

УДК 616-089.843: 616.831-009.11: 616-089.811

Цупиков О. М.^{1,2}, Кирик В. М.², Устименко А. М.², Яценко К. В.¹, Бутенко Г. М.², Скибо Г. Г.^{1,2}¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

e-mail: oleg_tsupikov@mail.ru

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ КЛІТКОВИНИ НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ТА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ МИШЕЙ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОЇ ЛЕЙКОМАЛЯЦІЇ

РЕЗЮМЕ

Актуальними є дослідження можливостей використання стовбурових клітин різного генезу у комплексному лікуванні та реабілітації пацієнтів з перинатальною патологією центральної нервової системи (ЦНС).

Метою роботи була оцінка ефектів трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової клітковини у мишей із експериментальною моделлю дитячого церебрального паралічу – перивентрикулярною лейкомаляцією (ПВЛ).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ: ПВЛ моделювали шляхом однічної коагуляції загальної сонної артерії на мишах лінії FVB шостої доби після народження з подальшим створенням гіпоксичних умов (6,0% O₂) протягом 35 хвилин та внутрішньочеревним введенням ендотоксину ліпополісахариду в дозі 1 мг/кг.

Для трансплантації використовували ММСК жирової клітковини 2-го пасажу, отримані від мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J. Сингенну трансплантацію суспензії GFP-позитивних ММСК семиденним тваринам з моделлю перинатального ушкодження головного мозку виконували стереотаксично в праву півкулю через 24 години після ПВЛ. Кортикостинальну функцію контрольних тварин та мишей з ПВЛ оцінювали за допомогою поведінкового тесту «диставання і виймання їжі».

РЕЗУЛЬТАТИ. Після моделювання ПВЛ прооперовані тварини відставали у розвитку, мали меншу вагу і зріст та розлади статокі-нетичного рефлексу у порівнянні із контрольними неоперованими мишами. Тварини з ПВЛ мали більш низькі показники успішних спроб діставання їжі: відсоток успішних спроб у контрольних тварин становив 58 ± 3%, а у тварин з ПВЛ – 23 ± 4%. У групі тварин з трансплантацією ММСК після моделювання ПВЛ спостерігалось відновлення кортикостинальної функції і кількість успішних спроб становила 43 ± 4%. Також виявлено гальмування розвитку мікро- та астрогліозу в мозолистому тілі та гіпокампі.

ВИСНОВКИ. Сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини сприяє відновленню поведінкових реакцій у тварин після ПВЛ та покращує цитоархітектоніку у вогнищі пошкодження головного мозку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: перивентрикулярна лейкомаляція; мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової клітковини; трансплантація клітин

Перинатальна патологія ЦНС є однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем сучасної неврології та педіатрії і становить 49,8% всіх неврологічних захворювань у дітей [1, 2]. За даними ВООЗ у світі щорічно народжується 4-5% дітей з вродженими вадами розвитку, серед яких 25-30% – із вадами розвитку ЦНС. Інвалідність дитячого населення внаслідок перинатального ураження ЦНС, яке призводить до порушення психофізіологічного розвитку дитини, продовжує зростати і коливається в інтервалі від 0,5 до 4 випадків на 1000 всього населення (або на 200-300 дитячого населення) [3].

Діти з перинатальною патологією ЦНС мають високий ризик розвитку фізичних, інтелектуальних та емоційних порушень. Групу синдромів, які виникли в результаті недорозвинення або пошкодження мозку в пренатальний, інтранатальний та ранній постнатальний періоди, об'єднує термін «дитячий церебральний параліч» (ДЦП). Існує безліч можливих причин ДЦП, основними з яких є гіпоксично-ішемічні ураження головного мозку, аутоімунні механізми в системі мати-плід, внутрішньоутробні інфекції, особливо вірусні та ін. Останнім часом істотну роль у патогенезі ДЦП надають нейроімунному конфлікту в системі мати-плід, що призводить до порушення розвитку як ЦНС, так і імункомпетентних систем плода [4-6].

Найбільший відновлюваний ефект слід очікувати від реабілітаційних заходів, які повинні бути проведені в перші місяці життя таких немовлят. Використання лікарських препаратів у терапії ЦНС, особливо на ранніх стадіях захворювання, здатне порушити складний взаємозв'язок компенсаторно-приспосувальних процесів у організмі дитини і нерідко призводить до виникнення ускладнень, що унеможлиблює подальше проведення медикаментозної терапії. Тому актуальним є пошук немедикаментозних методів корекції ушкоджених функцій ЦНС, які б дозволили підвищити ефективність терапії шляхом стимуляції природних механізмів відновлення, легко комбінувалися б з іншими, традиційно застосовуваними методиками й не спричиняли небажаних наслідків.

