

Оригінальна стаття = Original article = Оригинальная статья

DOI: <https://doi.org/10.25305/unj.117776>**Вплив нативних мезенхімальних стовбурових клітин та трансфікованих геном інтерлейкіну-10 на поведінкові реакції щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті**Цимбалюк В.І.¹, Величко О.М.², Пічкур Л.Д.¹, Акінола С.Т.¹, Вербовська С.А.¹, Шувалова Н.С.³, Топорова О.К.^{3,4}, Дерябіна О.Г.³¹ Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна² Лабораторія експериментальної нейрохірургії відділу експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна³ Відділ генних технологій, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ, Україна⁴ Відділ регуляторних механізмів клітини, Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, УкраїнаНадійшла до редакції 18.12.2017
Прийнята до публікації 12.01.2018**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: L.Pichkur@neuro.kiev.ua**Мета:** на моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) вивчити вплив нативних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та МСК, трансфікованих плазмідним вектором, що містить ген ІЛ-10, на поведінкові реакції щурів у «відкритому полі».**Матеріали і методи.** ЕАЕ індукували з використанням гомогенату спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда. Щурів лікували шляхом внутрішньовенного (на 10-ту добу експерименту) та/або субоципітального (на 17-ту добу) введення у різних поєднаннях ІЛ-10 та МСК, а також трансфікованих МСК (МСКТ). МСК виділяли методом експлантів з Вартонових драглів пупкового канатика людини. Для отримання МСКТ їх культивували до 2-го пасажу, потім трансфікували плазмідом, що містить кДНК варіант гена ІЛ-10 і маркерний ген зеленого флуоресцентного білка (GFP). Рекombінантний ІЛ-10 людини отриманий в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України і люб'язно наданий для проведення експерименту. Досліджували поведінкові реакції щурів у «відкритому полі».**Результати.** При ЕАЕ на 12-ту добу спостерігали суттєві зміни поведінки щурів. Комбіноване застосування МСК і ІЛ-10 сприяло корекції порушень показників орієнтовно-дослідницької активності та емоційної сфери щурів з ЕАЕ і більш ефективно, ніж застосування МСКТ.**Висновки.** Застосування МСК, трансфікованих плазмідним вектором, що містить ген ІЛ-10, у щурів з індукованим ЕАЕ є більш ефективним, ніж нетрансфікованих МСК. Комбіноване застосування МСК і ІЛ-10 більш ефективно, ніж МСКТ.**Ключові слова:** експериментальний алергічний енцефаломієліт; мезенхімальні стовбурові клітини; інтерлейкін-10; тест «відкрите поле»**Український нейрохірургічний журнал. 2018;(1):66-72****The influence of native MSC, interleukin-10 and MSC transfected with interleukin-10 gene on behavioral reactions of rats with EAE**Vitaliy I. Tsybaliuk¹, Olga M. Velichko², Leonid D. Pichkur¹, Samuel T. Akinola¹, Svitlana A. Verbovska¹, Nadija S. Shuvalova³, Olena K. Toporova^{3,4}, Olena G. Deriabina³¹ Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine² Laboratory of Experimental Neurosurgery, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine³ Department of Gene Technology, Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Kyiv, Ukraine⁴ Department of Regulatory Mechanisms of Cells, Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv, Ukraine

Received: 18 December 2017

Accepted: 12 January 2018

Address for correspondence:

Leonid D. Pichkur, Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, 32 Platona Maiborody St., Kyiv, Ukraine, 04050, e-mail: L.Pichkur@neuro.kiev.ua

Objective. The influence of native mesenchymal stem cells (MSC), interleukin-10 and MSC, transfected with plasmid vector that contains interleukin-10 (IL-10) gene, on behavioral reactions of rats in the open field test.**Materials and methods.** EAE was induced by injection of spinal cord homogenate with complete Freund's adjuvant. Rats with EAE were treated with intravenous (on the 10th day) and/or suboccipital (on the 17th day) injections of different combination of MSC, IL-10 and transfected MSC. MSC were derived from Wharton's jelly of human umbilical cord using explant method. Secondary plant MSC were transfected with plasmid that contained cDNA gene of IL-10 and marker green fluorescent protein (GFP) gene. Recombinant IL-10 gene has been derived in Institute of Molecular Biology and Genetics and courtesy for it for the study. We studied behavioral reactions of rats in the open field test.**Results.** Induced EAE was found to provoke dramatically change in rats behavior in the open field test. The combination of both MSC and IL-10 facilitated greater efficiency, in comparison to transfected MSC, the adjustment of behavioral disorders of orientation, exploration and emotional reactions in rats with EAE.**Conclusions.** Treatment of EAE in rats with MSC, transfected with plasmid vector that contains IL-10 gene showed greater efficacy in comparison to treatment with non-transfected MSC. Treatment of EAE in rats with combination of both MSC and IL-10 showed greater efficacy in comparison to treatment with transfected MSC.**Key words:** experimental allergic encephalomyelitis; mesenchymal stem cells; interleukin-10; open field test**Ukrainian Neurosurgical Journal. 2018;(1):66-72**

