

DOI <https://doi.org/10.32782/2786-9067-2024-27-3>

УДК 632.938+616.832-004.2+612.821+615.451.16+615.832.98

ДИНАМІКА НЕВРОЛОГІЧНОГО ДЕФІЦИТУ У ЩУРІВ ЗІ ЗМОДЕЛЬОВАНИМ ЕКВІВАЛЕНТОМ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ ПІД ВПЛИВОМ КРІОЕКСТРАКТІВ ПЛАЦЕНТИ ТА СЕЛЕЗІНКИ, А ТАКОЖ КОНДИЦІОНОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Гладких Ф.В.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна МОН України,
Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С.П. Григор'єва НАМН
України», Харків, Україна

Анотація. *Актуальність.* Нейродегенерація при розсіяному склерозі (РС) зумовлена атакою аутореактивних лімфоцитів на мієлінову оболонку нервових волокон та ендогенною недостатністю ремієлінізації, що зрештою призводить до наростання неврологічної недостатності. Хронічний перебіг РС може призвести до значних психічних і фізичних симптомів та незворотних неврологічних розладів, включаючи м'язову слабкість, атаксію, тремор, спастичність, параліч, порушення рівноваги, когнітивні порушення, втрату зору, запаморочення, порушення ковтання та мови, сенсорний дефіцит, дисфункцію сечового міхура та кишківника, біль, утому та депресію. Існуючі імунomodуючі препарати, незважаючи на те що вони дуже ефективні в зниженні частоти рецидивів РС, не запобігають прогресуючим нейродегенеративним процесам і не мають регенеративної дії, але можуть викликати значні побічні ефекти.

Мета. Охарактеризувати виразність неврологічного дефіциту за показниками м'язового тону та поведінкових реакцій на моделі розсіяного склерозу при алергічному енцефаломієліті (АЕМ) у щурів на тлі застосування кріоекстрактів плаценти (КЕП) та селезінки (КЕС), а також кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК).

Методи. Експериментальні дослідження проведено на 42 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200–220 г. АЕМ моделювали шляхом уведення щурам підшкірно в основу хвоста енцефалітогенної емульсії у дозі 1,0 мл/кг маси тіла. Емульсія складалася з повного ад'юванта Фрейнда та гомогенату аlogenного головного мозку у співвідношенні 1:1. Лікування АЕМ проводилося з 12-го по 20-й день експерименту. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили через день (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 12, 14, 16, 18 та 20 дні. Вивчення неврологічного дефіциту проводили шляхом оцінки м'язового тону та поведінкових реакцій тварин (а саме – емоційну активність) у динаміці, відповідно до моделювання АЕМ («0» день), на 12 та 21 дні експерименту.

Результати. У щурів зі змодельованим АЕМ на 12-й день експерименту відзначалося статистично вірогідне ($p=0,009$) зниження м'язового тону на 73,8% та статистично вірогідне ($p=0,02$) зниження емоційної активності на 70,4% відносно вихідних показників. Установлено, що на 21-й день експерименту на тлі введення КЕП м'язова сила щурів з АЕМ статистично вірогідно ($p<0,03$) зменшилася на 53,3%, а на тлі застосування КЕС аналогічний показник зменшився ($p<0,01$) на 61,3% відносно показників у відповідних групах на 12-й день експерименту, що відповідно у 1,8 та 2,1 поступалося за ефективністю референс-препарату метилпреднізолону. Дослідження показало, що введення КС-МСК призвело до зупинки втрати м'язової сили у щурів з АЕМ, оскільки вказаний показник на 21-й день експерименту практично співставлявся з аналогічним показником на 12-й день експерименту та становив відповідно $4,7\pm 0,5$ с та $4,6\pm 0,4$ с, що на 26,9% ($p=0,16$) перевищувало за здатністю уповільнювати втрату м'язової маси ефективність референс-препарат метилпреднізолон.

Висновки. За виразністю збереження м'язового тону у щурів з АЕМ на 21-й день відносно показників 14-го дня досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби доцільно розташувати у такій послідовності: КС-МСК (+3,1%; $p=0,37$) > КЕП (-53,3%; $p<0,03$) > КЕС (-61,3%; $p<0,01$). За величиною зростання емоційної активності у щурів з АЕМ на 21-й день експерименту відносно показників на 14-й день досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби доцільно розташувати у такій послідовності: КС-МСК (+288,9%; $p<0,01$) > КЕП (+162,5%; $p=0,09$) > КЕС (+150,0%; $p=0,09$).

Ключові слова: аутоімунні захворювання, розсіяний склероз, алергічний енцефаломієліт, неврологічний дефіцит, м'язовий тонус, емоційна активність, безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби, кондиціоноване середовище мезенхімальних стовбурових клітин.