Зараз активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин різного генезу у лікуванні і реабілітації пацієнтів з перинатальною патологією ЦНС [7, 8]. Ця патологія є цікавою для досліджень з використанням стовбурових клітин з кількох причин. По-перше, клітинна терапія при перинатальній патології ЦНС може бути зроблена на ранніх стадіях розвитку, коли незрілий мозок є більш сприйнятливим середовищем для приживлення трансплантата. По-друге, оскільки при перинатальному пошкодженні ЦНС уражаються декілька типів клітин, то лікування стовбуровими клітинами має величезний потенціал.

Як діючий агент планується використання стовбурових клітин з різних джерел та різного ступеня диференціювання – від ембріональних і фетальних клітин до клітин дорослого організму [9, 10]. При цьому відкритим залишається питання не тільки про допоміжну роль клітин трансплантату в регенерації, але і про можливість трансдиференціювання інших, відмінних від нейральних стовбурових клітин, наприклад мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), в нейрони або нейроглію [11, 12]

ММСК мають тропність до зони пошкодження та можуть впливати на перебіг процесів аутозапалення і репарації в ній. Показано, що ММСК мають особливу властивість пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи за рахунок фізичних та/або хімічних взаємодій з клітинами імунної системи [13]. Вони забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, власне для самих себе. При цьому використання аутологічних ММСК дозволило б вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу [14].

Проте впровадження в клінічну практику методик трансплантації стовбурових клітин має базуватися на глибокому розумінні механізмів їх функціонування та достатньому експериментальному матеріалу. Вивчення зазначеного кола питань можливе в умовах експеримен-

тальної трансплантації із залученням адекватних моделей патології у лабораторних тварин. Перинатальне ушкодження головного мозку у мишей в експерименті дозволяє змодельовати перинатальну патологію ЦНС людини [15], а трансплантація клітин різного походження з різним потенціалом диференціювання має на меті вивчення їх регенеративного потенціалу та загальних закономірностей участі у відновних процесах після ішемічного ушкодження та запалення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasburg, 1986), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

У нашому дослідженні ми використовували мишей лінії FVB «дикого» типу та FVB-C-Tg (GFPU) 5Nagy/J, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком (GFP), які утримувались за стандартних умов та раціону харчування з вільним доступом до води на базі експериментальної клініки Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН. Миші лінії FVB «дикого» типу шостої доби після народження (P6) були випадковим чином розподілені в одну з трьох груп: 1) контрольна група – псевдооперовані тварини без перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) та без трансплантації ММСК; 2) тварини з ПВЛ без трансплантації ММСК, яким було стереотаксично введено лише середовище для культивування ММСК; 3) тварини з ПВЛ із трансплантацією ММСК.

МОДЕЛЮВАННЯ ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОЇ ЛЕЙКОМАЛЯЦІЇ У МИШЕЙ ЛІНІЇ FVB

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції здійснювалося шляхом односторонньої коагуляції загальної сонної артерії на мишах лінії FVB шостої доби після народження (P6), що відповідає перинатальному періоду людини. Під час коагуляції анестезували тварин ізофлураном. Ізофлуран забезпечує відмінну глибоку анестезію, стабільну частоту серцевих скорочень та швидке прокидання тварин після анестезії. Ізофлуран подавався в суміші кисню і азоту: 3,0% для індукції і 1,5% під час операції з використанням маски для носа. Тривалість анестезії була менше, ніж 5 хв. При такому інгаляційному наркозі з використанням ізофлурану летальність тварин становила 3%. Через годину після коагуляції тварин поміщали в герметичну камеру з 6,0% O₂ протягом 35 хвилин. Для створення гіпоксично-ішемічного ушкодження у поєднанні із запаленням, тваринам було введено внутрішньоочеревно 0,015 мл ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС, 1 мг/кг).

ОТРИМАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН З ЖИРОВОЇ КЛІТКОВИНИ GFP-ПОЗИТИВНИХ МИШЕЙ

Жирова клітковина мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP, була використана для отримання ММСК. Клітинна суспензія культивувалась у повному поживному середовищі DMEM-HG, яке містило 15% FBS, антибіотики пеніцилін 100 од/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, (Sigma, США), 1:100 non-essential amino acids (Sigma, США) в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5% CO₂ при температурі +37 °C. Для трансплантації використовували клітини 2-3 пасажів. Пасажування проводили при досягненні 80% конфлуентності моношару.