Влияние нативных мезенхимальных стволовых клеток и трансфицированных геном интерлейкина-10 на поведенческие реакции крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите

Цымбалюк В.И.¹, Величко О.Н.², Пичкур Л.Д.¹, Акинола С.Т.¹, Вербовская С.А.¹, Шувалова Н.С.³, Топорова О. К.^{3,4}, Дерябина О.Г.³

¹ Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад.

А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Лаборатория экспериментальной нейрохирургии отдела экспериментальной нейрохирургии и клинической фармакологии Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

³ Отдел генных технологий Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина

⁴ Отдел регуляторных механизмов клетки «Институт молекулярной биологии и генетики» НАН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 18.12.2017
Принята к публикации 12.01.2018

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: L.Pichkur@neuro.kiev.ua

Цель: на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) изучить влияние нативных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), интерлейкина-10 (ИЛ-10) и МСК, трансфицированных плазмидным вектором, содержащим ген ИЛ-10, на поведенческие реакции крыс в «открытом поле».

Материалы и методы. ЭАЭ индуцировали с использованием гомогената спинного мозга крыс с полным адьювантом Фрейнда. Крыс лечили путем внутривенного (на 10-е сутки эксперимента) и/или субоципитального (на 17-е сутки) введения в разных сочетаниях ИЛ-10 и МСК, а также трансфицированных МСК (МСКТ). МСК выделяли методом эксплантов из Вартонового студня пупочного канатика человека. Для получения трансфицированных МСК их культивировали до 2-го пассажа, трансфицировали плазмидой, содержащей кДНК вариант гена ИЛ-10 и маркерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Рекомбинантный ИЛ-10 человека получен в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины и любезно предоставлен для проведения эксперимента. Исследовали поведенческие реакции крыс в «открытом поле».

Результаты. При ЭАЭ на 12-е сутки возникают существенные изменения поведения крыс. Комбинированное применение МСК и ИЛ-10 способствовало коррекции нарушений показателей ориентировочно-исследовательской активности и эмоциональной сферы крыс при ЭАЭ и более эффективно, чем применение трансфицированных МСК.

Выводы. Применение МСК, трансфицированных плазмидным вектором, содержащим ген ИЛ-10, у крыс при индуцированном ЭАЭ более эффективно, чем нетрансфицированных МСК. Комбинированное применение МСК и ИЛ-10 более эффективно, чем МСКТ.

Ключевые слова: экспериментальный аллергический энцефаломиелит; мезенхимальные стволовые клетки; интерлейкин-10; тест «открытое поле»

Украинский нейрохирургический журнал. 2018;(1):66-72

Вступ

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) привертають увагу дослідників своїми унікальними властивостями: здатністю до міграції у вогнище запалення та деструкції, швидким системним та місцевим впливом на імунну систему, особливо її імунорегуляторну ланку (CD4⁺, CD25⁺ – Т-лімфоцити-супресори, антигенпрезентуючі клітини), пластичністю, здатністю до трансдиференціювання *in vitro* у різні типи клітин, у тому числі в клітини нервової системи, доступністю джерел одержання (кістковий мозок, жирова тканина дорослої людини, пуповина плода тощо) [1-4]. За даними експериментальних досліджень *in vivo* після трансплантації МСК обирають напрямки диференціювання залежно від характеру середовища, в яке трансплантували ці клітини [5,6].

Найчастіше вивчають МСК, отримані з кісткового мозку або жирової тканини [7]. Ці клітини належать до категорії дорослих стовбурових клітин і, відповідно, мають деякі обмеження щодо застосування аlogenного матеріалу в медицині, пов'язані з особливостями реакції на них імунної системи реципієнта. Незважаючи на спільну назву, МСК з різних джерел мають значні відмінності щодо доступності та безпечності.

В попередніх дослідженнях в співпраці з колегами з Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Інституту молекулярної біології та

генетики НАН України ми вивчили біологію МСК з Вартонових драглів пуповини людини, розробили та вдосконалили оптимальні методи їх виділення, ідентифікації та отримання достатньої кількості клітин в культурі зі збереженням їх нативних характеристик. Вивчені питання якісного складу і зміни фенотипових характеристик клітин в умовах культивування [8]. Доведено, що культивовані МСК з Вартонових драглів пуповини людини добре проліферують *in vitro*, мають унікальні властивості (міграція в білу речовину спинного мозку після інтравентрикулярного введення, системний і локальний імунomodуючий вплив внаслідок швидкого збільшення кількості регуляторних лімфоцитів і зменшення кількості активованих антигенпрезентуючих клітин). Застосування трансфекційних технологій дозволило посилювати ефект МСК завдяки додатковій продукції протизапальних цитокінів [8].

