

УДК 57.086:612.822.54+615.21  
doi:10.22494/cot.v5i1.67

# Плацентарные стволовые клетки, органотипическая культура и экстракт плаценты человека обладают нейропротекторной активностью *in vitro*



Прокопюк В. Ю., Чуб О. В., Шевченко М. В., Прокопюк О. С.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

e-mail: [v.yu.prokopiuk@gmail.com](mailto:v.yu.prokopiuk@gmail.com)

## РЕЗЮМЕ

По данным ВОЗ, от инсультов ежегодно умирают 6,7 миллиона человек, поэтому поиск новых нейропротекторных средств остается актуальной задачей современной регенеративной медицины.

**ЦЕЛЮ** данной работы было изучение нейропротекторной активности факторов плацентарного происхождения.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** *In vitro* модели глутаматной эксайтотоксичности на нейральных клетках крыс изучали нейропротекторную активность сред, кондиционированных с криоконсервированными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) плаценты, органотипической культурой плаценты и экстрактом плаценты человека. Нейральные клетки подвергали воздействию плацентарных факторов без глутамата, до воздействия глутамата и после глутамата. Оценивали метаболическую активность нейральных клеток методом МТТ-теста.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** Показано, что плацентарные факторы повышают показатели МТТ-теста, предотвращают токсическое действие глутамата на нейральные клетки и способствуют их восстановлению. Показана термоллабильность факторов плацентарного происхождения и оценена эффективность различных препаратов плаценты.

**ВЫВОДЫ.** Кондиционные среды МСК плацентарного происхождения, органотипической культуры плаценты и экстракт плаценты человека обладают нейропротекторной активностью в отношении клеток головного мозга крысы *in vitro*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мезенхимальные стволовые клетки; плацента; экстракт плаценты; нейральные клетки; нейропротекторный эффект

По данным ВОЗ, инсульт занимает 2-е место среди причин смертности после заболеваний сердечно-сосудистой системы – от него ежегодно умирают более 6 миллионов человек. Вклад инсультов в структуру смертности увеличился за последние 10 лет, поскольку они являются одними из наименее курабельных заболеваний. Кроме того, в развитых странах на четвертое место среди причин смертности выходят старческие деменции и демиелинизирующие заболевания [17]. Актуальной задачей современной медицины является поиск новых эффективных способов лечения, которые уменьшают повреждения, предотвращают гибель и способствуют восстановлению нейронов и глии [5, 7, 8]. Многочисленными исследованиями пока-

зано, что терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), в том числе плацентарного происхождения, может быть эффективна при различных заболеваниях нервной системы, включая инсульты и травмы [3, 5, 19]. Кроме того, показано положительное действие на нервную систему тканевых, клеточных факторов [4, 16], женских половых гормонов и экстракта плаценты [2, 15, 18]. При этом механизм нейропротекторного действия МСК связывают с паракринными взаимодействиями, влиянием на нейроны и глию [4, 8]. Можно предположить, что производные плаценты, как стволовые клетки, так и экстракт и экспланты (органотипическая культура), будут иметь нейропротекторное и лечебное действие. Плацента является одним

из наиболее доступных и перспективных источников биоматериала, однако использование плацентарных препаратов невозможно без создания низкотемпературного банка, который обеспечивает надежное количество и качество препаратов, кроме того, криоконсервирование меняет свойства плацентарного биоматериала [10-13].