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРИ ММСК ЖИРОВОЇ КЛІТКОВИНИ

Фенотипічні характеристики культивованих ММСК визначали методом проточної цитометрії за допомогою цитофлюориметра-сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США) з використанням

моноклональних антитіл проти поверхневих антигенів CD44, CD73, CD90, CD34, CD45, CD117, кон'югованих з флуорохромами, в робочій концентрації 0,5 мкг/мл. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному аналізі використано контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstaining control), зразки з кожним з антитіл окремо (single staining control) і зразки з комбінацією кількох антитіл без одного (fluorescence minus one – FMO control). Як ізотип-контроль використано Ig аналогічного ізо типу моноклонального антитіла, кон'югований з відповідним флуорохромом. Відсоток загиблих та життєздатних ММСК визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D.

Для підтвердження мультипотентних властивостей отримані культури ММСК на 2-му пасажі було направлено диференційовано протягом 21 доби в остеогенному та адипогенному напрямках. Повне живильне середовище для остеогенного диференціювання складалось з середовища *DMEM-F12* (*Sigma*, США) з додаванням 10% FBS, а також містило L-аскорбінової кислоти 2-фосфату (0,05мМ), дексаметазону (100нМ) та β-гліцерофосфату (10мМ). Повне живильне середовище для адипогенного диференціювання складалось з середовища *DMEM-HG* (*Sigma*, США) з додаванням дексаметазону (1 мкМ), індометацину (200 мкМ), ізобутилметилксантину (500 мкМ) та інсуліну (5 мкг/мл).

Відкладання солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі виявляли за допомогою фарбування алізариним червоним препаратів, фіксованих в 4% розчині формальдегіду. Продукцію лужної фосфатази підтверджували за допомогою фарбування препаратів *BCIP/NBT* (*Sigma*, США). Візуалізацію ліпідних гранул в цитоплазмі клітин проводили шляхом їх фарбування розчином *Oil Red S* (*Sigma*, США).

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ GFP-ПОЗИТИВНИХ ММСК

Сингенна трансплантація суспензії GFP-позитивних ММСК семиденним (P7) тваринам з моделлю перинатального ушкодження головного мозку виконувалася стереотаксично (координати: А: 1,5 мм каудально, L: 2,0 мм латерально щодо брегми; і V: 2,0 мм вентрально відносно поверхні черепа) монолатерально в праву півкулю головного мозку під інтраперитонеальним каліпсол-ксилазиновим наркозом через 24 години після ПВЛ.

Для трансплантації підбирали оптимальний об'єм середовища культивування та дозу клітин в ньому. Оптимальною виявилася доза – 5×10^5 клітин у 2 мкл середовища. Життєздатність клітин після переведення адгезивної культури в суспензію для трансплантації становила 92,4%. Тваринам контрольної групи вводили лише середовище для культивування ММСК у відповідному об'ємі.

ПОВЕДІНКОВІ ТЕСТИ

Кортикостинальну функцію тварин оцінювали за допомогою поведінкового тесту «виймання їжі» раз на тиждень протягом 4 тижнів, починаючи з 28 доби після народження (P28) [16]. Перед тестуванням їжа у тварин забиралася, але вода залишалася. Тварин поміщали в камеру з плексигласу зі щільною 1,5 см × 0,5 см, за якою знаходилася крихта комбікорму на відстані 1 см для гарантії, що тварина захопить їжу з використанням лапи, а не діставатиме її з використанням язика. За 45 хв тваринам давалося до 60 спроб, щоб дістати і вийняти їжу. Відсоток успішних спроб розраховано таким чином:

успіх,% = (кількість успішних спроб/загальне число спроб) × 100, якщо тварина зробила 41–60 спроб протягом 45 хв, або

успіх,% = (кількість успішних спроб/40) × 100, якщо тварина зробила менше 40 спроб протягом 45 хв.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ФАРБУВАННЯ ЗРІЗІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Ідентифікацію трансплантованих клітин та оцінку ступеня ушкодження нервової тканини, спричиненого ПВЛ, було проведено методом імуногістохімії з використанням первинних та вторинних антитіл, кон'югованих з флуоресцентними барвниками AlexaFluor. Тварин,