Проте, існує думка, що пошкоджуючі чинники вогнища запалення негативно впливають на життєдіяльність введених МСК [9], імовірно, створюючи обмеження для повноцінної реалізації їх терапевтичного потенціалу. Тому перспективною є ідея одночасного застосування МСК і зменшення тяжкості запалення. Одним з ключових протизапальних цитокінів вважають ІЛ-10 [10]. Доведено його ключову роль у попередженні й лікуванні аутоімунних станів та аутоімунних захворювань ЦНС [11,12].

Нами зроблене припущення, що за одночасного застосування МСК та ІЛ-10 можливе взаємне посилення їх терапевтичного ефекту. З огляду на особливості й унікальні властивості МСК з Вартонових драглів пуповини людини, ми в експерименті вивчили ефективність їх застосування при вогнищевому ураженні ЦНС щурів, у яких моделювали ЕАЕ, у поєднанні з введенням ІЛ-10, з метою створення нового імуногенетичного стану та корекції рухових порушень у експериментальних тварин. Проведене експериментальне дослідження впливу нового методу лікування на поведінкові реакції щурів за тестом «відкрите поле», який базується на вивченні орієнтовно-дослідницької реакції тварин в стресогенних умовах, що дозволяє оцінити вираженість і динаміку окремих поведінкових елементів, рухову активність, стратегію дослідницького запам'ятовування обставинних стимулів, рівень емоційно-поведінкової реактивності тварини.

Представлені результати експериментальних досліджень ефективності застосування ІЛ-10, МСК, МСКТ та МСК у поєднанні з введенням ІЛ-10 при вогнищевому ураженні ЦНС щурів з модельованим ЕАЕ та впливу на поведінкові реакції тварин.

Мета: дослідити вплив ІЛ-10, нативних та трансфорованих геном ІЛ-10 МСК Вартонових драглів пуповини людини на поведінкові реакції щурів при індукованому ЕАЕ.

Матеріали і методи

Поведінку тварин вивчали за тестом «відкрите поле», реєстрували такі характеристики поведінки, як рухова (локомоторна) активність, дослідницькі реакції і реакції страху та уникнення незнайомого оточення, здатність адаптуватися та навчатися стратегії поведінки, найбільш адекватної в досліджуваній ситуації. Тест «відкрите поле» дає уявлення про основні характеристики психоемоційної та поведінкової активності тварин. Один з важливих типів поведінки, що забезпечує тварин інформацією про навколишнє середовище, є орієнтовно-дослідницька активність, яка включає рухову (локомоторну) активність щурів – горизонтальну локомоторну активність (перетин центральних і периферійних квадратів) і вертикальну локомоторну активність (вертикальні стійки – вставання на задні лапи для дослідження навколишнього середовища у вищій площині) та пізнавальну (дослідницьку) активність («заглядання в нірки»,

здатність тварини досліджувати «відкрите поле»). Для визначення ступеня емоційної напруги (емоційна активність) у «відкритому полі» досліджували: грумінгові реакції (активна поведінка тварин, спрямована на очищення поверхні тіла, тобто вмивання, вилузування шерсті) та дефекацію, що відображує вегетативну реакцію тварини на стрес, за кількістю фекальних болюсів.

Дослідження проведені в лабораторії експериментальної нейрохірургії відділу експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології на 53 білих безпородних щурах-самцях віком 3 міс, масою тіла 200-230 г. Тварин, розведених у віварії Інституту нейрохірургії, утримували в стандартних умовах із забезпеченням вільного доступу до води та їжі.

Всі процедури з дослідними тваринами здійснювали відповідно до міжнародних правил і норм European Communities Council Directives (1986), 86/609/EEC та принципів «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) [13]; Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [14].

ЕАЕ індукували з використанням гомогенату спинного мозку щурів з повним ад'ювантом Фрейнда (фірма «SIGMA», США) за методикою Г.С. Давидової [15] з зміною співвідношення компонентів енцефалітогенної суміші (співвідношенням ад'юванту до тканини мозку 1,6:1), що дозволило моделювати хронічний рецидивуючий перебіг ЕАЕ з клінічним перебігом середньої тяжкості [16]. Саме за такої форми ЕАЕ можливо більш детально вивчити вплив чинників на перебіг демієлінізуючого процесу та уникнути летальності експериментальних тварин, яка, за даними літератури, при гострому ЕАЕ становить до 30-60% [16]. Енцефалітогенну суміш вводили у подушечки кінцівок щурів [15,16] з розрахунку 50 мг на кожну тварину.