**Целью данной работы** было исследование нейропротекторной активности криоконсервированных органотипической культуры ворсин плаценты (эксплантов), мезенхимальных стволовых клеток плаценты и экстракта плаценты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Дизайн эксперимента.** Для изучения нейропротекторного действия плацентарных факторов была выбрана модель глутаматной эксайтотоксичности (повреждение через перевозбуждение нейромедиатором), которая имеет место в патогенезе ряда неврологических заболеваний (ишемия, травматические повреждения, нейродегенеративные заболевания) и является стандартным методом исследования нейропротекторной активности [6, 9]. Исследование было разделено на 3 этапа (**табл.1**). На первом этапе исследовали влияние сред, кондиционированных с эксплантами плаценты, МСК плаценты и среды с добавлением 10 % экстракта плаценты на нейральные клетки (НК) без воздействия глутамата. На втором этапе исследовали нейропротекторное (профилактическое) действие тех же сред, путем инкубирования с ними НК в течение 1 сут до воздействия глутамата. На третьем этапе исследовали регенерирующее (лечебное) влияние веществ на НК после воздействия глутамата. Во всех случаях исследовали как влияние нативных сред, так и сред, инактивированных нагреванием до 90 °С в течение 30 минут. Использовали среды, кондиционированные с МСК и эксплантами плаценты в течение 1 суток по ранее использованным методикам [10, 12]. Концентрация экстракта плаценты была ранее эмпирически подобрана и составляла 10 % от культуральной среды [1]. Предполагали, что суток достаточно для поступления в среду паракринных факторов, однако при этом среда не успевает истощиться или насытиться продуктами метаболизма.

Плаценты получали с информированного согласия женщин после операции кесарева сечения. Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2013 г.), с положением «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (г. Страсбург, 1986 г.) и согласованы с комитетом по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (протокол №2 от 03.06.2013 г.).

**Культура нейральных клеток.** НК выделяли из головного мозга новорожденных крыс линии Wistar в первые сутки после рождения ранее разработанным методом [14]. Для этого ткань дезагрегировали в течение 15 мин в 0,25 % растворе трипсина (*BioWest*, Франция) на фосфатно-солевом буфере (PBS) при 37 °С. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (SPL, Корея) в среде DMEM с высоким

содержанием глюкозы и L-глутамином (*BioWest*, Франция), обогащенной 10 % фетальной бычьей сыворотки – FBS (*Lonza*, Германия) в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Через 5 суток после адгезии неадгезированные клетки удаляли промыванием PBS, оставшиеся снимали раствором 0,25 % трипсина и Версена в соотношении 1:1 и использовали в модели глутаматной эксайтотоксичности. Для данного эксперимента была выбрана культура, содержащая различные клетки головного мозга, поскольку механизм повреждения и регенерации рассматривается рядом авторов как процессы взаимодействия нейронов с глией [4, 8].

**Модель глутаматной эксайтотоксичности.** Для моделирования глутаматной эксайтотоксичности нейральные клетки переносили в 96-луночный планшет в концентрации 20000 на лунку на 1 сут для прикрепления, после чего среду заменяли на свежую с добавлением глутамата (*Sigma*, США) с конечной концентрацией 10 мМоль и инкубировали 1 сут в прежних условиях. Для оценки метаболической активности клеток использовали МТТ-тест. Лунки промывали дважды PBS, среду меняли на свежую, добавляли МТТ (*Sigma*, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Инкубировали 4 часа, после чего среду аккуратно отбирали, кристаллы формазана растворяли 10 % раствором додецилсульфата натрия (SDS) на диметилсульфоксиде (*Sigma*, Франция). Абсорбцию измеряли на планшетном спектрофотометре Utrao SM600 (Китай) при длине волны 570 нм. Каждый эксперимент повторяли на трех различных культурах клеток, по каждой из которых учитывали 8 проб. При этом показатель МТТ-теста для клеток без воздействия принимали за 100 %.

**Получение криоэкстракта плаценты.** Экстракт плаценты получали ранее описанным методом [13]. Для этого плаценту человека, доставленную в течение 3 часов после операции кесарева сечения, фрагментировали, к одной части ткани плаценты добавляли 2 части PBS, трижды охлаждали погружением в жидкий азот и отогревали на водяной бане при температуре 37 °С, центрифугировали при 1500 об/мин, отбирали надосадок.

