

УДК 616-089.843: 611.018.26.013: 616.8-003.99: 616-092.4  
doi:10.22494/cot.v5i1.66

# Протекторний ефект мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини мишей на моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro*



Цупиков О. М.<sup>1,2</sup>, Лушнікова І. В.<sup>1</sup>, Устименко А. М.<sup>2</sup>, Кирик В. М.<sup>2</sup>, Нікандрова Є. О.<sup>1</sup>, Пацева М. А.<sup>1</sup>, Яценко К. В.<sup>1</sup>, Бутенко Г. М.<sup>2</sup>, Скибо Г. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна

<sup>2</sup>ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

e-mail: [tsupykov@gmail.com](mailto:tsupykov@gmail.com)

## РЕЗЮМЕ

Перивентрикулярна лейкомаляція (ПВЛ) – це форма ураження білої речовини головного мозку, яка виникає в результаті гіпоксично-ішемічного ушкодження та/або запалення нервової тканини, і є однією з причин розвитку дитячого церебрального паралічу. На моделях ПВЛ *in vivo* нами раніше було продемонстровано нейропротекторний ефект трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової тканини. Однак механізми, за допомогою яких трансплантовані ММСК реалізують свою нейропротекторну дію, лишаються не дослідженими.

**МЕТОЮ РОБОТИ** була оцінка впливу ММСК жирової тканини на культивовані зрізи головного мозку миші при їх контактному співкультивуванні на моделі ПВЛ *in vitro*.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Перивентрикулярну лейкомаляцію *in vitro* моделювали шляхом 30-хвилинної киснево-глюкозної депривації зрізів головного мозку миші з подальшим додаванням у культуральне середовище 100 нг/мл ліпополісахариду. Для співкультивування використовували ММСК жирової тканини, отримані від мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком (GFP). Життєздатність клітин культивованих зрізів оцінювали за допомогою аналізу рівня лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі. Ймовірну диференціацію ММСК у нейрони та гліальні клітини досліджували за допомогою імуногістохімічного фарбування зрізів з використанням специфічних антитіл до нейронів та олігодендроцитів (NeuN та Oligodendrocytes, відповідно).

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.** Моделювання ПВЛ *in vitro* на органотиповій культурі зрізів мозку призводило до значного збільшення рівня цитозольного ферменту ЛДГ у культуральному середовищі. Співкультивування зрізів з ММСК при ПВЛ зменшувало кількість цього ферменту. Крім того, показано, що за умов ПВЛ *in vitro*, ММСК здатні диференціюватися у клітини нервової тканини.

**ВИСНОВКИ.** ММСК жирової тканини мають протекторний ефект при їх співкультивуванні із зрізами головного мозку миші на моделі ПВЛ *in vitro*.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** перивентрикулярна лейкомаляція; ліпополісахариди; органотипова культура зрізів головного мозку; мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

Перивентрикулярна лейкомаляція (ПВЛ) – форма ураження білої речовини головного мозку, яка характеризується загибеллю олігодендроцитів – клітин, відповідальних за мієлінізацію аксонів, а також астро- та мікрогліозом у перивентрикулярній зоні мозку [3, 9]. Пошкодження мієлінізації аксонів призводить до розладу мозкової сигналізації, що проявляється в погіршенні моторного контролю, затримці фізичного, інтелектуального та емоційного розвитку дитини [3, 6, 21]. У результаті недорозвинення або пошкодження мозку в пренатальний, інтранатальний та ранній постнатальний періоди може виникати група синдромів, які об'єднуються терміном «дитячий церебральний параліч» – ДЦП.

Існує багато можливих причин ПВЛ, основними з яких є гіпоксично-ішемічні ураження головного мозку, автоімунні механізми в системі мати-плід, внутрішньоутробні інфекції, особливо вірусні, та ін. Останнім часом істотну роль у патогенезі ПВЛ надають нейроімунному конфлікту в системі мати-плід, що призводить до порушення розвитку як ЦНС, так і імунної системи плода [11, 12, 24].