Розподіл на експериментальні групи представлений у **табл. 1**. В попередніх дослідженнях встановлено, що максимальні клінічні прояви у тварин при ЕАЕ [17] спостерігали на 16-18-ту добу після індукції ЕАЕ, тому ми виділили групу тварин, яким на 10-ту добу внутрішньовенно вводили ІЛ-10 (1 мкг рекомбінантного білка ІЛ-10 у фосфатному буфері загальним об'ємом 100 мкл) з метою вивчення протизапального впливу. На піку клінічних проявів на 17-ту добу після індукції ЕАЕ

Таблиця 1. Розподіл тварин в експерименті

Група	Кількість тварин	Лікування
1	8	Група порівняння, ЕАЕ без лікування
2	8	Введення МСК (1 $\times 10^6$ в 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду) субоципітально на 17-ту добу
3	8	Введення ІЛ-10 (1 мкг/мл) внутрішньовенно на 10-ту добу, ІЛ-10 (0,1 мкг в 0,1 мл) субоципітально на 17-ту добу
4	7	Введення ІЛ-10 (1 мкг/мл) внутрішньовенно на 10-ту добу, (1 мкг ІЛ-10 + 1 млн МСК в 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду) субоципітально на 17-ту добу
5	10	Введення МСКТ (1 $\times 10^6$ в 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду) субоципітально на 17-ту добу
6	12	Інтактні щури

тваринам субоципітально вводили МСК або МСКТ (1 млн МСК або МСКТ у 100 мкл ізотонічного розчину натрію хлориду), з метою оцінити протизапальний вплив і здатність МСК та МСКТ попереджати процеси демієлінізації і пришвидшувати ремієлінізацію ЦНС на морфологічному рівні.

При одночасному введенні ІЛ-10 додавали у концентрації 1 мкг/мл до 1×10^6 МСК безпосередньо перед їх введенням субоципітально, при цьому об'єм суміші залишався незмінним – 100 мкл.

ІЛ-10 і МСК чи МСКТ з Вартонових драглів пуповини людини надані Інститутом генетичної та регенеративної медицини та Інститутом молекулярної біології та генетики, співробітники якого вивчали життєздатність, фенотипові характеристики та проліферативну активність цих клітин [8].

Орієнтовно-дослідницьку поведінку та емоційний стан тварин вивчали за тестом «відкрите поле» [18,19]. Експериментальна установка «відкрите поле» – це велика квадратна камера (90x90 см) з чорними, непрозорими пластиковими стінками висотою 49 см, підлога зроблена з чорного, непрозорого пластика та розкреслена на 36 квадратів розмірами 15x15 см, з яких виділяли периферійні, прилеглі до стінок установки (20), та центральні (16), і має 16 отворів (діаметром 1 см) (імітація «нірок»). Для освітлення пристрою використовували денне світло. Щура розміщали в центр «відкритого поля» і протягом 10 хв досліджували горизонтальну локомоторну активність (перетин центральних і периферійних квадратів), вертикальну локомоторну активність (вертикальні стійки), дослідницьку активність («заглядання в нірки») та емоційну активність (грумінг та дефекація за кількістю фекальних болюсів). Для кожного показника за допомогою програмно-комп'ютерного комплексу з вивчення поведінкових реакцій тварин у «відкритому полі» реєстрували: латентний період реакції (**LP**), кількість епізодів за перші 5 хв (**n1**), кількість епізодів за другі 5 хв (**n2**), загальну кількість епізодів за 10 хв спостереження (**ns**), тривалість епізодів за перші 5 хв (**T1**), тривалість епізодів за другі 5 хв (**T2**), загальну тривалість епізодів (**Ts**), середню тривалість окремого епізоду за перші 5 хв (**t1**), середню тривалість окремого епізоду за другі 5 хв (**t2**) та середню тривалість окремого епізоду за 10 хв спостереження (**ts**).

Перед кожним новим тестуванням підлогу установки ретельно протирали 96% розчином спирту, щоб усунути залишкові нюхові орієнтири. Дослідження проводили в звукоізолюваному приміщенні у весняно-літній період (з постійними температурою і освітленням).