Вступ. Розсіяний склероз (РС) – це аутоімунне демієлінізуюче та нейродегенеративне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), яке є головною причиною нетравматичної неврологічної інвалідизації молодих людей [15]. Нейродегенерація при РС зумовлена атакою аутореактивних лімфоцитів на мієлінову оболонку та ендогенною недостатністю ремієлінізації, що зрештою призводить до наростання неврологічної недостатності. Як відомо, РС характеризується двома патологічними ознаками: запаленням із демієлінізацією та астрогліальною проліферацією (гліозом) і нейродегенерацією. Пошкодження тканин при РС обмежується ЦНС, зберігаючи периферичну нервову систему. Клінічно РС може мати два варіанти перебігу: рецидивний або прогресуючий. Найчастіше діагностується рецидивуюча форма РС, яка проявляється як окремі епізоди неврологічної дисфункції з подальшою частковою чи повною ремісією або її відсутністю. Із часом частота рецидивів зазвичай зменшується, але часто настає поступове погіршення, що призводить до безперервного прогресування (вторинний прогресуючий РС) [15].

Хронічний перебіг РС може призвести до значних психічних та фізичних симптомів і незворотних неврологічних розладів, включаючи м'язову слабкість, атаксію, тремор, спастичність, параліч, порушення рівноваги, когнітивні порушення, втрату зору, двоїння в очах, запаморочення, порушення ковтання та мови, сенсорний дефіцит, дисфункцію сечового міхура та кишківника, біль, утому та депресію [3; 4]. Моторні дисфункції у пацієнтів із РС часто виникають через м'язову слабкість, аномальну механіку ходьби, проблеми з рівновагою, спастичність і втому. Повідомляється, що майже 50% хворих на розсіяний склероз використовують допоміжний пристрій для пересування через 15 років від початку захворювання [9; 14].

Окрім м'язово-рухової недостатності, зростаюча кількість доказів виникнення нейропсихіатричних симптомів при РС надала нові цінні відомості про патофізіологію захворювання [1; 17]. Незважаючи на те що структура когнітивного дефіциту дуже різноманітна серед пацієнтів із РС, швидкість обробки інформації, увага, навчання та пам'ять є найбільш часто задіяними сферами, тоді як дефіцит виконавчих функцій і візуально-просторової обробки виявляють рідше [1]. Когнітивні порушення описані у 30–45% пацієнтів із рецидивно-ремітуючим РС та у 50–75% пацієнтів із вторинно прогресуючим РС [16].

За даними *Margoni M. та співав.* [17], структурні та функціональні аномалії головного мозку, особливо за участю лобно-скроневої та лімбічної кори, пов'язані з наявністю та прогресуванням депресії у пацієнтів із РС. Примітно, що аномалії структур ЦНС, залучених до модуляції настрою (мигдалеподібне тіло та вентролатеральна префронтальна кора), спостерігалися у пацієнтів із РС навіть за відсутності депресії. Це може пояснити, принаймні частково, високу частку пацієнтів із РС із симптомами депресії, оскільки відключення ключового шляху регуляції настрою може поставити під загрозу емоційну адаптивність людини [17].

Існуючі імуномодулюючі препарати, незважаючи на те що вони дуже ефективні в зниженні частоти рецидивів РС, не запобігають прогресуючим нейродегенеративним процесам і не мають регенеративного ефекту, але можуть викликати значні побічні ефекти. Підхід до замісної терапії стовбуровими клітинами, спрямований на подолання втрати клітин ЦНС і недостатності ремієлінізації, вважається перспективним альтернативним лікуванням [10].

Терапія з використанням мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), за даними літератури [12], виявилася багатообіцяючою при різних нейродегенеративних станах завдяки їхнім корисним властивостям, включаючи імуномодулюючу активність. Результати низки досліджень показали безпеку та доцільність застосування МСК при РС.

Нашу увагу як нова стратегія біологічної терапії РС привернуло застосування похідних МСК, які не містять клітин (секретом, екзосоми, кондиціоновані середовища та ін.), а також кріоекстракти біологічних тканин [3; 4].

Мета дослідження – охарактеризувати виразність неврологічного дефіциту за показниками м'язового тону та поведінкових реакцій на моделі розсіяного склерозу при алергічному енце-

фаломієліті (АЕМ) у щурів на тлі застосування кріоекстрактів плаценти (КЕП) та селезінки (КЕС), а також кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК).

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження проведено на 42 нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 200–220 г відповідно до основних біоетичних норм «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», схвалених Першим національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р., м. Київ). Піддослідних тварин було розділено на шість груп:

I (негативний контроль) – інтактні щури ($n=7$), яким на 12, 14, 16, 18 та 20 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг маси тіла щура;

II – щури зі змодельованим АЕМ ($n=7$) без лікування (контрольна група), яким на 12, 14, 16, 18 та 20 дні експерименту в/м вводили 0,9% розчин NaCl в дозі 1,0 мл/кг;

III – щури зі змодельованим АЕМ ($n=7$), яким на 12, 14, 16, 18 та 20 дні експерименту в/м вводили референс-препарат МП в дозі 3,4 мг/кг [19];

IV – щури зі змодельованим АЕМ ($n=7$), яким на 12, 14, 16, 18 та 20 дні експерименту в/м вводили КЕП у дозі 2,5 мл/кг [8];

V – щури зі змодельованим АЕМ ($n=7$), яким на 12, 14, 16, 18 та 20 дні експерименту в/м вводили КЕС у дозі 5,0 мл/кг [1];

VI – щури зі змодельованим АЕМ ($n=7$), яким на 12, 14, 16, 18 та 20 дні експерименту в/м вводили КС-МСК у дозі 0,6 мл/кг [5; 11].