наркотизованих каліпсолом, транскардіально перфузували 4% розчином параформальдегіду (ПФ) на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ). Фронтальні зрізи головного мозку виготовляли за допомогою вібратора *VT1000A* (*Leica*, Німеччина). Зрізи блокували у розчині 0,1 М ФБ (рН 7.4) з додаванням 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та 0,3% Тритон X-100. Інкубацію вібраторних зрізів у розчині первинних антитіл робили протягом 12 годин при + 4 °С. Були використані такі первинні антитіла: анти-GFP (маркер трансплантованих клітин), розведення 1:7000 (*Novus Biologicals*, США), анти-GFAP (маркер астроцитів), 1:1500 (*DakoCytomation*, Данія), анти-Iba-1 (маркер мікроглії), 1:1000 (*Wako*, Японія), анти-MBP (основний білок мієліну), 1:1000 (*Sigma*, США). Первинні антитіла візуалізували відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з флуорохромом AlexaFluor (*Invitrogen*, США). Пофарбовану культуру клітин покривали середовищем *Immu-MOUNT* (*Thermo Scientific*, США). Імуноцитохімічно забарвлену культуру НПК досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа *FV1000-BX61WI* (*Olympus*, Японія).

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

Статистичну обробку даних виконували з використанням програмного забезпечення Statistic (версія 5, StatSoft). Значення наведені у вигляді середнього значення ± стандартна похибка середнього. Непараметричний критерій Колмогорова-Смірнова був використаний для оцінки відмінностей між значеннями.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції прооперовані тварини відставали у розвитку у порівнянні із контрольними неоперованими мишами. Тварини з моделлю ПВЛ мали меншу вагу і зріст (рис. 1) та розлади статокінетичного рефлексу, що забезпечує збереження рівноваги тіла при активному чи пасивному зміщенні його в просторі.

Для дослідження впливу трансплантації стовбурових клітин на стан нервової тканини після ПВЛ використовували мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини. Адгезивні культури ММСК отримували з жирової клітковини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J. На 2-му пасажі в культурі переважали фібробластоподібні клітини з високою адгезивністю, діаметром до 80 мкм, що містили значну кількість вакуолей і гранул (рис.2).

Було продемонстровано здатність клітин до направленої диференціювання в остеогенному, хондрогенному та адипогенному напрямках. Таким чином, підтверджено, що отримані культури відповідають мінімальним критеріям ММСК згідно з нормами Міжна-



Рис. 1. Миші на 3 добу після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ). Нижня – миша з ПВЛ, верхня – контрольна тварина.