Дослідження за тестом «відкрите поле» поведінкових реакцій щурів груп 1-5 проводили тричі, групи 6 – один раз. Перше тестування проводили: у щурів груп 1-5 – на 12-ту добу після індукції ЕАЕ; друге тестування: у тварин груп 1 і 2 – на 15-ту добу після індукції ЕАЕ, у щурів груп 3 і 4 – на 15-ту добу після індукції ЕАЕ (7-му добу після внутрішньовенного введення ІЛ-10); третє тестування: у щурів групи 1 – на 24-ту добу після індукції ЕАЕ, групи 2 – на 24-ту добу після індукції ЕАЕ (7-му добу після субоципітального введення МСК), групи 3 – на 24-ту добу після індукції ЕАЕ (15-ту добу після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-ту добу після субоципітального введення

ІЛ-10), групи 4 – на 24-ту добу після індукції ЕАЕ (15-ту добу після внутрішньовенного введення ІЛ-10 та 7-му добу після субоципітального введення ІЛ-10 і МСК), групи 5 – на 24-ту добу після індукції ЕАЕ (7-му добу після субоципітального введення МСКТ).

Перше й друге тестування щурів у «відкритому полі» проводили для вивчення ступеня тяжкості індукованого ЕАЕ, третє тестування – на 7-му добу після субоципітального введення МСК (або МСКТ), ІЛ-10 та МСК в поєднанні з ІЛ-10 для вивчення впливу ІЛ-10, нативних та трансфікованих геном ІЛ-10 МСК з Вартонових драглів пуповини людини на поведінкові реакції тварин з індукованим ЕАЕ.

Статистична обробка отриманих даних проведена з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і Statistica-6.1. Статистичну значущість відмінностей оцінювали за непарним непараметричним U критерієм Манна-Уїтні. Різницю досліджуваних показників вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

При дослідженні у «відкритому полі» (перше тестування) у щурів на 12-ту добу після індукції ЕАЕ (група 1) порівняно з інтактними тваринами (група 6) виявлене статистично значуще зменшення горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів периферійних квадратів **n1** ($p=0,0015$), **n2** ($p=0,004$), **ns** ($p=0,0002$); вертикальної локомоторної активності – статистично значуще зменшення латентного періоду **LP** ($p=0,0001$) та тенденція до зменшення кількості вертикальних стійок **n2**, **ns**, їх тривалості **T2**, **Ts** та середньої тривалості **t1**, **t2**, **ts**: статистично значуще зменшення дослідницької активності – збільшення латентного періоду **LP** ($p=0,031$) та зменшення тривалості **Ts** ($p=0,047$) і середньої тривалості «заглядань у нірки» **ts** ($p=0,004$). Також спостерігали тенденцію до збільшення емоційної активності – незначне збільшення тривалості епізодів грумінгу **T1**, **T2**, **Ts** при зменшенні кількості епізодів грумінгу **n1**, **n2**, **ns** та збільшення кількості фекальних болюсів (**табл. 2**).

Друге тестування у «відкритому полі» проведене на 15-ту добу після індукції ЕАЕ і на 7-му добу після внутрішньовенного введення ІЛ-10 з метою оцінки змін поведінкових реакцій дослідних тварин під час перебігу захворювання та під впливом ІЛ-10. Статистично значущі відмінності показників поведінкових реакцій в групах тварин не виявлені.

При третьому тестуванні у «відкритому полі» поведінкових реакцій щурів груп 2 та 1 (**табл. 3**) спостерігали тенденцію до зменшення горизонтальної локомоторної активності при статистично значущому збільшенні латентного періоду – **LP** перетину центральних ($p=0,028$) та периферійних ($p=0,028$) квадратів статистично значуще підвищення емоційної активності – збільшення тривалості **T2** ($p=0,01$), **Ts** ($p=0,028$) та середньої тривалості епізодів грумінгу **t2** ($p=0,005$). Також відзначено тенденцію до зменшення показників вертикальної локомоторної активності та збільшення – дослідницької активності.

При дослідженні у «відкритому полі» щурів групи 3 порівняно з групою 1 виявлене статистично

Таблиця 2. Показники поведінкових реакцій інтактних щурів і щурів з ЕАЕ на 12-ту добу експерименту

Активність	Величина показника в групах (M±m)			p
	Показник	6 (n=12)	1 (n=8)	
Горизонтальна активність (периферійні квадрати)	n1	67,75±5,4	39,88±4,19	0,0015
	n2	50,25±4,04	26,5±5,02	0,004
	ns	118±7,31	66,38±8,73	0,0002
Вертикальна активність	LP	44,74±10,13	10,39±1,98	0,0001
Дослідницька активність («нірки»)	LP	202,41±47,44	398,5±77,51	0,031
	Ts	9,09±1,67	3,75±1,64	0,047
	ts	2,8±0,3	1,09±0,42	0,004

Примітка. p – статистично значущі відмінності показників в експериментальних групах.

