

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.^{1,2}, Лушнікова І. В.¹, Устименко А. М.², Кирик В. М.², Нікандрова Є. О.¹, Пацева М. А.¹, Яценко К. В.¹, Бутенко Г. М.², Скибо Г. Г.^{1,2}

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна

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

e-mail: 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 спілкуванні 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 CO₂-інкубаторі на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5 % CO₂) 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 NaHCO₃, 12,5 мМ HEPES, 15 мМ глюкози, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину (все – *Sigma*, США), у 6-лункових планшетах при +35 °C. 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 °C 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 см² зі щільністю 5•10⁵ клітин/см² та культивували у повному поживному середовищі DMEM-HG (*Sigma*, США) з вмістом 10 % FBS (*HyClone*, США), пеніциліну 100 од/мл, стрептоміцину 100 мкг/мл (*Sigma-Aldrich*, США), 1:100 nonessential amino acids (*Sigma-Aldrich*, США) в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі +37 °C. 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 загиблених 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 контактної співкультування 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 (N₂) і 5 % CO₂. 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•10³ 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

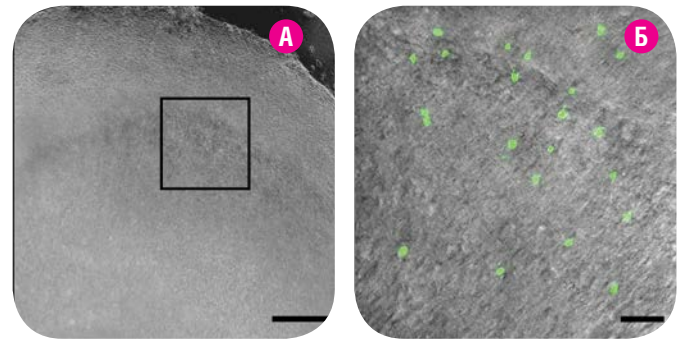


Рис. 1. Мікрофото культивованого зрізу головного мозку миші: (А) – квадратом позначена ділянка, яка збільшена на рис. (Б). GFP-позитивні ММСК (зелений колір) після нанесення на культивований зріз. Фазовий контраст, Шкала: А – 500 мкм, Б – 50 мкм.

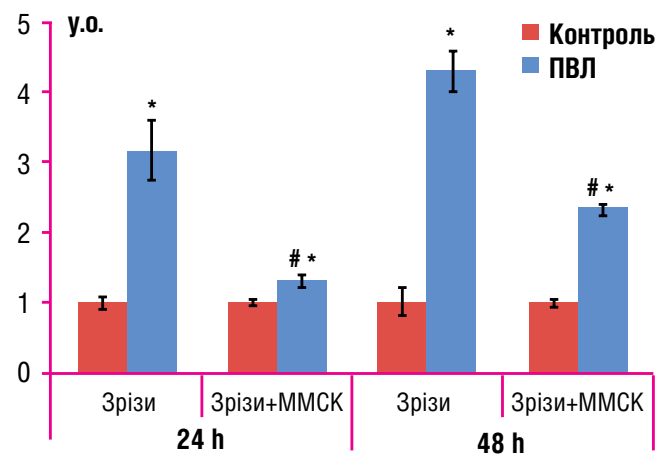


Рис. 2. Відносна кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин від початку моделювання ПВЛ *in vitro* в умовах культивування зрізів окремо або сумісно з ММСК.

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 $p < 0,05$.

