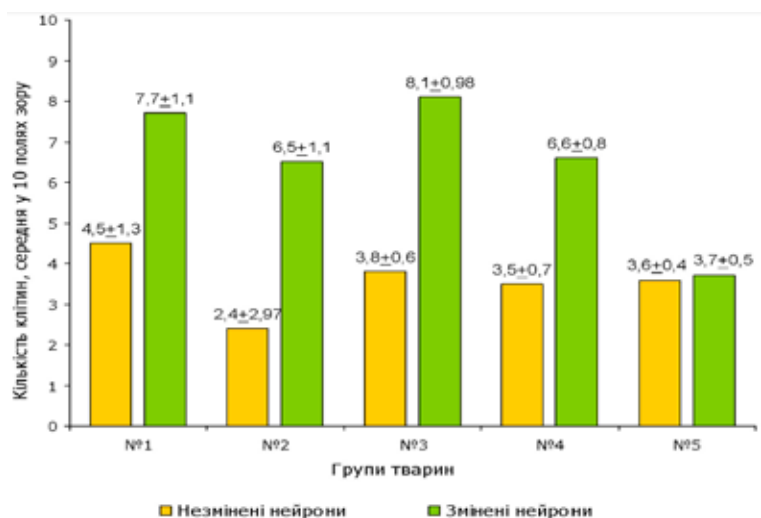


Рис. 6. Морфологічна оцінка клітинного складу спинного мозку у щурів з ЕАЕ на 63-тю добу.

незмінених нейронів суттєво не відрізнялася в усіх групах, крім групи №2.

Динаміка кількості гліальних клітин свідчила, що у тварин групи №1 на 20% збільшувалася кількість гліоцитів, що свідчило про активацію їх проліферації. Спостерігали зменшення кількості гліоцитів в усіх експериментальних тварин, особливо в групі №5.

У цілому, результати морфометричних досліджень свідчили про ефективність застосування в гострому періоді експериментального запально-дегенеративного ураження ЦНС хірургічного методу, що передбачав субокципітальне введення у лікворні простори алогенних ФН, особливо за попереднього застосування ГСК в кількості 20 млн. Відзначено меншу ефективність лише внутрішньовенного введення ГСК. Так, загальна структура спинного мозку після введення малої дози ГСК суттєво не відрізнялася від такої у тварин контрольної групи.

В трансплантології важливим чинником успішності приживлення клітин є досягнення імунної толерантності. Тривала толерантність без фармакологічної супресії може існувати, наприклад, при трансплантації ГСК. Деякі дослідники вважають зміну імунної відповіді у реципієнтів при мікрохімеризмі, спричиненому донорськими ГСК, як індукцію взаємної імунологічної нереактивності [25, 26].

Отримані нами результати вивчення впливу клітинної терапії на перебіг ЕАЕ свідчать про можливість виникнення такої нереактивності, оскільки кращі результати досягнуті у тварин, яким внутрішньовенно вводили 20 млн. ГСК і в подальшому субокципітально ФН.

Висновки. 1. Клінічний перебіг захворювання у тварин контрольної групи, зміни морфометричних показників спинного мозку свідчили про відповідність моделі ЕАЕ хронічному процесу ремітуючого перебігу розсіяного склерозу.

2. В усіх експериментальних тварин виявлена позитивна динаміка клінічного стану і перебігу захворювання, без переходу процесу в хронічний. Деяке погіршення стану тварин в групах №3 і №5 після введення клітин можна пояснити впливом наркозу або великої кількості ГСК.

3. Найбільш виражений позитивний вплив на перебіг захворювання, швидкість відновлення клінічного стану тварин і збереження нейронів відзначали при внутрішньовенному введенні 20 млн. ГСК з подальшим субокципітальним введенням ФН, особливо на 63-тю добу спостереження.