Таблиця 3. Показники поведінкових реакцій щурів з індукованим ЕАЕ за різних варіантів введення МСК та ІЛ-10

Активність	Показник	Величина показників в групах (M±m)			
		1 (n=8)	2 (n=8)	3 (n=7)	4 (n=4)
Горизонтальна активність (центральні квадрати)	Lp	1,16±0,07	6,32±3,12 p_{2,1}=0,028	2,21±0,57 p_{3,1}=0,002	2,19±0,69 p_{4,1}=0,028
Горизонтальна активність (периферійні квадрати)	Lp	9,59±6,05	11,58±4,13 p_{2,1}=0,028	129,06±80,36	10,45±3,63
Вертикальна активність	t2	3,4±0,31	3,2±0,27	5,91±1,17, p_{3,1}=0,029	3,19±0,3
	ts	2,84±0,22	3,02±0,21	4,74±0,72 p_{3,1}=0,029	2,91±0,36
Емоційна активність (грумінг)	T2	32,63±11,52	88,44±14,34 p_{2,1}=0,01	30,85±9,33	47,51±20,3
	Ts	72,62±9,98	128,51±16,6 p_{2,1}=0,028	82,78±8,68	80,91±27,34
	t2	7,66±2,46	16,58±3,23 p_{2,1}=0,005	9,1±2,74	9,4±2,6

Примітка. p_{2,1} – статистично значущі відмінності між групами 2 і 1, p_{3,1} – між групами 3 і 1, p_{4,1} – 4 і 1.

значуще збільшення латентного періоду – **LP** перетину центральних квадратів (p=0,002), тенденцію до зменшення кількості перетинів центральних і периферійних квадратів (горизонтальна локомоторна активність) та статистично значуще збільшення вертикальної локомоторної активності (збільшення середньої тривалості вертикальних стійок **t2** (p=0,029), **ts** (p=0,029)). Також спостерігали зменшення показників дослідницької активності та зміни показників емоційної активності (тенденція до збільшення за перші 5 хвилин та зменшення за другі 5 хв дослідження).

При тестуванні у «відкритому полі» щурів групи 4 порівняно з групою 1 відзначали зміни показників горизонтальної локомоторної активності (статистично значуще збільшення латентного періоду **LP** перетину центральних квадратів (p=0,028) та тенденцію до збільшення кількості перетинів центральних і периферійних квадратів) та тенденцію до збільшення вертикальної локомоторної активності (за другі 5 хв дослідження) і дослідницької активності, а також зниження емоційної активності (грумінгу – за перші 5 хв дослідження та зменшення кількості фекальних болюсів).

У щурів групи 5 при тестуванні у «відкритому полі» порівняно з щурами групи 1 (**табл.4**) виявлене статистично значуще зменшення показників вертикальної локомоторної активності **n1** (p=0,043)

та підвищення емоційної активності **Ts** (p=0,034) та **ts** (p=0,012). Також спостерігали тенденцію до зміни показників горизонтальної локомоторної активності: зменшення кількості перетинів центральних квадратів та збільшення – периферійних квадратів, а також зменшення показників дослідницької активності за перші 5 хв та збільшення – за другі 5 хв дослідження.

При тестуванні у «відкритому полі» щурів групи 5 порівняно з групою 2 спостерігали статистично значуще збільшення показників горизонтальної локомоторної активності (при зменшеному латентному періоді **LP** (p<0,05) збільшувалась кількість перетинів периферійних квадратів **n2** (p=0,021)), статистично значуще зменшення дослідницької активності (при збільшеному латентному періоді **LP** (p=0,027) зменшувалась «кількість заглядань у нірки» **n1** (p<0,05), тривалість та середня тривалість епізодів **T1** (p=0,034), **t1** (p=0,034) та статистично значуще зниження емоційної активності (зменшення кількості епізодів грумінгу **n2** (p=0,034), **ns** (p=0,016) та зменшення тривалості епізодів грумінгу **T2** (p=0,034)). Також виявлено тенденцію до зниження показників вертикальної локомоторної активності.