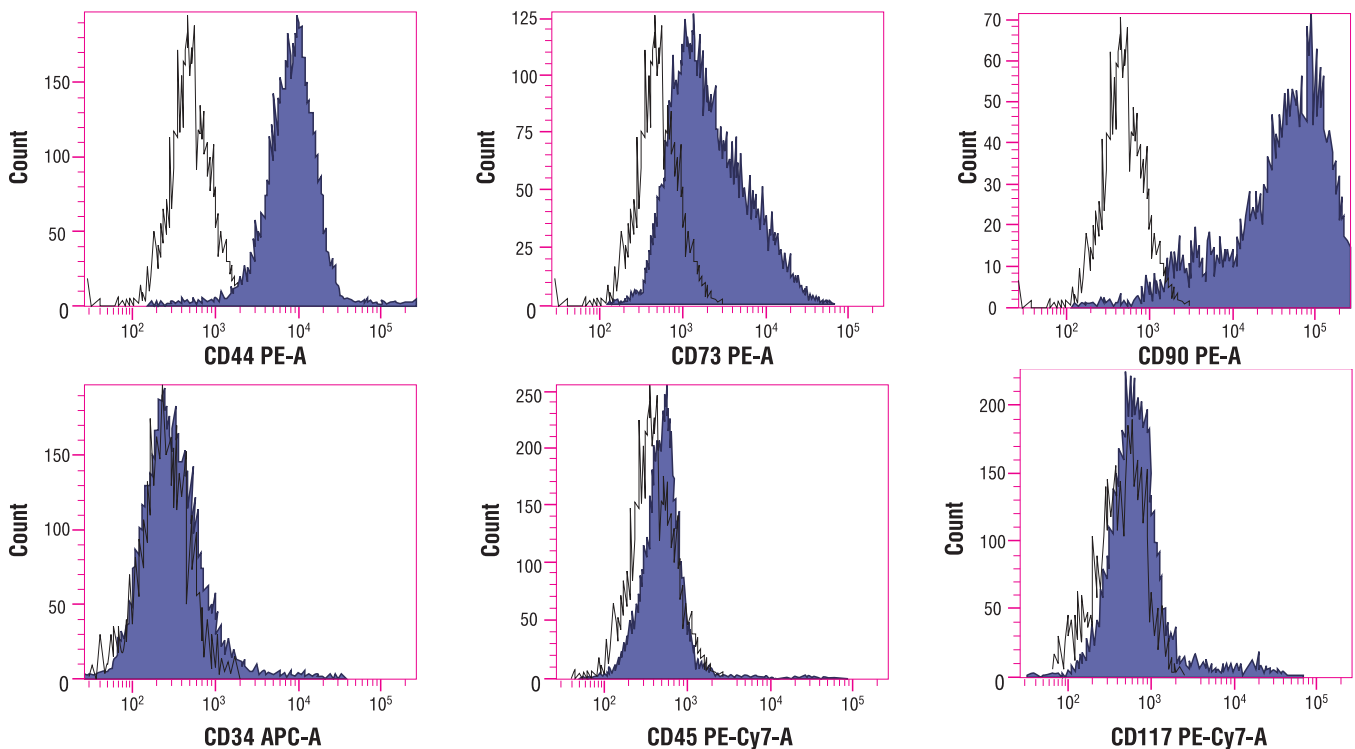


Рис. 3. Гістограми експресії маркерів CD44, CD73, CD90, CD34, CD45, CD117 в культурі ММСК жирової клітковини, 2-й пасаж. Чорний контур – ізотип-контроль, синій колір – інкубація з моноклональними антитілами.

родного товариства з клітинної терапії. Життєздатність клітин після переведення адгезивної культури в суспензію для трансплантації становила 92,4%.

При фенотипуванні культури ММСК жирової клітковини методом проточної цитометрії виявлено високий рівень експресії маркерів CD44, CD73, CD90, при цьому відносний вміст клітин з експресією гемопоетичних маркерів CD45 та CD117 становив менше 2% (рис. 3). Експресія маркера CD34 на ранніх пасажах коливалась в межах 8-12%, що є типовим для ММСК жирової клітковини і може бути ознакою більш високого потенціалу диференціювання клітин в ендотеліальному напрямку.

Поведінковий тест «дістання і виймання їжі» показав, що, у порівнянні з контрольними, тварини з ПВЛ мали більш низькі показники успішних спроб. Успіх у контрольних тварин становив $58 \pm 3\%$, а у тварин з ПВЛ – $23 \pm 4\%$ (рис. 4).

У групі тварин з трансплантацією ММСК після моделювання ПВЛ спостерігалось відновлення кортикоспинальної функції і кількість успішних спроб становила $43 \pm 4\%$ (рис. 4).

Імуногістохімічний аналіз показав, що на 30 добу після трансплантації GFP-позитивні ММСК були локалізовані над мозолистим тілом в безпосередній близькості від місця ін'єкції (рис. 5).

Для оцінки ступеня ушкодження, спричиненого ПВЛ, використовували імуногістохімічне фарбування зрізів мозку на основний білок мієліну (МВР) і шкалу від 0 до 5 [16].



Рис. 2. Мікрофото культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової клітковини мишей, 2-й пасаж. Світлова мікроскопія, фазовий контраст.

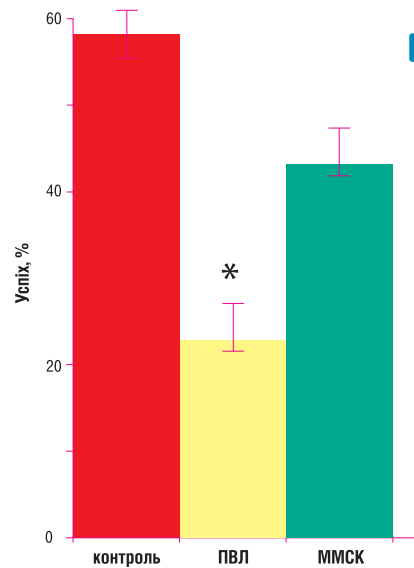


Рис. 4. Оцінка кортикоспинальної функції за допомогою поведінкового тесту «дістання і виймання їжі». ПВЛ – перивентрикулярна лейкомаляція, ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини. Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

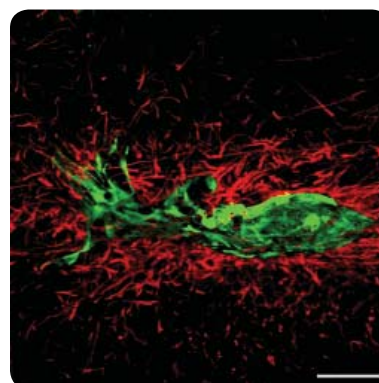


Рис. 5. Конфокальна мікрофотографія фронтального зрізу головного мозку миші на 30 добу після трансплантації GFP-позитивних ММСК. Трансплантовані ММСК були локалізовані біля зони ін'єкції. Зелений колір – GFP-позитивні ММСК, червоний – GFAP-позитивні астроцити.