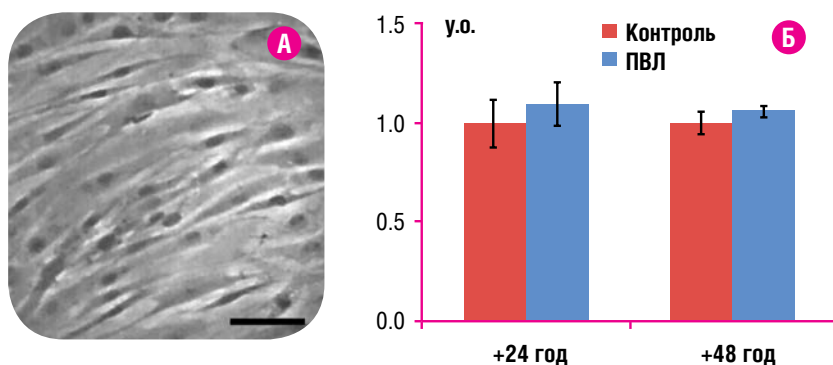


Рис. 3. Вплив ПВЛ *in vitro* на життєздатність ММСК у культурі без культивованих зрізів, 2-й пасаж. **А** – мікрофото культури ММСК. **Б** – гістограма, що демонструє відносну кількість ферменту ЛДГ у культуральному середовищі ММСК через 24 та 48 годин після моделювання ПВЛ *in vitro*. Шкала – 300 мкм.

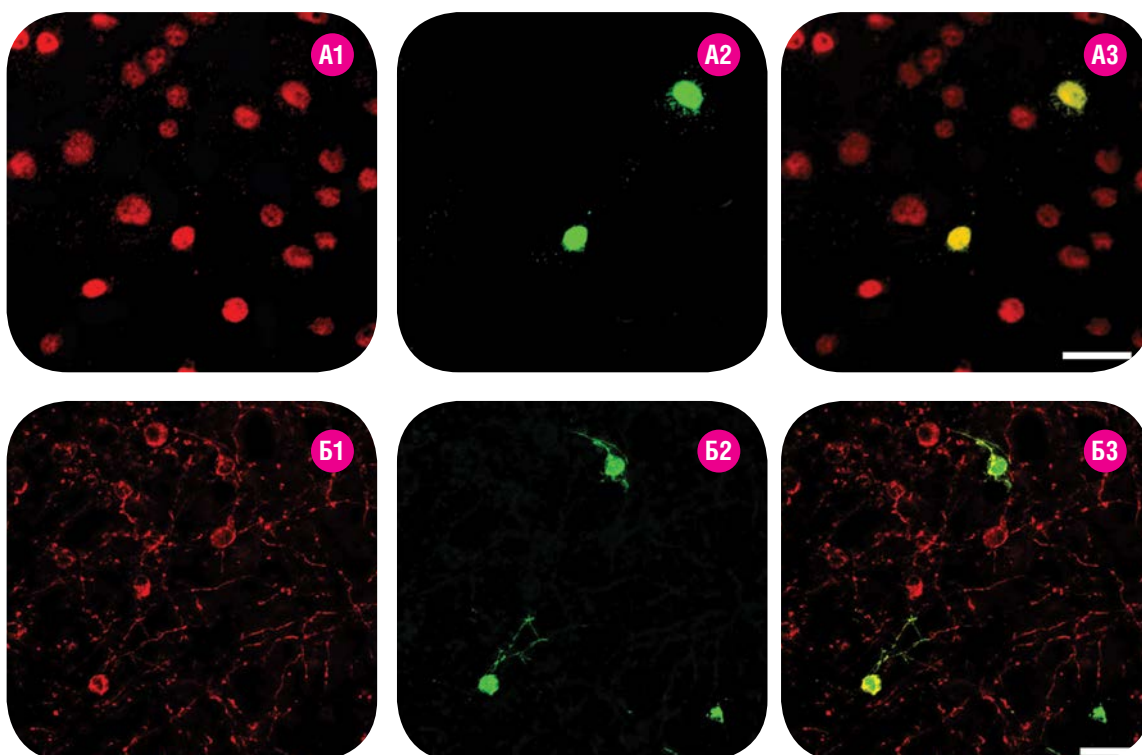


Рис. 4. Імуногістохімічний аналіз сумісної культури GFP-позитивних ММСК та зрізів головного мозку миші на 14-у добу співкультивування. **А1** – конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер нейронів NeuN (червоне забарвлення), **А2** – GFP-позитивні ММСК (зелене забарвлення), **А3** – накладення 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, β -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 β 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).