Сучасна фармакологічна терапія перинатальної патології ЦНС залишається недосконалою і здатна порушити складний взаємозв'язок компенсаторно-приспосувальних процесів в організмі дитини, що нерідко призводить до виникнення ускладнень, які унеможливають подальше проведення медикаментозної терапії [23]. Реабілітаційні заходи в таких випадках повинні бути проведені в перші місяці життя, коли можна очікувати найбільший відновлюваний ефект.

Клітинна терапія із використанням стовбурових клітин – це перспективний підхід для лікування багатьох захворювань ЦНС, зокрема ПВЛ [8, 14, 18]. Незважаючи на численні дослідження у цьому напрямку, відкритим залишається питання не тільки про допоміжну роль клітин трансплантату в регенерації, але й про можливість трансдиференціювання інших, відмінних від нейральних стовбурових клітин, наприклад мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), в нейрони або гліальні клітини [7, 19]. ММСК мають тропність до зони пошкодження та можуть впливати на перебіг процесів запалення і репарації в ній [1]. 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 обмежень щодо фетального донорського матеріалу [4]. Було показано, що при трансплантації ММСК жирової тканини на моделі геморагічного інсульту у щурів послаблюється неврологічний дефіцит, знижується атрофія мозку, істотно зменшується зона ішемічного інфаркту та зростає кількість дрібних судин [10]. У попередній роботі на моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* ми також продемонстрували нейропротекторний ефект трансплантації ММСК жирової тканини [20]. Проте розкриття механізмів, за допомогою яких трансплантовані ММСК сприяють виживанню клітин і функціональному відновленню тварин, потребує подальших досліджень.

У цій роботі ми вивчали ефект дії ММСК жирової тканини на культивовані зрізи головного мозку миші при їх контактному співкультивуванні на моделі ПВЛ *in vitro*.

## 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, Страсбург, 1986), ст. 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, від 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

У нашому дослідженні ми використовували мишей лінії FVB «диного» типу та FVB-C-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (GFP), які утримувались за стандартних умов

на базі віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН» з вільним доступом до води та їжі.

**Органотипова культура зрізів головного мозку мишей.** Органотипову культуру зрізів головного мозку отримували з мишей лінії FVB 7-денного віку [21]. Після швидкої декапітації під ефірним наркозом виділяли мозок, розділяли його на дві частини по серединній лінії та за допомогою автоматичного чоппера (*McIlwain*, Англія) робили зрізи завтовшки 350 мкм. Зрізи культивували на пористих напівпроникних нітроцелюлозних мембранах Millicell-CM (*Millipore*, США), розміщених у CO<sub>2</sub>-інкубаторі на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5 % CO<sub>2</sub>) та рідкого середовища з pH 7.2, що містило 50 % MEM, 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса, 25 % інактивованої кінської сироватки, 10 мМ Трис, 2 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 12,5 мМ HEPES, 15 мМ глюкози, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептомицину (все – *Sigma*, США), у 6-лункових планшетах при +35 °С. Середовище культивування змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень.

**Отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини.** Жирова клітковина мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP, була використана для отримання ММСК за описаною раніше методикою [20]. Фрагменти подрібненої підшкірної жирової клітковини з пахової ділянки ферментували в 0,1 % розчині колагенази 1А (*Sigma*, США) протягом 90 хв. при 37 °С на шейкері зі швидкістю обертання 100 об/хв. Отриману суспензію відмивали в поживному середовищі DMEM (*Sigma*, США) шляхом центрифугування при 400x g. Відбирали надосадову рідину, яка містила зрілі адипоцити, утворений осад ресуспендували в середовищі DMEM з вмістом 15 % фетальної сироватки корів (FBS) та пропускали через клітинний фільтр з діаметром пор 100 мкм. Клітини висівали в культуральні флакони площею 25 см<sup>2</sup> зі щільністю 5•10<sup>5</sup> клітин/см<sup>2</sup> та культивували у повному поживному середовищі DMEM-HG (*Sigma*, США) з вмістом 10 % FBS (*HyClone*, США), пеніциліну 100 од/мл, стрептомицину 100 мкг/мл (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США) в CO<sub>2</sub>-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO<sub>2</sub> при температурі +37 °С. Пасажування культур проводили при досягненні 80 % конфлуентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину (*Sigma*, США).