У щурів групи 5 порівняно з тваринами групи 4 (**табл.4**) при тестуванні у «відкритому полі» виявлене статистично значуще збільшення показників емоційної активності (середньої тривалості епізодів грумінгу

Таблиця 4. Показники поведінкових реакцій щурів за індукованого ЕАЕ після введення МСКТ та інших груп

Активність	Показник	Величина показника в групах (M±m)			
		1 (n=8)	2 (n=8)	4 (n=4)	5 (n=10)
Горизонтальна активність (периферійні квадрати)	Lp	9,59±6,05	11,58±4,13	10,45±3,63	4,66±0,39 p_{5,2}<0,05
	n2	29,00±7,49	24,63±5,11	54,25±18,10	46,00±6,64 p_{5,2}=0,021
Вертикальна активність	n1	16,63±2,31	12,63±2,99	13,50±4,86	9,90±1,99 p_{5,1}=0,043
Дослідницька активність («нірки»)	Lp	479,81±65,74	317,20±58,90	432,99±129,60	517,08±58,48 p_{5,2}=0,027
	n1	0,25±0,16	1,00±0,38	0,50±0,50	0,10±0,10 p_{5,2}<0,05
	T1	0,41±0,30	1,57±0,70	1,19±1,19	0,06±0,06 p_{5,2}=0,034
	t1	0,41±0,30	0,91±0,32	0,60±0,60	0,06±0,06 p_{5,2}=0,034
Емоційна активність (грумінг)	n2	4,00±1,00	5,75±0,80	4,75±1,75	3,10±0,74 p_{5,2}=0,034
	ns	8,00±0,91	10,38±1,16	9,75±2,17	7,10±0,50 p_{5,2}=0,016
	T2	32,63±11,52	88,44±14,34	47,51±20,30	43,81±9,94 p_{5,2}=0,034
	Ts	72,62±9,98	128,51±16,60	80,91±27,34	100,48±6,28 p_{5,1}=0,034
	ts	9,20±1,08	14,11±3,24	7,50±1,42	15,16±1,87 p_{5,1}=0,012 p_{5,4}=0,014

Примітка. p_{5,1} – статистично значущі відмінності між групами 5 і 1, p_{5,2} – 5 і 2, p_{5,4} – 5 і 4.

гу **ts** (p=0,014)). Також спостерігали тенденцію до зменшення показників горизонтальної і вертикальної локомоторної активності та показників дослідницької активності.

Результати дослідження поведінкових реакцій щурів свідчили, що при індукованому ЕАЕ на 12-ту добу виникає статистично значуще зменшення орієнтовно-дослідницької діяльності (локомоторної та дослідницької активності) на тлі підвищення рівня емоційного напруження. Виявлені зміни поведінки щурів з ЕАЕ зумовлені суттєвими розладами діяльності головного мозку, найбільш вірогідно – дегенеративно-дистрофічними змінами ЦНС [17].

При вивченні впливу МСК, ІЛ-10 та МСК в поєднанні з ІЛ-10 на поведінкові реакції щурів з індукованим ЕАЕ у «відкритому полі» доведено, що ІЛ-10 справляє менш виражений вплив, ніж МСК та МСК і ІЛ-10.

Застосування МСКТ у щурів при індукованому ЕАЕ під час тестування у «відкритому полі» сприяло статистично значущому зменшенню вертикальної локомоторної активності та підвищенню емоційної активності, а також частково корегувало показники горизонтальної локомоторної активності, що наближались до показників у інтактних тварин. При порівнянні впливу МСКТ і МСК на поведінкові реакції щурів встановлено, що МСКТ статистично значуще зменшували емоційну і дослідницьку активність тварин та позитивно впливали на показники горизонтальної локомоторної активності, що статистично значуще збільшувалися, наближаючись до таких в інтактних щурів. Результати дослідження показали, що МСКТ справляли більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів, ніж МСК.

За комбінованого впливу (МСК та ІЛ-10) на поведінкові реакції щурів спостерігали нормалізацію показників вертикальної локомоторної активності та дослідницької і частково емоційної активності, що свідчило про більшу ефективність впливу МСК та ІЛ-10, ніж МСКТ.

Отже, результати дослідження свідчили про можливість корекції порушень поведінки щурів при індукованому ЕАЕ шляхом комбінованого застосування МСК та ІЛ-10, відзначали послаблення негативного впливу емоційного стану, що супроводжувалося збільшенням орієнтовно-дослідницької активності та нормалізацією поведінкових реакцій тварин.

Висновки

1. При індукованому ЕАЕ у щурів на 12-ту добу виявлене статистично значуще зниження орієнтовно-дослідницької (зменшення показників горизонтальної та вертикальної локомоторної активності), та емоційної активності.

2. Застосування МСК та МСК в поєднанні з ІЛ-10 справляло більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів при ЕАЕ, ніж внутрішньовенне і субоципітальне введення ІЛ-10.

3. Застосування МСКТ справляло більш виражений вплив на поведінкові реакції щурів з індукованим ЕАЕ, ніж МСК.

4. Комбіноване застосування МСК та ІЛ-10 сприяло корекції порушень орієнтовно-дослідницької активності та емоційної сфери щурів з ЕАЕ і більш ефективно, ніж використання МСКТ.