Список літератури

1. Гусев Е.И. Рассеянный склероз / Е.И. Гусев, Т.Л. Демина, А.Н. Бойко. — М.: Нефть-газ, 1997. — 464 с.
2. Гусев Е.И. Неврология и нейрохирургия: учебник: в 2 т. / Е.И. Гусев, А.Н. Коновалов, В.И. Скворцова. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — Т.2. — 420 с.
3. Грищенко В.И. Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации / В.И. Грищенко // Пробл. криобиологии. — 2001. — №3. — С.7–8.
4. Супрессия экспериментального аллергического энцефаломиелиита субокципитальным введением трофина – экстракта эмбриональной нервной ткани / В.И. Цымбалюк, Н.И. Лисяний, О.В. Маркова, Л.Д. Пичкур, Т.И. Осипенко // Аллергология и иммунология. — 2001. — Т.2, №2. — С.135.
5. Изучение иммуномодулирующих свойств адгезивных клеток костного мозга / Н.И. Лисяний, Е.В. Задорожная, И.А. Гнедкова, Л.Н. Бельская, Д.Н. Станецкая, А.И. Ключникова // Иммунология та алергологія: наука і практика. — 2013. — №3. — С.4–8.
6. Кононенко В.В. Герпесвіруси від синдрому хронічної втоми до органічних уражень центральної нервової системи / В.В. Кононенко, Ю.А. Борштейн, Т.В. Сольська // Иммунология та алергологія. — 2001. — №4. — С.36.
7. Вплив нейrogenних клітин на процеси де- та ремієлінізації в експерименті / В.І. Цимбалюк, Л.Д. Пичкур, В.М. Семенова, В.В. Васлович, Ю.А. Касяненко, О.В. Маркова, С.А. Вербовська, О.Л. Пичкур // Матеріали конф. нейрохірургів України «Досягнення нейрохірургії останнього десятиріччя» в рамках міжнар. мед. форуму «Інновації в медицині — здоров'я нації» (Київ, 26–27 верес. 2012 рр.). — К., 2012. — С.113.
8. Брондз Б.Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании / Б.Д. Брондз. — М.: Наука, 1987. — 471 с.
9. Starzl T.E. Chimerism and tolerance in transplantation / T.E. Starzl // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — V.101, suppl.2. — P.14607–14614.
10. Distribution of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly in the central nervous systems of the EAE rats / M.V. Kovalchuk, O.G. Deryabina, L.D. Pichkur, S.A. Verbovskaya, N.S. Shuvalova, O.L. Pichkur, V.A. Kordium // Biopolymers and Cell. — 2015. — V.31, N5. — P.371–378.
11. Гринь В.К. Микрохімеризм. І. Возможные источники и роль при аутоиммунных заболеваниях / В.К. Гринь, А.М. Гнилорыбов, Е.С. Иващенко, Н.Н. Трубникова, В.А. Мелёхина, О.Е. Полулях, В.В. Риджок // Укр. ревматолог. журн. — 2011. — №1(43). — С.43–51.
12. Muja N. 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 / N. Muja, M.E. Cohen, J. Zhang, H. Kim, A.A. Gilad, P. Walczak, T. Ben-Hur, J.W. Bulte // Magn. Reson. Med. — 2011. — V.65, N6. — P.1738–1749.
13. Цымбалюк В.И. Нейрогенные стволовые клетки: монография / В.И. Цымбалюк, В.В. Медведев. — К.: Коваль, 2005. — 596 с.
14. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of European. — Strasbourg, 1986. — N123. — 51 p.
15. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.06 №3447-IV // Відомості Верховної Ради України. — 2006. — №27. — С.990.
16. Лисяний М.І. Моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів і його корекція клітинами алогенного головного мозку / М.І. Лисяний, О.В. Маркова, Л.М. Бельська // Фізіол. журн. — 2001. — Т.47, №5. — С.37–41.
17. Нефьодов О.О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісн. пробл. біології і медицини. — 2014. — вип.4, Т.2(114), вип.4. — С.205–208.
18. Давыдова Г.С. Вопросы направленного моделирования аллергического энцефаломиелиита / Г.С. Давыдова // Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике. — Минск: Наука и техника, 1975. — С.24–33.
19. Shiojiri N. Purification and culture of fetal mouse hepatoblasts that are precursors of mature hepatocytes and biliary epithelial cells / N. Shiojiri, M. Nitou // Methods Mol. Biol. — 2012. — V.826. — P.3–10.
20. A new method for the rapid and long-term growth of human neural precursor cells / C.N. Svendsen, M.G. ter Borg, R.J. Armstrong, A.E. Rosser, S. Chandran, T. Ostenfeld, M.A. Caldwell // J. Neurosci. Method. — 1998. — V.85, N2. — P.141–152.
21. In vitro expansion of a multipotent population of human neural precursor cells / M.K. Carpenter, X. Cui, Z.Y. Hu, J. Jackson, S. Sherman, A. Seiger, L.U. Wahlberg // Exp. Neurol. — 1999. — V.158, N2. — P.265–278.
22. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили. — М.: Наука, 1969. — 540 с.
23. Гривцова Л.Ю. Субпопуляция трансплантируемых стволовых клеток // Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын / Онкогематология. — 2006. — Т.8, №1. — С.65–71.
24. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, Н.Н. Бабич. — К.: Морион, 2001. — 320 с.