АЕМ моделювали шляхом введення щурам підшкірно в основу хвоста енцефалітогенної емульсії у дозі 1,0 мл/кг маси тіла. Емульсія складалася з повного ад'юванта Фрейнда – ПАФ (*Thermo Fisher Scientific, США*) та гомогенат алогенного головного мозку у співвідношенні 1:1 [7].

Енцефалітогенну емульсію для щурів готували за методикою **Нефьодова О.О. та співав.** (2017 р.) [7]. Алогенний головний мозок механічно диспергували при кімнатній температурі у гомогенізаторі впродовж 3 хв у холодному буферному розчині (0,175 М KCl + 0,125 трис-НСl, рН=7,4) з розрахунку 33,5 мг тканини мозку + 0,05 мл буфера/100 г маси тіла щура

Лікування АЕМ проводилося з 12-го по 20-й день експерименту. КЕП, КЕС та КС-МСК вводили через день в/м (усього 5 ін'єкцій), відповідно на 12, 14, 16, 18 та 20 дні. Як референс-препарат використано глюкокортикоїд із мінімальним мінералокортикоїдним ефектом – метилпреднізолон (МП), який вводили внутрішньовенно (в/в) в дозі 3,4 мг/кг.

Вивчення неврологічного дефіциту на моделі АЕМ у щурів проводили шляхом оцінки м'язового тону та поведінкових реакцій тварин (а саме – емоційну активність) у динаміці, відповідно до моделювання АЕМ («0» день), на 12-й та 21-й дні експерименту.

Оцінку м'язового тону щурів проводили шляхом підвішування їх передніми лапами на дріт, натягнутий на висоті 25 см від поверхні стола, та фіксували час утримування у секундах. Інтактні щури швидко підтягуються та утримуються чотирма лапами, що характерно для тварин із нормальним м'язовим тоном. Зменшення часу утримування тварин свідчило про порушення м'язового тону та розвиток у них неврологічного дефіциту [2].

Поведінкові реакції тварин (емоційну активність) досліджували у тесті «відкрите поле». Устаткування тесту «відкрите поле» для щурів являє собою освітлену білу квадратну платформу на ніжках розміром 80 × 80 см, обмежену вертикальними стінками висотою 40 см. Підлога платформи розкреслена на 16 однакових квадратів розміром 20 × 20 см з отворами («нірками») діаметром 3,5 см у центрі кожного квадрата. Для дослідження поведінкових реакцій щурів по черзі поміщали у центр квадратної платформи та впродовж 3 хв реєстрували сумарну кількість епізодів короткочасного грумінгу (умивань), кількість фекальних болюсів та актив уринації [6].

Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями Microsoft Office Excel 2010. Оцінку характеру розподілу величин у кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W-критерію

Шапіро – Вілка (*Shapiro – Wilk test*). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (*Levene's test*). Для оцінки значущості виявлених відмінностей досліджуваних показників за різних умов експерименту проводили статистичний аналіз із використанням параметричних критеріїв. За нормального розподілу незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за *t*-критерієм Стьюдента. Співставлення показників однієї групи під час повторюваних вимірювань за різних умов експерименту проводили за непараметричним *T*-критерієм Вілкоксона (*Wilcoxon T test*). Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді $M \pm m$ ($M \pm SE$), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ: 5% – 95%), де 95% ДІ: – 95% довірчий інтервал [18].

Результати дослідження. Оцінка розвитку неврологічного дефіциту у щурів зі змодельованим АЕМ у динаміці показала, що на 12-й день експерименту у тварин контрольної групи (АЕМ без лікування) відзначалося статистично вірогідне ($p=0,009$) зниження м'язового тону на 73,8% (табл. 1) та статистично вірогідне ($p=0,02$) зниження емоційної активності – на 70,4% (табл. 2) відносно вихідних показників. Установлені зміни узгоджувалися з даними літературних джерел [7; 17].

На 21-й день експерименту у щурів з АЕМ без лікування відзначено частковий регрес показників емоційної активності на тлі подальшого зниження м'язового тону. Так, емоційна активність у щурів контрольної групи статистично вірогідно ($p=0,01$) зросла у 2,5 рази відносно показників на 12-й день експерименту, тоді як м'язовий тонус зменшився у 4,3 рази ($p<0,01$) відносно показників на 12-й день (табл. 1).

Досліджувані кріоекстракти значно поступалися за здатністю впливати на збереження м'язової сили у щурів на тлі АЕМ референс-препарату МП. Дослідження показало, що на 21-й день експерименту на тлі введення КЕП м'язова сила щурів з АЕМ статистично вірогідно ($p<0,03$) зменшилася на 53,3%, а на тлі застосування КЕС аналогічний показник зменшився ($p<0,01$) на 61,3% відносно показників у відповідних групах на 12-й день експерименту, що відповідно у 1,8 та 2,1 поступалося за ефективністю референс-препарату МП (табл. 1).

Дискусія. Отримані результати щодо зменшення м'язової сили у щурів з АЕМ узгоджуються з даними *Haan A. та співав.* [13], які експериментально встановили, що через 2,5 дні після розвитку максимальних клінічних ознак АЕМ маса медіального литкового м'язу щурів була нижчою на 33% ($p<0,05$) порівняно з показниками інтактних тварин. Площа поперечного перерізу волокон литкового м'язу була меншою на 40–50% у всіх типах волокон, а максимальна сила і потужність були значно нижчими відповідно на 58% та 73% у щурів з АЕМ [13].