References

1. Qi K, Li N, Zhang Z, Melino G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol.* 2017 Dec 2. pii: S0008-8749(17)30219-8. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.11.010. PubMed PMID: 29221689.
2. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion.* 2014;54:1418-1437. doi:10.1111/trf.12421.
3. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FM, Lacerda SM, Lalwani P, Santos AK, Gomes KN, Ulrich H, Kihara AH, Resende RR. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A.* 2014 Jan;85(1):43-77. doi: 10.1002/cyto.a.22402. PubMed PMID:24700575.
4. Mareschi K, Rustichelli D, Calabrese R, Gunetti M, Sanavio F, Castiglia S, Risso A, Ferrero I, Tarella C, Fagioli F. Multipotent mesenchymal stromal stem cell expansion by plating whole bone marrow at a low cellular density: a more advantageous method for clinical use. *Stem Cells Int.* 2012;2012:920581. doi: 10.1155/2012/920581. PubMed PMID: 23715383; PubMed Central PMCID: PMC3195433.
5. Isakova IA, Baker K, DuTrel M, Dufour J, Gaupp D, Phinney DG. Age- and dose-related effects on MSC engraftment levels and anatomical distribution in the central nervous systems of nonhuman primates: identification of novel MSC subpopulations that respond to guidance cues in brainStem cells. *Stem Cells.* 2007 Dec;25(12):3261-70. doi: 10.1634/stemcells.2007-0543. PubMed PMID: 17932418.
6. Phinney DG, Baddoo M, Dutreil M, Gaupp D, Lai WT, Isakova IA. Murine mesenchymal stem cells transplanted to the central nervous system of neonatal versus adult mice exhibit distinct engraftment kinetics and express receptors that guide neuronal cell migration. *Stem Cells and Development.* 2006 Jun;15(3):437-447. doi: 10.1089/scd.2006.15.437. PubMed PMID: 16846379.
7. Gordon D, Pavlovskaya G, Uney JB, Wraith DC, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cells infiltrate the spinal cord, reduce demyelination, and localize to white matter lesions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010 Nov;69(11):1087-95. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181f97392. PubMed PMID: 20940628.
8. Tsybaliuk V, Deriabina E, Shuvalova N, Maslova O, Pokholenko I, Toporova O, Shpileva S, Kirik V, Pichkur L, Kasianenko I, Pichkur O, Kordium V. Phenotypical changes and proliferative potential of mesenchymal stem cells from humans Wharton's jelly in the cultivation conditions. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 2015;(2):17-24. Ukrainian. doi: 10.25305/unj.45290.
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 Oct 4;46(7):1339-1350. doi: 10.1016/j.jacc.2005.05.079. PubMed PMID: 16198853.
10. Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997 Dec;79(6):469-483. doi: 10.1016/S1081-1206(10)63052-9. PubMed PMID: 9433360.
11. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T-cells. *Int Immunol.* 2004 Feb;16(2):249-256. PubMed PMID: 14734610.
12. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med.* 1998 Feb 16;187(4):537-46. doi: 10.1084/jem.187.4.537. PubMed PMID: 9463404; PubMed Central PMCID: PMC2212155.
13. 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>.
14. [Law of Ukraine No 3447-IV On the Protection of Animals from Cruelty] [Internet]. Verkhovna Rada of Ukraine. 2017 [cited 24 May 2017]. Ukrainian. Available from: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
15. Davydova GS. [Questions of directed simulation of allergic encephalomyelitis. In: Davydova GS. Demyelinating diseases of the nervous system in experimental and clinical]. Minsk: Nauka i tehnika; 1975. P. 24-33. Russian.
16. Tsybaliuk VI, Kasyanenko YA. Features of the modeling and flow of experimental allergic encephalomyelitis. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 2005;(1):12-14. Ukrainian. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Unkhj_2005_1_10.
17. Pichkur LD, Semenova VM, Verbovska SA, Oleksenko NP, Akinola ST The features of experimental allergic encephalomyelitis after stem cells transplantation. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 2017;(2):27-33. Ukrainian. doi: 10.25305/unj.104500.
18. Velychko OM, Bilous OI, Morozov AM, Hrydina NY, Biloshytskyi VV, inventors; Romodanov Institute of Neurosurgery of the NAMS of Ukraine, assignee. Appliance for study of behavioral reactions of rats. Ukraine Patent 105155. 2016 March 10. Available from: <http://base.ukrpatent.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=221068>.
19. Velychko OM, Bilous OI, Morozov AM, Hrydina NY, Biloshytskyi VV, inventors; Romodanov Institute of Neurosurgery of the NAMS of Ukraine, assignee. Method of study of behavioral responses of rats to install «Open Field». Ukraine Patent 104642. 2016 February 10. Available from: <http://base.ukrpatent.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=220269>.