Фенотипування клітин з отриманих культур проводили на 2-му пасажі методом проточної цитометрії з використанням rat anti-mouse IgG, моноклональних антитіл проти маркерів CD44-PE, CD73-PE, CD90-PE, CD34-APC, CD45-PE та CD117-PE-Cy7 (всі – *Becton Dickinson*, США) в робочій концентрації 0,5 мкг/мл. Відсоток загинлих та життєздатних ММСК визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину D (*Becton Dickinson*, США). При фенотипуванні клітин культури ММСК жирової клітковини підтверджено високий рівень експресії маркерів CD44, CD73, CD90 (84–96 %), при цьому відносний вміст клітин з експресією гемопоетичних маркерів CD34, CD45 та CD117 становив менше 2 %.

Для підтвердження мультипотентних властивостей отриманих культур ММСК на 2-му пасажі було проведено їх спрямоване диференціювання протягом 21 доби в остеогенному та адипогенному напрямках. Повне живильне середовище для остеогенного диференціювання складалось з середовища DMEM-F12 з додаванням 10 % FBS, яке також містило 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 100 нМ дексаметазону та 10 мМ β-гліцерофосфату (все – *Sigma*, США). Повне живильне середовище для адипогенного диференціювання складалось з середовища DMEM-HG з додаванням 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину, 500 мкМ ізобутилметилксантину та 5 мкг/мл інсуліну (все – *Sigma*, США). Відкладання солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі культивованих клітин виявляли за допомогою фарбування алізариновим червоним препаратом, 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 O (*Sigma*, США).

За морфологічними характеристиками, імунофенотипом та потенціалом до спрямованого диференціювання отримані культури клітин жирової тканини, що були використані в подальших експериментах, відповідали мінімальним критеріям ММСК [5].

Для контактного співкультивування зі зрізами головного мозку мишей лінії FVB використовували GFP-позитивні ММСК 2-3-го пасажів. Життєздатність клітин для трансплантації становила 93,6 %.

**Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку мишей.** Перивентрикулярну лейкомаляцію моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) для імітації процесу запалення. КГД створювали в спеціальній камері з безкисневим газовим середовищем, яке містило 95 % азоту (N<sub>2</sub>) і 5 % CO<sub>2</sub>. Для КГД нормальне середовище для культивування замінювали на фосфатний буфер з 12,5 ммоль Нерес і додаванням 10 ммоль D-сахарози замість глюкози. Тривалість КГД становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивали і повертали до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація протягом 24 та 48 годин). Після КГД у культуральне середовище додавали 100 нг/мл ЛПС (L4130, *Sigma-Aldrich*, США).

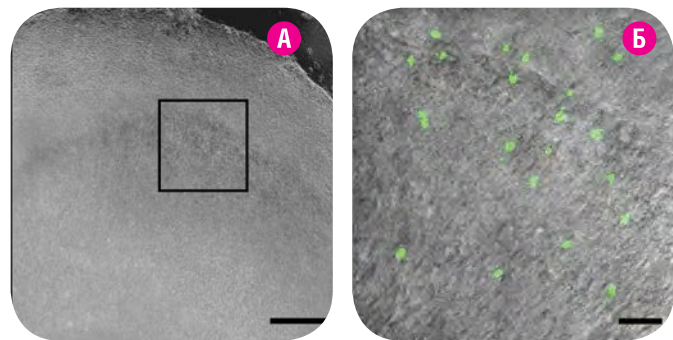
ММСК наносили у суспензії безпосередньо на культивовані зрізи мозку по 25•10<sup>3</sup> клітин на один зріз за 2 години перед моделюванням ПВЛ.

У роботі були використані такі експериментальні групи: 1 – інтактні культивовані зрізи головного мозку, 2 – зрізи після ПВЛ, 3 – інтактні культивовані ММСК, 4 – культивовані ММСК після ПВЛ, 5 – зрізи + ММСК, 6 – зрізи + ММСК після ПВЛ.