25. Соколова Л.И. Показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных рассеянным склерозом с герпесвирусной персистенцией / Л.И. Соколова, А.А. Кругляк // Иммунология та алергологія. — 2003. — №4. — С.84–85.
26. Lassmann H. Multiple sclerosis: experimental models and reality. / H. Lassmann, M. Bradl // *Acta Neuropathol.* — 2017. — V.133, N2. — P.223–244.
- ### References
- Gusev EI, Demina TL, Boyko AN. *Rasseyannyi skleroz. [Multiple Sclerosis]*. Moscow: iNeft'-gaz;1997. Russian.
 - Gusev EI, Kononov AN, Skvortsova VI. *Nevrologiya i neyrokhirurgiya: uchebnik. [Neurology and Neurosurgery: A textbook]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. 2nd ed. Vol.2. Russian.
 - Grishchenko VI. Rol' kriobiologii v sozdanii biotekhnologii kletochnoy i tkanevoy transplantatsii. [Cryobiology role in the creation of biotechnology cell and tissue transplantation]. *Problemy Cryobiologii.* 2001;3:7-8. Russian.
 - Tsybaliuk VI, Lisiany NI., Markova OV, Pichkur LD, Osipenko TI. Supressiya eksperimental'nogo allergicheskogo entsefalomiyelita suboktsipital'nym vvedeniyem trofina – ekstrakta embrional'noy nervnoy tkani. [Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intrathecal injection of trofin – extract embryonic neural tissue]. *Allergology and Immunology.* 2001;2(2):135. Russian.
 - Lisiany NI, Zadorozhnaya EN, Gniedkova IA, Bel'ska LN, Klyuchnikova AI. Izucheniye immunomoduliruyushchikh svoystv adgezivnykh kletok kostnogo mozga. [Study of the immunomodulatory properties of adhesive cells of bone marrow] *Immunology and Allergology: Science and Practice.* 2013;3:4-8. Russian. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2013_3_3
 - Kononenko VV, Borshteyn YA, Solska TV. Herpesvirusy vid syndromu khronichnoyi vtomy do orhanichnykh urazhen' tsentral'noyi nervovoyi systemy. [Herpesvirus from chronic fatigue syndrome to organic lesions of the central nervous system]. *Immunology and Allergology.* 2001;4:36. Ukrainian.
 - Tsybalyuk VI, Pichkur LD, Semenova VM, Vaslovych VV, Kasyanenko YA, Markova OV, Verbovska SA, Pichkur OL. *Vplyv neyrohennykh klityn na protsesy de- ta remiyelinizatsiyi v eksperymenty. [Impact of neurogenic cells on the processes of de- and remyelination in experiment]*. In: Abstracts Book of the Conf. of Neurosurgeons of Ukraine "Dosyahnennya neyrokhirurhiyi ostann'oho desyatyrichchya» v ramkakh mizhnar. med. forumu «Innovatsiyi v medytsyni — zdorov'ya natsi "; 2012 September 26-27; Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2012. P.113. Ukrainian.
 - Brondz BD. *T-limfotsity i ikh retseptory v immunologicheskoy raspoznavanii. [T-lymphocytes and their receptors in immunological recognition]*. Moscow: Science; 1987. Russian.
 - Starzl TE. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101 Suppl. 2:14607-14. DOI:10.1073/pnas.0404829101. PMID:15319473.
 - Kovalchuk MV, Deryabina O.G., Pichkur LD, Verbovska SA, Shuvalova NS, Pichkur OL, Kordium VA 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):371-8.
 - Grin VK, Gnylorybov AM, Ivaschenko YS, Trubnikova NN, Melokhina VA, Polulyakh OY, Ridzhok VV. Mikrokhimizm. I. Vozmozhnyye istochniki i rol' pri autoimmunnykh zabolevaniyakh. [Microcymerism. I. Possible sources and role in autoimmune diseases]. *Ukrainian Journal of Rheumatology.* 2011;1(43):43-51. Russian.