Застосування референс-препарату МП призвело до меншого у 2,5 рази (відповідно 29,7% проти 75,8%) зменшення м'язової сили на 21-й день відносно показників на 12-й день експерименту (табл. 1), що, ймовірно, вказує на уповільнення прогресування АЕМ.

Особливу увагу привертають результати дослідження м'язової сили у щурів з АЕМ, яким вводили КС-МСК. Дослідження показало, що введення досліджуваного безклітинного похідного від МСК привело до зупинки втрати м'язової сили у щурів з АЕМ, оскільки вказаний показник на 21-й день експерименту практично співставлявся з аналогічним показником на 12-й день експерименту та становив відповідно $4,7 \pm 0,5$ с та $4,6 \pm 0,4$ с, що на 26,9% ($p=0,16$) перевищувало за здатністю уповільнювати втрату м'язової маси ефективність референс-препарату МП (табл. 1).

Оцінка емоційної активності показала, що на тлі застосування МП відзначалося співставне з показниками щурів контрольної групи зростання зазначеного виду активності, що становило відповідно 137,5% та 140,0% (табл. 2). Серед досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів найвиразніше зростання емоційної активності на 21-й день експерименту у щурів АЕМ відносно показників на 14-й день відзначено на тлі застосування КМ-МСК (288,9%; $p<0,01$), а найменше – на тлі застосування КЕС (150,0%; $p=0,09$).

Таблиця 1
Вплив КЕП, КЕС, КС-МСК та МП на м'язовий тонус у щурів з АЕМ, сек.
($M \pm m$ (95 % ДІ), $n=42$)

| Сторок | I (1) група | II (2) група | III (3) група | IV (4) група | V (5) група | VI (6) група | Рівень статистичної вірогідності [%] | | | | | | | | | | | |
|----------|--|---|---|---|---|---|--------------------------------------|----------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|--|--|--|
| | | | | | | | Р ₂₋₁ | Р ₃₋₂ | Р ₄₋₂ | Р ₅₋₂ | Р ₆₋₂ | Р ₄₋₃ | Р ₅₋₃ | Р ₆₋₃ | | | | |
| «0» день | Інтактні щури | Контроль (АЕМ без лікування) | АЕМ + МП | АЕМ + КЕП | АЕМ + КЕС | АЕМ + КС-МСК | | | | | | | | | | | | |
| | 18,9±0,3 (95 % ДІ: 18,2–19,5) | 18,0±0,6 (95 % ДІ: 16,8–19,2) | 20,6±0,6 (95 % ДІ: 19,4–21,8) | 18,1±0,6 (95 % ДІ: 17,0–19,3) | 18,1±0,7 (95 % ДІ: 16,7–19,6) | 18,4±0,8 (95 % ДІ: 16,8–20,1) | 0,2 [4,5%] | < 0,05 [14,3%] | 0,9 [0,8%] | 0,9 [0,8%] | 0,7 [2,4%] | < 0,01 [11,8%] | < 0,01 [13,8%] | < 0,01 [10,4%] | | | | |
| 12 день | 18,9±0,3 (95 % ДІ: 18,3–19,4) P ₁₀ = 0,5 [10%] ^{1,10} | 4,7±0,3 (95 % ДІ: 4,2–5,3) P ₁₀ = 0,009 [73,8%] ^{1,10} | 5,3±0,3 (95 % ДІ: 4,7–5,8) P ₁₀ = 0,009 [74,3%] ^{1,10} | 4,3±0,6 (95 % ДІ: 3,2–5,4) P ₁₀ = 0,009 [76,4%] ^{1,10} | 4,4±0,4 (95 % ДІ: 3,6–5,3) P ₁₀ = 0,009 [75,6%] ^{1,10} | 4,6±0,4 (95 % ДІ: 3,8–5,3) P ₁₀ = 0,009 [75,2%] ^{1,10} | < 0,001 [75,0%] ^{1,10} | 0,2 [12,1%] | 0,5 [9,1%] | 0,6 [6,1%] | 0,8 [3,0%] | 0,1 [18,9%] | 0,1 [16,2%] | 0,1 [13,5%] | | | | |
| | 18,4±0,6 (95 % ДІ: 17,2–19,7) P ₁₀ = 0,29 [2,3%] ^{1,10} | 1,1±0,3 (95 % ДІ: 0,5–1,8) P ₁₀ < 0,01 [93,7%] ^{1,10} | 3,7±0,4 (95 % ДІ: 2,9–4,5) P ₁₀ = 0,01 [81,9%] ^{1,10} | 2,0±0,4 (95 % ДІ: 1,1–2,9) P ₁₀ = 0,01 [89,0%] ^{1,10} | 1,7±0,5 (95 % ДІ: 0,7–2,7) P ₁₀ = 0,01 [90,6%] ^{1,10} | 4,7±0,5 (95 % ДІ: 3,7–5,7) P ₁₀ = 0,37 [74,4%] ^{1,10} | < 0,001 [93,8%] ^{1,10} | < 0,001 [22,5,0%] | < 0,001 [75,0%] | 0,37 [50,0%] | < 0,001 [312,5%] | 0,015 [46,2%] | 0,011 [53,8%] | 0,16 [26,9%] | | | | |

Примітки.