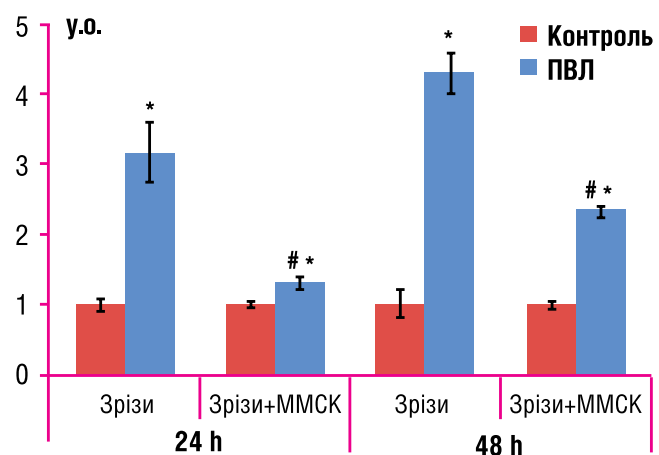
**Кількісна оцінка лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі.** Визначення змін відносної кількості цитозольного ферменту ЛДГ у культуральному середовищі проводили колориметричним методом за допомогою тест-набору G1780 (*Promega*, USA). Під час пошкодження клітинної мембрани ЛДГ вивільняється у культуральне середовище та характеризує ступінь ушкодження клітин. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості ферменту ЛДГ у середовищі культивування та обернено пропорційна життєздатності клітин у культурі [2].

Після проведення експериментів на органотипових зрізах мозку відбирали 200 мкл культурального середовища в 24-лунковий планшет. У кожен лунку додавали 200 мкл субстрату для визначення ЛДГ. Проби інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 30 хв. Потім додавали 200 мкл розчину, що зупиняє реакцію. Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою спектрофотометру *uniSPEC 2* (*LLG*, Німеччина) у мікроюветах при довжині хвилі 492 нм. Проби відбирали через 24 та 48 годин після експериментальних впливів у дублях та визначали середнє значення для кожної лунки. Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях. Умовні одиниці відповідали одиницям оптичної щільності розчину, які були співвіднесені до площі тканини у відповідній лунці та нормалізовані до контролю.

**Імуногістохімічний аналіз органотипової культури 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 AlexaFlour на 14 добу після ПВЛ та нанесення ММСК на органотипову культуру. Зрізи головного мозку мишей фіксували 4 % розчином формальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері. Зафіксовані зрізи блокували у розчині 0,1 М фосфатного буферу (pH = 7,4) з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну та 0,3 % Тритон X-100. Інкубацію



**Рис. 1.** Мікрофото культивованого зрізу головного мозку миші: (А) – квадратом позначена ділянка, яка збільшена на рис. (Б). GFP-позитивні ММСК (зелений колір) після нанесення на культивований зріз. Фазовий контраст, Шкала: А – 500 мкм, Б – 50 мкм.



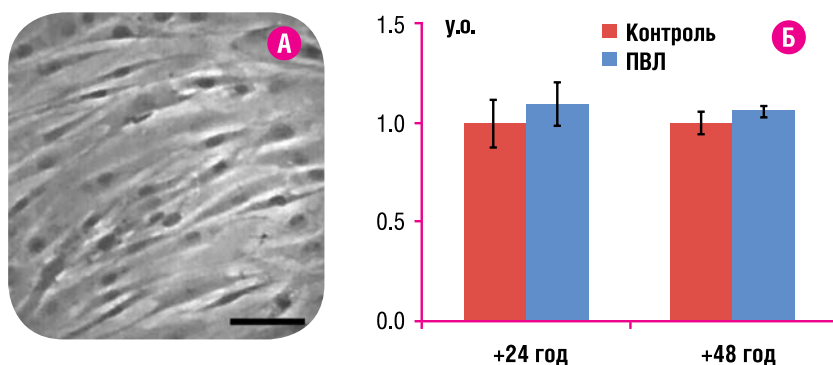
**Рис. 2.** Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин від початку моделювання ПВЛ *in vitro* в умовах культивування зрізів окремо або сумісно з ММСК.