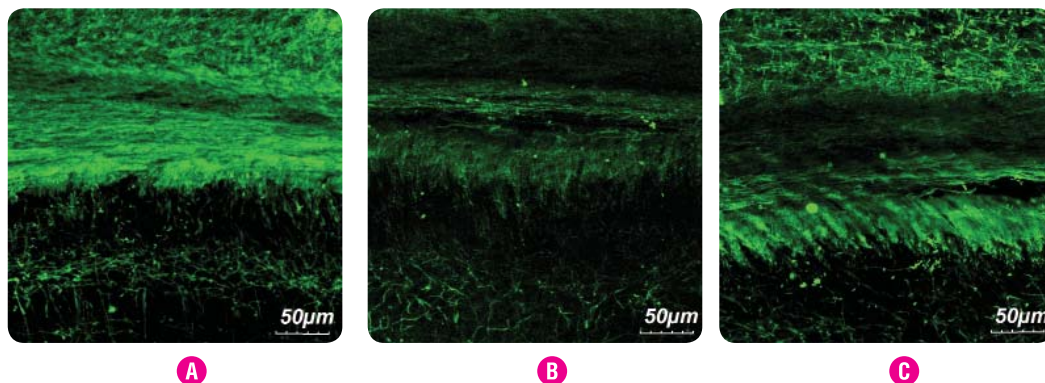


Рис. 6. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованого на основний білок мієліну (МВР). **А** – контрольна тварина, **В** – тварина з ПВЛ, **С** – тварина з ПВЛ та трансплантацією ММСК (30 доба після трансплантації).

Імуногістохімічний аналіз показав, що у контрольних тварин мозолисте тіло, яке утворене нервовими волокнами, що сполучають ліву і праву півкулі, інтенсивно зафарбовувалося антитілами до основного білка мієліну і за шкалою оцінки відповідало 0 (рис. 6, А). Після перивентрикулярної лейкомаляції інтенсивність фарбування на МВР зменшувалася і відповідала за шкалою оцінки пошкодження від 3 до 4 (рис. 6, Б), а після трансплантації ММСК – від 1 до 2 (рис. 6, В).

Трансплантація ММСК також гальмувала розвиток як мікро-, так і астрогліозу (рис. 7).

Таким чином, моделювання перивентрикулярної лейкомаляції може викликати порушення кортикоспинальної функції, що є результатом ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і активації астро- і мікроглії. Сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після ПВЛ, зменшує деградацію МВР і гальмує розвиток гліозу.

Було показано, що застосування стовбурових клітин призводить до істотного покращення стану тварин після гіпоксично-ішемічного ушкодження [17, 18]. Механізм такого нейропротекторного ефекту трансплантованих стовбурових клітин вочевидь полягає у вивільненні різноманітних факторів, які індують міграцію нейтральних прогеніторів у зону пошкодження, стимулюють ріст дендритів і аксонів та зменшують постішемічне запалення [7, 18]. Мезенхімальні стовбурові клітини модулюють численні сигнальні каскади під час нейрогенезу, ангиогенезу, синаптогенезу та апоптозу за допомогою трансмітерів. Було виявлено збільшення експресії фактора росту фібробластів (FGF-2), епідермального фактора росту (EGF), нейротрофічного фактора гліальних клітин (GDNF) після трансплантації ММСК [18]. Ці фактори відіграють ключову роль у проліферації клітин-попередників, а також в нейрогенезі та диференціації клітин [20, 21]. Крім того, стовбурові клітини спричиняють утворення нейропіліну-1

і 2, нейрегуліну-1 і ефрину-В2 – месенджерів, які відіграють важливу роль у регуляції росту аксонів, формуванні синапсів та інтеграції в нейронні мережі [19].

Встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини стимулюють проліферацію прогеніторних клітин у зубчастій звинині гіпокампа, їх міграцію у пошкоджену ділянку та диференціацію в астроцити, олігодендроцити та нейрони [17].

ММСК також підтримують проліферацію і диференціацію клітин-попередників олігодендроцитів і таким чином мієлінізацію новоутворених аксонів [17, 22]. Крім того, мезенхімальні стовбурові клітини зменшують астрогліальну реакцію, запобігаючи утворенню гліальних рубців, які ускладнюють міграцію аксонів і дендритів [23].