1. P₂₋₁ – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
2. [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
3. індексами ^{1, 2, 3, 4, 5, 6} вказано номер групи, між показниками яких проведено зрівняння;
4. індексами ^{10, 112} вказано строки дослідження, з показниками яких проведено зрівняння в динаміці

Таблиця 2
Вплив КС-МСК, КЕС та МП на емоційну активність шурів з АЕМ у тесті «відкрите поле», абс. ($M \pm m$ (95 % ДІ, $n=42$))

| Строк | I (1) група | II (2) група | III (3) група | IV (4) група | V (5) група | VI (6) група | Рівень статистичної вірогідності [%] | | | | | | | |
|----------|--|---|--|--|---|---|--------------------------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| | Інтактні шури | Контроль (АЕМ без лікування) | АЕМ + МП | АЕМ + КЕП | АЕМ + КЕС | АЕМ + КС-МСК | P_{2-1} | P_{3-2} | P_{4-2} | P_{5-2} | P_{6-2} | P_{4-3} | P_{5-3} | P_{6-3} |
| «0» день | 4,1±0,9 (95 % ДІ: 2,4-5,9) | 3,9±0,9 (95 % ДІ: 2,1-5,6) | 5,1±0,7 (95 % ДІ: 3,8-6,5) | 3,3±0,6 (95 % ДІ: 2,2-4,4) | 4,0±0,5 (95 % ДІ: 3,0-5,0) | 3,7±0,9 (95 % ДІ: 1,9-5,5) | 0,8 [6,9%] | 0,3 [33,3%] | 0,6 [14,8%] | 0,9 [3,7%] | 0,9 [3,7%] | 0,1 [36,1%] | 0,2 [21,5%] | 0,2 [27,8%] |
| 12 день | 2,9±0,5 (95 % ДІ: 1,9-3,9) $P_{n0} = 0,014$ [31,7%] ⁿ⁰ | 1,1±0,4 (95 % ДІ: 0,4-1,9) $P_{n0} = 0,021$ [70,4%] ⁿ⁰ | 2,1±0,4 (95 % ДІ: 1,4-2,9) $P_{n0} = 0,014$ [58,3%] ⁿ⁰ | 1,1±0,5 (95 % ДІ: 0,2-2,0) $P_{n0} = 0,017$ [65,2%] ⁿ⁰ | 0,9±0,3 (95 % ДІ: 0,2-1,5) $P_{n0} = 0,014$ [78,6%] ⁿ⁰ | 1,3±0,4 (95 % ДІ: 0,5-2,1) $P_{n0} = 0,030$ [65,4%] ⁿ⁰ | 0,02 [60,0%] | 0,1 [87,5%] | 1,0 [0%] | 0,6 [25,0%] | 0,8 [12,5%] | 0,1 [46,7%] | < 0,05 [60,0%] | 0,2 [40,0%] |
| 21 день | 4,1±0,8 (95 % ДІ: 2,6-5,7) $P_{n0} = 0,47$ [0%] ⁿ⁰ | 2,7±0,5 (95 % ДІ: 1,8-3,6) $P_{n14} = 0,15$ [29,6%] ⁿ¹⁴ | 5,1±0,6 (95 % ДІ: 4,0-6,3) $P_{n14} = 0,34$ [0%] ⁿ¹⁴ | 3,0±0,9 (95 % ДІ: 1,3-4,7) $P_{n14} = 0,29$ [8,7%] ⁿ¹⁴ | 2,1±0,7 (95 % ДІ: 0,8-3,5) $P_{n14} = 0,02$ [46,4%] ⁿ¹⁴ | 5,0±0,7 (95 % ДІ: 3,6-6,4) $P_{n14} < 0,01$ [34,6%] ⁿ¹⁴ | 0,15 [34,5%] | 0,008 [89,5%] | 0,15 [1,5%] | 0,5 [21,1%] | 0,018 [84,2%] | 0,06 [41,7%] | 0,006 [58,3%] | 0,88 [2,8%] |

Примітки.

1. P_{2-1} – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників;
2. [%] – значення розбіжностей показників у відсотках;
3. індексами _{1, 2, 3, 4, 5, 6} вказано номер групи, між показниками яких проведено зрівняння;
4. індексами _{n0, n12} вказано строки дослідження, з показниками яких проведено зрівняння в динаміці

Висновки.

1. У щурів зі змодельованим АЕМ на 12-й день експерименту відзначалося статистично вірогідне ($p=0,009$) зниження м'язового тону на 73,8% та статистично вірогідне ($p=0,02$) зниження емоційної активності на 70,4% відносно вихідних показників.

2. За виразністю збереження м'язового тону у щурів з АЕМ на 21-й день відносно показників 14-го дня досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби доцільно розташувати у такій послідовності: КС-МСК (+3,1%; $p=0,37$) > КЕП (-53,3%; $p<0,03$) > КЕС (-61,3%; $p<0,01$).