Примітки: \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем; # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ у відповідній групі зрізів без ММСК ( $p < 0,05$ ).

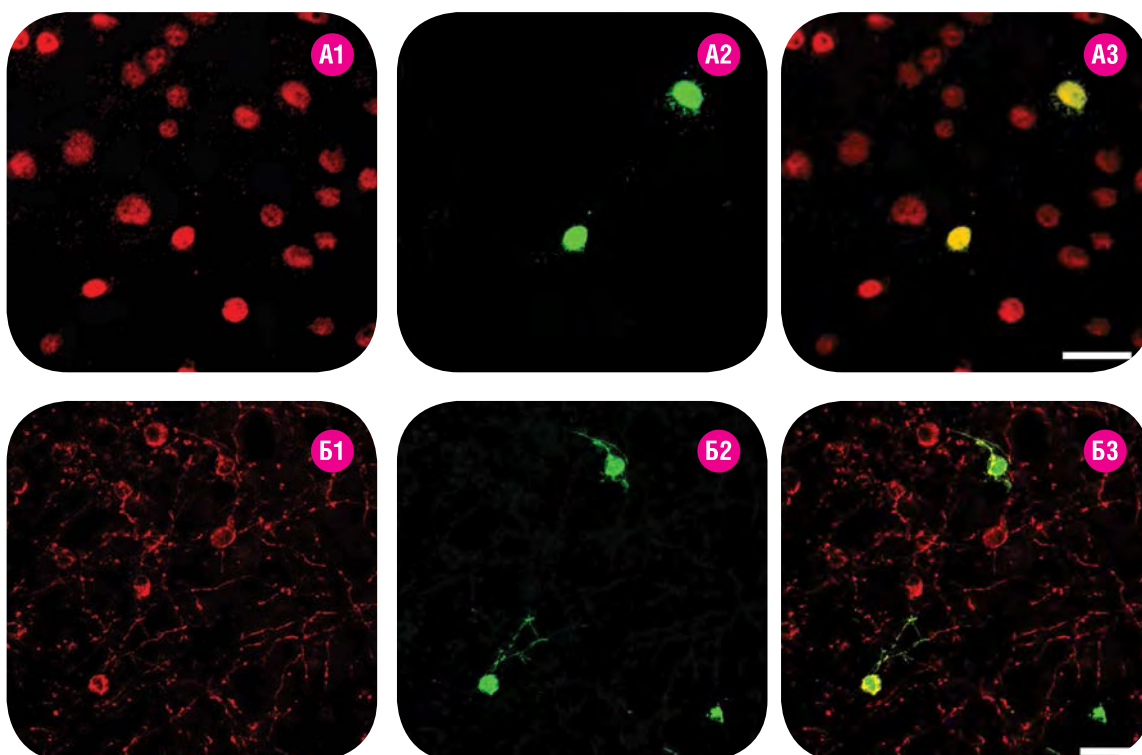
зрізів у розчині первинних антитіл робили протягом 12 годин при +4 °C. Були використані такі первинні антитіла: анти-GFP (маркер трансплантованих клітин), розведення 1:7000 (*Novus Biologicals*, США); анти-NeuN (маркер нейронних ядер), 1:1000 (*Millipore*, США) та анти-Oligodendrocytes (маркер олігодендроцитів), 1:1000 (*Sigma-Aldrich*, США). Первинні антитіла візуалізували відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з флуорохромом AlexaFlour (*Invitrogen*, США). Надалі органотипові культури зрізів головного мозку покривали середовищем Immu-MOUNT (*Thermo Scientific*, США). Імуноцитохімічно забарвлену культуру досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (*Olympus*, Японія).

**Статистичний аналіз.** Статистичний аналіз виконували за допомогою програмного забезпечення OriginPro 8.5 (*OriginLab Corporation*, США). Вибірка даних включала результати, отримані з трьох експериментів. Результати наведені у вигляді середнього арифметичного з 4-х значень ( $n = 4$ ) у кожній експериментальній групі ± стандартна похибка середнього (SEM). Дані характеризувалися нормальним розподілом, статистична вірогідність різниць визначалась парним t-критерієм Стьюдента, відмінності вважалися достовірними при  $p < 0,05$ .