 - Muja N, Cohen ME, Zhang J, Kim H, Gilad AA, Walczak P, Ben-Hur T, Bulte JW. 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;65(6):1738-49. DOI:10.1002/mrm.22757. PMID:21305597.
 - Tsybalyuk VI, Medvedev VV. *Neyrogennyye stvolovyye kletki: monografiya. [Neurogenic stem cells: Monograph]*. Kiev: Koval'; 2005. Russian.
 - European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.* Council of Europe. Strasbourg; 1986. 51 p.
 - Zakon Ukrainy «Pro zahyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennja» vid 21.02.2006 №3447-IV [Law of Ukraine «On the Protection of Cruelty to Animals» from 21.02.2006 №3447-IV]. Vidomosti Verhovnoi' Rady Ukraїny, 2006;27:990. Ukrainian.
 - Lisiany MI, Markova OV, Bel'ska LN. Modelyuvannya eksperymental'noho alerhichnoho entsefalomiyelitu u shchuriv i yoho korektsiya klitynamy alohennoho holovnoho mozku. [Modelling of experimental allergic encephalomyelitis for rats and his correction by the cells of allogenic cerebrum]. *Fiziol Zhurn.* 2001;47(5):37-41. Ukrainian.
 - Nefedov AA, Mamchur VI, Kharchenko YV. Modelyuvannya ta otsinka perebihu eksperymental'noho alerhichnoho entsefalomiyelitu. [Modelling and evaluation of experimental allergic encephalomyelitis]. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny.* 2014;2(4):205-8. Ukrainian. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2014_4%282%29__46
 - Davydova GS. *Voprosy napravlennogo modelirovaniya allergicheskogo entsefalomiyelita. [Questions of directed simulation of allergic encephalomyelitis]*. In: Demiyeliniziruyushchiye zabolevaniya nervnoy systemy v eksperimente I klinike. [Demyelinating diseases of the nervous system in the experimental and clinic]. Minsk: Nauka i tehnika; 1975. p.24-33. Russian.
 - Shiojiri N, Nitou M. Purification and culture of fetal mouse hepatoblasts that are precursors of mature hepatocyte and biliary epithelial cells. *Methods Mol Biol.* 2012;826:3-10. DOI:10.1007/978-1-61779-468-1_1. PMID:22167635.
 - Svendsen CN, Borg MG, Armstrong RE, Rosser AE, Chandran S, Ostefeld T, Caldwell MA. A new method for the rapid and long-term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Method.* 1998;85(2):141-52. PMID:9874150.
 - Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, Jackson J, Sherman S, Seiger A, Wahlberg LU. In vitro expansion of a multipotent population of human neural precursor cells. *Exp Neurol.* 1999;158(2):265-78. DOI:10.1006/exnr.1999.7098. PMID:10415135.
 - Lilly R. *Patogistologicheskaya tekhnika i prakticheskaya gistokhimiya. [Histopathological techniques and practical histochemistry]*. Moscow: Nauka; 1969. Russian.
 - Grivtsova LY, Tupitsyn NN. Subpopulyatsiya transplantiruyemykh stvolovykh kletok. [Subpopulation of transplanted stem cells]. *Oncohematologiya.* 2006;8(1):65-71. Russian.
 - Lapach SN, Chubenko AV, Babich NN. *Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniyem Excel. [Statistical methods in biomedical research using Excel]*. Kiev: Morion; 2001. Russian.
 - Sokolova LI, Kruglyak AA. Pokazateli kletochnogo i gumoral'nogo immuniteta u bol'nykh rasseyannym sklerozom s herpesvirusnoy persistentsiyey. [Indexes of cellular and humoral immunity in multiple sclerosis patients with herpesvirus persistence]. *Imunolohiya ta alerholohiya.* 2003(4):84-5. Russian.
 - Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):223-44. DOI:10.1007/s00401-016-1631-4. PMID:27766432.