3. За величиною зростання емоційної активності у щурів з АЕМ на 21-й день експерименту відносно показників на 14-й день досліджувані безклітинні кріоконсервовані біологічні засоби доцільно розташувати у такій послідовності: КС-МСК (+288,9%; $p<0,01$) > КЕП (+162,5%; $p=0,09$) > КЕС (+150,0%; $p=0,09$).

Прикінцеві твердження

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна МОН України «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу, що викликаний бактеріями, вірусами, вірусно-бактеріальними асоціаціями при гострому, затяжному та хронічному перебігу хвороби та вдосконалення тактики лікування» (номер державної реєстрації 0123U105022, термін виконання – 2023–2028 рр., керівник – завідувач кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, канд. мед. н., доцент Волобуєва О.В.).

Перспективи подальших досліджень. Результати проведеної розвідки вказують на обґрунтованість подальших поглиблених досліджень нейропротективної активності досліджуваних безклітинних кріоконсервованих біологічних засобів при нейродегенеративних захворюваннях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беспалова І.Г. Пептидний склад та біологічна дія екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят : дис. ... к. біол. н. : 03.00.19. Харків, 2016. 162 с. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/>
2. Веселовська О.В., Шляхова А.В., Гармаш Т.І. Ефекти дистантної імплантації ембріональних тканин медичної п'явки у щурів з геморагічним інсультом. *Український неврологічний журнал*. 2015. № 2. С. 87–92. http://nbuv.gov.ua/UJRN/UNJ_2015_2_18
3. Гладких Ф.В. Мезенхімальні стовбурові клітини: екзосоми та кондиціоновані середовища як інноваційні стратегії у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. *Клінічна та профілактична медицина*. 2023. № 6(28). С. 121–30. DOI: <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>
4. Гладких Ф.В. Перспективи застосування імуномодуляторів у лікуванні хворих на аутоімунні захворювань: фокус на екстракти біологічних тканин (кріоекстракт плаценти та кріоекстракт селезінки). *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2023. № 4. С. 29–46. DOI: <https://doi.org/10.37321/immunology.2023.4-04>
5. Глоба В.Ю. Застосування кріоконсервованих культур клітин та нейротрофічних факторів при експериментальній інфравезикальній обструкції. дис. ... PhD : 222. Харків, 2021. 156 с. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/>
6. Дейко Р.Д. Експериментальне вивчення церебропротекторних та психотропних властивостей нових циклічних і лінійних олігопептидів : дис. ... к.фарм.н. : 14.03.05. 2017. 258 с. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0418U002231/>
7. Нефьодов О.О., Мамчур В.Й., Харченко В.Ю. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. № 4(114). С. 205–8. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2014_4%282%29_46
8. Шепітько В.І. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої печінки і вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів : дис. ... д.мед.н. : 14.01.35. Харків, 2004. 326 с. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/>

9. Benedict R.H.B., Amato M.P., DeLuca J., Geurts J.J.G. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical management, MRI, and therapeutic avenues. *The Lancet. Neurology*. 2020. 19 (10). P. 860–871. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30277-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30277-5)
10. Christodoulou M.V., Petkou E., Atzemoglou N., Gkorla E., Karamitrou A., Simos Y.V., Bellos S., Bekiari C., Kouklis P., Konitsiotis S., Vezyraki P., Peschos D., Tsamis K.I. Cell replacement therapy with stem cells in multiple sclerosis, a systematic review. *Human cell*. 2024. № 37 (1). P. 9–53. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13577-023-01006-1>
11. Golubinskaya P.A., Sarycheva M.V., Dolzhikov A.A., Bondarev V.P., Stefanova M.S., Soldatov V.O., Nadezhdin S.V., Korokin M.V., et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020. № 8 (6). P. 416–25. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
12. Gugliandolo, A., Bramanti, P., Mazzon, E. Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies. *International journal of molecular sciences*. 2020. № 21 (22). P. 8662. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228662>
13. Haan A., van der Vliet M.R., Hendriks J.J., Heijnen D.A., Dijkstra, C.D. Changes in characteristics of rat skeletal muscle after experimental allergic encephalomyelitis. *Muscle & nerve*. 2004. № 29 (3). P. 369–375. DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.10554>
14. Halabchi F., Alizadeh Z., Sahraian, M.A., Abolhasani M. Exercise prescription for patients with multiple sclerosis; potential benefits and practical recommendations. *BMC neurology*. 2017. № 17 (1). P. 185. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0960-9>
15. Hauser S.L., Cree, B.A.C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American journal of medicine*. 2020. № 133 (12). P. 1380–1390.e2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
16. Johnen A., Landmeyer N.C., Bürkner P.C., Wiendl H., Meuth S.G., Holling, H. Distinct cognitive impairments in different disease courses of multiple sclerosis – A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2017. № 83. P. 568–578. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.005>
17. Margoni M., Preziosa P., Rocca M.A., Filippi M. Depressive symptoms, anxiety and cognitive impairment: emerging evidence in multiple sclerosis. *Translational psychiatry*. 2023. № 13 (1). P. 264. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02555-7>
18. Yan F., Robert M., LiY. Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2017. № 9 (5). P. 157–63.