**Рис. 3.** Вплив ПВЛ *in vitro* на життєздатність ММСК у культурі без культивованих зрізів, 2-й пасаж. **А** – мікрофото культури ММСК. **Б** – гістограма, що демонструє відносну кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі ММСК через 24 та 48 годин після моделювання ПВЛ *in vitro*. Шкала – 300 мкм.



**Рис. 4.** Імуногістохімічний аналіз сумісної культури GFP-позитивних ММСК та зрізів головного мозку миші на 14-у добу співкультивування. **А1** – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер нейронів NeuN (червоне забарвлення), **А2** – GFP-позитивні ММСК (зелене забарвлення), **А3** – накладення зображень **А1** і **А2** (жовте забарвлення GFP-позитивних клітин з експресією NeuN); **Б1** – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер олігодендроцитів O4 (червоне забарвлення), **Б2** – GFP-позитивні ММСК (зелене забарвлення), **Б3** – накладення зображень **Б1** і **Б2** (жовте забарвлення GFP-позитивних клітин з експресією oligodendrocytes). Шкала – 100 мкм.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Оцінка життєздатності органотипових зрізів головного мозку та ММСК жирової тканини по вмісту ЛДГ в культуральному середовищі.

У цій роботі було використано попередньо розроблену нами модель ПВЛ *in vitro*, в якій моделювання ураження білої речовини головного мозку досягалося шляхом киснево-глюкозної депривації культивованих зрізів головного мозку та додаванням ендотоксину ліпополісахариду у культуральне середовище [21].

Близько 10 % нанесених на зріз GFP-позитивних клітин прикріпилися до культивованого зрізу (рис. 1). Решта ММСК розподілялися на поверхні пористої мембрани.

Виявлено, що через 24 та 48 годин від початку моделювання ПВЛ *in vitro* відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі збільшу-

валася порівняно із контрольними зрізами в 3,1 разу та 4,3 разу відповідно (рис. 2). Співкультивування з ММСК достовірно зменшувало кількість ЛДГ порівняно із ПВЛ, як після 24, так і після 48 годин (у 2,4 разу, та в 1,9 разу відповідно).

Також досліджували вплив компонентів, які забезпечували моделювання ПВЛ *in vitro*, на життєздатність ММСК у культурі без культивованих зрізів. На 2-му пасажі в культурі ММСК переважали фібробластоподібні клітини з високою адгезивністю, діаметром до 80 мкм, що містили значну кількість вакуолей і гранул (рис. 3). Показано, що через 24 та 48 годин після моделювання ПВЛ *in vitro* відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі ММСК достовірно не змінювалася порівняно із контрольними значеннями без моделювання ПВЛ *in vitro*. Тобто наявність компонентів (пошкоджуючих чинників), що моделюють ПВЛ *in vitro*, істотно не впливала на життєздатність ММСК у культурі, що свідчить про високу стійкість ММСК до ушкоджуючих чинників,

використаних для моделювання ПВЛ у даному експерименті (зокрема, 30-хвилинна КГД та ЛПС в дозі 100 нг).

Таким чином, результати спектрофотометричного аналізу продемонстрували, що моделювання ПВЛ *in vitro* збільшувало відносну кількість ЛДГ у культуральному середовищі порівняно із контрольними зрізами, а співкультивування з ММСК достовірно зменшувало кількість ЛДГ порівняно із ПВЛ і мало нейропротекторний характер.

### ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ОРГАНОТИПОВОЇ КУЛЬТУРИ ЗРІЗІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Імуногістохімічний аналіз показав, що на 14-у добу співкультивування GFP-позитивних ММСК із органотиповими зрізами головного мозку після ПВЛ значна кількість ММСК виживала та зберігала фенотипічні ознаки. Приблизно 5 % GFP-позитивних ММСК, що прикріпилися до культивованого зрізу, диференціювалися в NeuN-позитивні зрілі нейрони (рис. 4А1-А3) або олігодендроцити (рис. 4Б1-Б3).