Відомо, що постішемічне запалення супроводжується активацією мікроглії та макрофагів ЦНС [24]. Під час пошкодження головного мозку спостерігається активація місцевої мікроглії та міграція моноцитів периферичної крові до ушкодженої ділянки [25]. Розрізняють мікроглію типу М1 і М2. Мікроглія типу М1 вивільняє прозапальні цитокіни, вільні радикали та нейротоксини, що призводить до подальшого пошкодження тканини. Мікроглія М2, навпаки, має нейропротекторну дію і продукує ІЛ-10, інсуліноподібний фактор росту-1, трансформуючий фактор росту-β та інші імуномодуючі фактори [25].

Застосування мезенхімальних стовбурових клітин зменшує кількість активованої мікроглії М1 і таким чином уповільнює вивільнення прозапальних цитокінів, а також активує мікроглію М2, яка синтезує фактори росту, що підтримують регенерацію пошкодженої тканини [19, 22, 26, 27].

Отже, головний мозок новонародженого, який розвивається і після народження, більш пластичний порівняно з мозком дорослого і тому має більший регенеративний потенціал. Саме тому трансплантація ММСК може стати ефективною стратегією для відновлення пошкодженого мозку при перинатальній патології ЦНС.

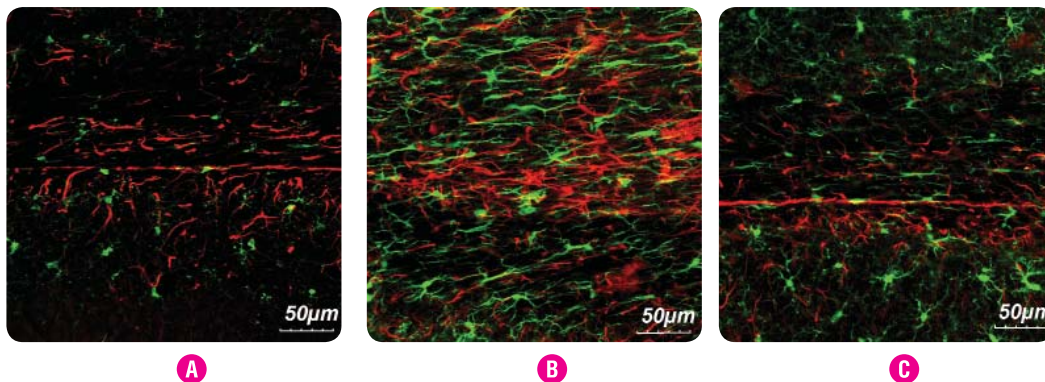


Рис. 7. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер мікроглії – Іба-1 (зелений колір) та маркер астроцитів – GFAP (червоний колір). **А** – контрольна тварина, **В** – тварина з ПВЛ, **С** – тварина з ПВЛ та трансплантацією ММСК (30 доба після трансплантації).

ВИСНОВКИ

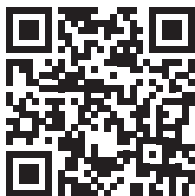
Сингенна стереотаксична трансплантація ММСК жирової клітковини сприяє відновленню порушених поведінкових реакцій у мишей із змодельованою перивентрикулярною маляцією.