REFERENCES

1. Bepalova, I.H. (2016). Peptydnyi sklad ta biolohichna diia ekstraktiv kriokonservovanykh frahmentiv selezinky svynei ta shkiry porosiat [Peptide composition and biological action of extracts of cryopreserved pig spleen fragments and piglet skin: thesis.]: dys. k. biol. n.: spets. 03.00.19 – Kriobiolohiia, Kharkiv, 162 s. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U004539/> [in Ukrainian].
2. Veselovska, O.V., Shliakhova, A.V., & Harmash, T.I. (2015). Efekty dystantnoi implantatsii embrionalnykh tkanyn medychnoi piavky u shchuriv z hemorahichnym insultom [Effects of remote implantation of medical leech embryonic tissues in rats with hemorrhagic stroke.]. *Ukrainskyi nevrolohichnyi zhurnal*, 2, 87–92. http://nbuv.gov.ua/UJRN/UNJ_2015_2_18 [in Ukrainian].
3. Hladkykh, F.V. (2023). Mezenkhimalni stovburovi klityny: ekzosomy ta kondytsionovani seredovyschcha yak innovatsiini stratehii u likuvanni khvorykh na autoimunni zakhvoriuvannia [Mesenchymal stem cells: exosomes and conditioned media as innovative strategies in the treatment of patients with autoimmune diseases.]. *Klinichna ta profilaktychna medytsyna*. 2023;6(28):121–30. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15> [in Ukrainian].
4. Hladkykh, F.V. (2023). Perspektyvy zastosuvannia imunomodulatoriv u likuvanni khvorykh na autoimunnykh zakhvoriuvan: fokus na ekstrakty biolohichnykh tkanyn (kriоекстракт platsenty ta kriоекстракт selezinky) [Prospects for the use of immunomodulators in the treatment of patients with autoimmune diseases: focus on extracts of biological tissues (placenta cryoextract and spleen cryoextract)]. *Imunolohiia ta alerholohiia: nauka i praktyka*. 2023;4:29–46. <https://doi.org/10.37321/immunology.2023.4-04> [in Ukrainian].

5. Hloba, V.Yu. (2021). Zastosuvannia kriokonservovanykh kultur klityn ta neirotrofichnykh faktoriv pry eksperymentalnii infravezikalnii obstruktsii [Use of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction.]. dys. PhD: spets. 222 – Medytsyna, Kharkiv, 156 s. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0821U100913/> [in Ukrainian].
6. Deiko, R.D. (2017). Eksperymentalne vyvchennia tserebroprotektornykh ta psykhotropnykh vlastyvostei novykh tsyklichnykh i liniinykh olihopeptydiv [Experimental study of cerebroprotective and psychotropic properties of new cyclic and linear oligopeptides.]. dys.: k.farm.n.: spets. 14.03.05 – Farmakolohiia, 258 s. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0418U002231/> [in Ukrainian].
7. Nefodov, O.O., Mamchur, V.Y., & Kharchenko, V.Yu. (2014). Modeliuvannia ta otsinka perebihu eksperymentalnoho alerhichnoho entsefalomyelitu [Modeling and assessment of the course of experimental allergic encephalomyelitis.]. *Visnyk problem biologii i medytsyny*, 4 (114), 205–8. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbn_2014_4%282%29__46 [in Ukrainian].
8. Shepitko, V.I. (2004). Strukturno-funktsionalni pokaznyky kriokonservovanoi pechinky i vplyv yii transplantatsii na morfofunktsionalnyi stan riadu vnutrishnykh orhaniv [Structural and functional indicators of the cryopreserved liver and the effect of its transplantation on the morphofunctional state of a number of internal organs: dissertation.]: dys. d.med.n.: spets.. 14.01.35 – Kriomedytsyna, Kharkiv, 326 s. Rezhym dostupu: <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0504U000610/> [in Ukrainian].
9. Benedict, R.H.B., Amato, M.P., DeLuca, J., & Geurts, J.J.G. (2020). Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical management, MRI, and therapeutic avenues. *The Lancet. Neurology*, 19(10), 860–871. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30277-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30277-5)
10. Christodoulou, M.V., Petkou, E., Atzemoglou, N., Gkorla, E., Karamitrou, A., Simos, Y.V., Bellos, S., Bekiari, C., Kouklis, P., Konitsiotis, S., Vezyraki, P., Peschos, D., & Tsamis, K.I. (2024). Cell replacement therapy with stem cells in multiple sclerosis, a systematic review. *Human cell*, 37(1), 9–53. <https://doi.org/10.1007/s13577-023-01006-1>
11. Golubinskaya, P.A., Sarycheva, M.V., Dolzhikov, A.A., Bondarev, V.P., Stefanova, M.S., Soldatov, V.O., Nadezhdin, S.V., & Korokin, M.V. (2020). Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*, 8 (6), 416–25. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
12. Gugliandolo, A., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8662. <https://doi.org/10.3390/ijms21228662>
13. Haan, A., van der Vliet, M.R., Hendriks, J.J., Heijnen, D.A., & Dijkstra, C.D. (2004). Changes in characteristics of rat skeletal muscle after experimental allergic encephalomyelitis. *Muscle & nerve*, 29(3), 369–375. <https://doi.org/10.1002/mus.10554>
14. Halabchi, F., Alizadeh, Z., Sahraian, M.A., & Abolhasani, M. (2017). Exercise prescription for patients with multiple sclerosis; potential benefits and practical recommendations. *BMC neurology*, 17(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0960-9>
15. Hauser, S.L., & Cree, B.A.C. (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American journal of medicine*, 133(12), 1380–1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>
16. Johnen, A., Landmeyer, N.C., Bürkner, P.C., Wiendl, H., Meuth, S.G., & Holling, H. (2017). Distinct cognitive impairments in different disease courses of multiple sclerosis-A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 83, 568–578. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.005>
17. Margoni, M., Preziosa, P., Rocca, M.A., & Filippi, M. (2023). Depressive symptoms, anxiety and cognitive impairment: emerging evidence in multiple sclerosis. *Translational psychiatry*, 13(1), 264. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02555-7>
18. Yan, F., Robert, M., & Li, Y. (2017). Statistical methods and common problems in medical or biomedical science research. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 9 (5), 157–63.