Отже, імуногістохімічний аналіз показав, що на 14-у добу співкультивування GFP-позитивних ММСК із органотиповими зрізами головного мозку після ПВЛ незначна кількість ММСК диференціювалася у нейрогенному напрямку і утворювала зрілі нейрони та олігодендроцити.

Можливі механізми нейропротекторної дії ММСК можуть бути пов'язані як із заміною ушкоджених клітин шляхом диференціації та інтеграції трансплантованих клітин, так і з біоактивними чинниками, здатними модулювати розвиток ушкодження при ПВЛ. Вважають, що нейропротекторні властивості ММСК реалізуються здебільшого не прямо через диференціювання, а паракринно завдяки різноманітним факторам, які індукують міграцію ендогенних нейральних прогеніторів у зону пошкодження, стимулюють ріст дендритів і аксонів та зменшують постішемичне запалення [13, 15, 22]. Було по-

казано, що кондиційне середовище з ММСК захищало культуру нейронів від індукованого апоптозу [25]. ММСК модулюють численні сигнальні каскади під час нейрогенезу, ангиогенезу, синаптогенезу та апоптозу за допомогою трансмітерів шляхом секреції фактора росту фібробластів (FGF-2), епідермального фактора росту (EGF), нейротрофічного фактора гліальних клітин (GDNF) та ін. [22]. ММСК також продукують високий рівень цитокінів, які залучені в процеси проліферації клітин та регенерації тканин, таких як IGF-1 (insulin-like growth factor-1), VEGF-A (vascular endothelial growth factor A), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) та еритропоетин [16].

Відомо про вплив трансплантованих ММСК на тканини рециєнта шляхом диференціації у клітини, специфічні для місця трансплантації [17]. Є дані, які підтверджують, що ММСК із жирової тканини сприяли морфологічному і функціональному відновленню пошкоджень спинного мозку. Вони експресували гліальні маркери GFAP,  $\beta$ -тубулін-3 і нейрофіламенти NF160 [17]. Наші дослідження продемонстрували, що за умов ПВЛ при контактному співкультивуванні ММСК зі зрізами головного мозку певна кількість трансплантованих ММСК диференціювалися у нейрони та олігодендроцити, оскільки експресували маркери зрілих нейронів та олігодендроцитів (рис. 4).

Незважаючи на значну кількість даних, яка свідчить про позитивний ефект трансплантації ММСК при різних захворюваннях ЦНС, впровадження в клінічну практику методик трансплантації стовбурових клітин потребує додаткових досліджень та має базуватися на глибокому розумінні механізмів їх функціонування та достатньому експериментальному матеріалі. Вивчення зазначеного кола питань можливе в умовах експериментальної трансплантації із залученням адекватних моделей цієї патології. Використана *in vitro* модель ПВЛ є адекватною для вивчення механізмів та засобів нейропротекції при даній патології.

## ВИСНОВКИ

**Отже, результати нашого дослідження свідчать про те, що ММСК жирової тканини мають протекторний вплив на культивовані зрізи головного мозку мишей та здатні диференціюватися у клітини нервової тканини при моделюванні ПВЛ *in vitro*.**

## СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ahn S. Y. Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage / S. Y. Ahn, Y. S. Chang, W. S. Park // Korean J Pediatr. – 2014. – Vol. 57, № 6. – P. 251-256.
2. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers *in vitro* / M. Allen, P. Millett, E. Dawes, et al. // Clin Mater. – 1994. – Vol. 16, № 4. – P. 189-94.
3. Blumenthal I. Periventricular leukomalacia: a review / I. Blumenthal // Eur J Pediatr. – 2004. – Vol. 163, № 8. – P. 435-442.
4. Clinical experience with autologous M2 macrophages in children with severe cerebral palsy / E. R. Chernykh, M. Y. Kafanova, E. Y. Shevela, et al. // Cell Transplant. – 2014. – Vol. 23, Suppl 1. – P. 97-104.
5. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, et al. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315-317.
6. Diminished white matter injury over time in a cohort of premature newborns / D. Gano, S. K. Andersen, J. C. Partridge, et al. // J Pediatr. – 2015. – Vol. 166, № 1. – P. 39-43. – doi: 10.1016/j.jpeds.2014.09.009
7. DNA topoisomerase II $\beta$  as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells / S. Isik, M. Zaim, M. T. Yildiz, et al. // Ann Hematol. – 2015. – Vol. 94, № 2. – P. 7-18.
8. Kan I. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases / I. Kan, E. Melamed, D. Offen // Handb Exp Pharmacol. – 2007. – Vol. 180. – P. 219-242.
9. Khwaja O. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity / O. Khwaja, J. J. Volpe // Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. – 2008. – Vol. 93, № 2. – P. 153-161. – doi: 10.1136/adc.2006.108837
10. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model / J. M. Kim, S. T. Lee, K. Chu, et al. // Brain Res. – 2007. – Vol. 1183. – P. 43-45.
11. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders / I. Knuesel, L. Chicha, M. Britschgi, et al. // Nat Rev Neurol. – 2014. – Vol. 10, № 11. – P. 643-660.
12. 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 / E. Launay, C. Gras-Le Guen, A. Martinot, et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 9. – P. e107286.

13. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model / J. A. Lee, B. I. Kim, C. H. Jo, et al. // *Pediatric Research*. – 2010. – **Vol. 67, № 1**. – P. 42-46.
14. Lindvall O. Stem cells in human neurodegenerative disorders – time for clinical translation? / O. Lindvall, Z. Kokaia // *J Clin Invest*. – 2010. – **Vol. 120, № 1**. – P. 29-40.
15. Linero I. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration / I. Linero, O. Chaparro // *PLoS One*. – 2014. – **Vol. 9, № 9**. – P. 107001.
16. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells / J. G. Rasmussen, O. Frøbert, L. Pilgaard, et al. // *Cytotherapy*. – 2011. – **Vol. 13, № 3**. – P. 318-328.
17. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury / H. H. Ryu, J. H. Lim, Y. E. Byeon, et al. // *J Vet Sci*. – 2009. – **Vol. 10, № 4**. – P. 273-84.
18. Sadan O. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases / O. Sadan, E. Melamed, D. Offen // *Expert Opin Biol Ther*. – 2009. – **Vol. 9, № 12**. – P. 1487-1497.
19. Wnts enhance neurotrophin-induced neuronal differentiation in adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells via canonical and noncanonical signaling pathways / H. L. Tsai, W. P. Deng, W. F. Lai, et al. // *PLoS One*. – 2014. – **Vol. 9, № 8**. – P. e104937.
20. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia / O. M. Tsypukov, V. M. Kyryk, A. M. Ustyenko, et al. // *Cell and Organ Transplantation*. – 2015. – **Vol. 3, № 1**. – P. 68-73.
21. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture / O. M. Tsypukov, I. V. Lushnikova, Y. A. Nikandrova, et al. // *Cell and Organ Transplantation*. – 2016. – **Vol. 4, № 2**. – P. 188-193. – doi:10.22494/cot.v4i2.60
22. Velthoven C. T. J. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage / C. T. J. Velthoven, A. Kavelaars, C. J. Heijnen // *Pediatric Research*. – 2012. – **Vol. 71, № 4**. – P. 474-481.
23. Volpe J. J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances / J. J. Volpe // *Lancet Neurol*. – 2009. – **Vol. 8, № 1**. – P. 110-124. – doi: 10.1016/S1474-4422(08)70294-1
24. Hypoxic/ischemic and infectious events have cumulative effects on the risk of cerebral palsy in very-low-birth-weight preterm infants / L. W. Wang, Y. C. Lin, S. T. Wang, et al. // *Neonatology*. – 2014. – **Vol. 106, №3**. – P. 209-215.
25. Adipose stromal cells-secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis / X. Wei, L. Zhao, J. Zhong, et al. // *Neurosci Lett*. – 2009. – **Vol. 462, № 1**. – P. 76-9.



СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 03.03.2017 р.

Прийнята до друку 11.05.2017 р.

Дослідження проведено за підтримки цільової академічної програми «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації 0112U001475), та в межах проекту «Дослідження регенеративного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при перинатальній патології ЦНС» (номер державної реєстрації 0115U003633).