ПОДЯКА

Дослідження проведено за підтримки спільного наукового проекту НАН України та Українського науково-технологічного центру № 5977.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болезни нервной системы у новорожденных и детей раннего возраста [Текст] / Ю. А. Якунин, Э. И. Ямпольская, С. Л. Кипнис, и др. // М.: Медицина, 1979. – 277 с.
2. Diminished white matter injury over time in a cohort of premature newborns [Text] / D. Gano, S. K. Andersen, J. C. Partridge, et al. // J. Pediatr. – 2015. – Vol. 166, № 1. – P. 39–43.
3. Скворцов И. А. Развитие нервной системы у детей в норме и патологии [Текст] / И. А. Скворцов, Н. А. Ермоленко // М.: Медпресс-информ, 2003. – 368 с.
4. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders [Text] / I. Knuesel, L. Chicha, M. Britschgi, et al. // Nat. Rev. Neurol. – 2014. – Vol. 10, № 11. – P. 643–660.
5. Why children with severe bacterial infection die: a population-based study of determinants and consequences of suboptimal care with a special emphasis on methodological issues [Text] / E. Launay, C. Gras-Le Guen, A. Martinot, et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, №9. – P. e107286.
6. Hypoxic/ischemic and infectious events have cumulative effects on the risk of cerebral palsy in very-low-birth-weight preterm infants [Text] / L.W. Wang, Y.C. Lin, S.T. Wang, et al. // Neonatology. – 2014. – Vol. 106, №3. – P. 209–215.
7. Velthoven C.T.J. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage [Text] / C. T. J. Velthoven, A. Kavelaars, C. J. Heijnen // Pediatric Research. – 2012. – Vol. 71, № 4. – P. 474–481.
8. Berger R. Neuroprotection in Preterm Infants [Text] / R. Berger, S. Söder // BioMed. Research International. – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 257139, 14 pages.
9. Intrathecal injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells in children with cerebral palsy: feasibility and safety [Text] / A. Zali, L. Arab., F. Ashrafi, et al. // Cytotherapy. – 2015. – Vol. 17, № 2. – P. 232–241.
10. Wang X. Effect of umbilical cord mesenchymal stromal cells on motor functions of identical twins with cerebral palsy: pilot study on the correlation of efficacy and hereditary factors [Text] / X. Wang., H. Hu, R. Hua, et al. // Cytotherapy. – 2015. – Vol. 17, №2. – P. 224–231.
11. Wnts enhance neurotrophin-induced neuronal differentiation in adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells via canonical and noncanonical signaling pathways [Text] / H. L. Tsai, W. P. Deng, W. F. Lai, et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 8. – P. e104937.
12. DNA topoisomerase II β as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells [Text] / S. Isik, M. Zaim., M.T. Yildiz, et al. // Ann. Hematol. – 2015. – Vol. 94, №2. – P. 7–18.
13. Ahn S.Y. Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage [Text] / S. Y. Ahn, Y. S. Chang, W. S. Park // Korean J. Pediatr. – 2014. – Vol. 57, № 6. – P. 251–256.
14. Clinical experience with autologous M2 macrophages in children with severe cerebral palsy [Text] / E. R. Chernykh., M. Y. Kafanova, E. Y. Shevela, et al. // Cell Transplant. – 2014. – Vol. 23, Suppl. 1. – P. S97–S104.
15. Clowry G. J. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? [Text] / G. J. Clowry, R. Basuodan, F. Chan // Frontiers in Neurology. – 2014. – Vol. 5. – Article 258, 17 pages.
16. Shen Y. Mouse Models of Periventricular Leukomalacia [Text] / Y. Shen, J. M. Plane, W. Deng // J. Vis. Exp. – 2010. – Vol. 39. – P. e1951.
17. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration [Text] / C. T. J. Velthoven, A. Kavelaars, F. Bel // Brain, Behavior, and Immunity. – 2010. – Vol. 24, № 3. – P. 387–393.
18. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model [Text] / J. A. Lee, B. I. Kim, C. H. Jo, et al. // Pediatric Research. – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 42–46.
19. Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression profile of the neonatal ischemic brain [Text] / C. T. J. Velthoven, A. Kavelaars, F. Bel, et al. // Brain, Behavior, and Immunity. – 2011. – Vol. 25, № 7. – P. 1342–1348.
20. Intracerebral infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats [Text] / T. Kobayashi, H. Ahlenius, P. Thored, et al. // Stroke. – 2006. – Vol. 37, № 9. – P. 2361–2367.
21. Shen L. H. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats [Text] / L. H. Shen, Y. Li, M. Chopp // Glia. – 2010. – Vol. 58, № 9. – P. 1074–1081.
22. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function [Text] / C. T. J. Velthoven, A. Kavelaars, F. Bel, et al. // The Journal of Neuroscience. – 2010. – Vol. 30, № 28. – P. 9603–9611.
23. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain [Text] / L. H. Shen, Y. Li, Gao Q, et al. // Glia. – 2008. – Vol. 56, № 16. – P. 1747–1754.
24. Ekdahl C. T. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia [Text] / C.T. Ekdahl, Z. Kokaia, O. Lindvall // Neuroscience. – 2009. – Vol. 158, № 3. – P. 1021–1029.
25. Czeh M. The yin and yang of microglia [Text] / M. Czeh, P. Gressens, A. M. Kaindl // Developmental Neuroscience. – 2011. – Vol. 33, № 3-4. – P. 199–209.
26. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke [Text] / P. Thored., U. Heldmann, W. Gomes-Leal, et al. // Glia. – 2009. – Vol. 57, № 8. – P. 835–849.
27. Mesenchymal stemcells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia [Text] / R. K. Jellema, T. G. A. M. Wolfs, V. Passos, et al. // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e73031.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 09.02.2015 р.

Прийнята до друку 16.04.2015 р.