DYNAMICS OF NEUROLOGICAL DEFICITS IN RATS WITH THE SIMULATED EQUIVALENT OF MULTIPLE SCLEROSIS UNDER THE INFLUENCE OF CRYOEXTRACTS OF THE PLACENTA AND SPLEEN, AS WELL AS THE CONDITIONED MEDIUM OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Hladkykh F.V.

Abstract . Background. Neurodegeneration in multiple sclerosis (MS) is caused by the attack of auto-reactive lymphocytes on the myelin sheath and the endogenous failure of remyelination, which ultimately leads to the accumulation of neurological disability. The chronic course of MS can lead to significant mental and physical symptoms and irreversible neurological disorders, including muscle weakness, ataxia, tremors, spasticity, paralysis, balance disorders, cognitive impairment, vision loss, diplopia, dizziness, swallowing and speech disorders, sensory deficits, bladder and bowel dysfunction, pain, fatigue, and depression. Existing immunomodulatory drugs, despite the fact that they are very effective in reducing the frequency of MS relapses, do not prevent progressive neurodegenerative processes and do not have a regenerative effect, but can cause significant side effects.

Objective: to characterize the expressiveness of the neurological deficit according to the indicators of muscle tone and behavioral reactions in the model of multiple sclerosis – in allergic encephalomyelitis (AEM) in rats against the background of the use of cryoextracts of the placenta (CEP) and spleen (CES), and conditioned medium of mesenchymal stem cells (MSC-CM).

Methods. Experimental studies were conducted on 42 non-linear laboratory male rats weighing 200–220 g. AEM was modeled by injecting encephalitogenic emulsion subcutaneously into the base of the tail at the dose of 1.0 ml/kg of body weight. The emulsion consisted of Freund's complete adjuvant and allogeneic brain homogenate in a 1:1 ratio. AEM treatment was carried out from the 12th to the 20th day of the experiment. CEP, CES and MSC-CM were administered every other day (a total of 5 injections), on days 12, 14, 16, 18 and 20, respectively. The study of neurological deficits in the model of AEM in rats was carried out by evaluating the muscle tone and behavioral reactions of animals (namely, emotional activity) in dynamics, according to the simulation of AEM ("0" day), on the 12th and 21st days of the experiment.

Results. A statistically significant ($p=0.009$) decrease in muscle tone by 73.8% and a statistically significant ($p=0.02$) decrease in emotional activity by 70.4% relative to baseline values were noted in rats with simulated AEM on the 12th day of the experiment. It was found that on the 21st day of the experiment, against the background of the introduction of CES, the muscle strength of rats with AEM decreased statistically significantly ($p<0.03$) by 53.3%, and against the background of the use of CES, the similar indicator decreased ($p<0.01$) by 61.3% relative to the indicators in the corresponding groups on the 12th day of the experiment, which was 1.8 and 2.1, respectively, inferior to the effectiveness of the reference drug methylprednisolone. The study showed that the introduction of MSC-CM led to an almost complete stop of the loss of muscle strength in rats with AEM, since the indicated indicator on the 21st day of the experiment was practically comparable to the similar indicator on the 12th day of the experiment and was 4.7 ± 0.5 s, respectively and 4.6 ± 0.4 s, which by 26.9% ($p=0.16$) exceeded the effectiveness of both the studied cryoextracts and the reference drug methylprednisolone in terms of their ability to slow down the loss of muscle mass.

Conclusions. According to the expressiveness of preservation of muscle tone in rats with AEM on day 21 relative to the indicator on day 14, it is advisable to place the investigated cell-free cryopreserved biological agents in the following sequence: MSC-CM (+3.1%; $p=0.37$) > CEP (-53.3%; $p<0.03$) > CES (-61.3%; $p<0.01$). According to the magnitude of the increase in emotional activity in rats with AEM on the 21st day of the experiment relative to the indicators on the 14th day, it is advisable to place the investigated cell-free cryopreserved biological agents in the following sequence: MSC-CM (+288.9%; $p<0.01$) > CEP (+162.5%; $p=0.09$) > CES (+150.0%; $p=0.09$).

Key words: autoimmune diseases, multiple sclerosis, allergic encephalomyelitis, neurological deficit, muscle tone, emotional activity, cell-free cryopreserved biological agents, conditioned medium of mesenchymal stem cells.

Гладких Федір Володимирович <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>

Надійшла до редакції / Received: 15.07.2024