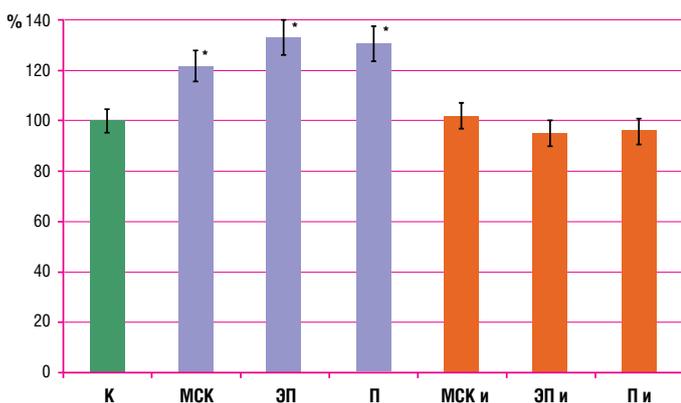
**Получение среды, кондиционированной с криоконсервированными эксплантами плаценты.** Среда, кондиционированную с эксплантами плаценты, получали ранее описанным методом [12]. Для этого 10 мг криоконсервированных эксплантов плаценты культивировали 1 сутки в 24-луночных планшетах (SPL, Корея) в 1 мл среды DMEM с высоким содержанием глюкозы и L-глутамином (*BioWest*, Франция), обогащенной 10 % FBS (*Lonza*, Германия) в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

**Получение среды, кондиционированной с криоконсервированными мезенхимальными клетками плаценты.** МСК плаценты получали из плодных оболочек ферментативным методом с использованием 0,25 % трипсина [10]. Клетки ранее фенотипированы, на их поверхности присутствуют маркеры CD90, CD73, CD105, отсутствует CD34, они имеют способность к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении [10, 11]. Для получения среды, кондиционированной с криоконсервированными МСК плаценты, клетки размораживали на водяной бане при 37 °С, по достижении монослоя – около 1•10<sup>6</sup> клеток на 5 мл среды на 25 см<sup>2</sup> флаконах (SPL, Корея) – среду меняли, культивировали 1 сут в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и L-глутамином (*BioWest*, Франция), обогащенной 10 % FBS (*Lonza*, Германия) в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

**Криоконсервирование клеток и эксплантов плаценты.** Экспланты плаценты и МСК плаценты 3-4 пассажей криоконсервировали по ранее использованной программе [10, 12], эффективность которой показана в предыдущих работах [10, 11, 12]. В качестве криозащитной среды использовали среду DMEM с высоким содержанием глюкозы

Таблица 1. Дизайн эксперимента

ГРУППА	ДЕНЬ 1	ДЕНЬ 2	ДЕНЬ 3
Положительный контроль	-	-	МТТ
Отрицательный контроль	-	Глу	МТТ
Этап 1 (действие на интактные НК)	-	Среды	МТТ
Этап 2 (нейропротекторное действие)	Среды	Глу	МТТ
Этап 3 (регенеративное действие)	Глу	Среды	МТТ



**Рис. 1.** Влияние факторов плацентарного происхождения на метаболическую активность нейральных клеток по результатам МТТ-теста. К – контроль, нейральные клетки без воздействия. МСК – нейральные клетки со средой, кондиционированной МСК, ЭП – нейральные клетки с добавлением в среду 10 % экстракта плаценты, П – нейральные клетки со средой, кондиционированной эксплантами плаценты. МСК и, ЭП и, П и – те же среды, инактивированные нагреванием.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

и L-глутамином (BioWest, Франция), обогащенной 10 % FBS (Lonza, Германия) и 10 % диметилсульфоксидом (Sigma, США), замораживали в криобирках (Nunc, США) с использованием контейнеров Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Fisher Scientific, США), заполняемых изопропанолом, со скоростью 1 °C до -70 °C с последующим погружением в жидкий азот. Размораживали на водяной бане при 37 °C.

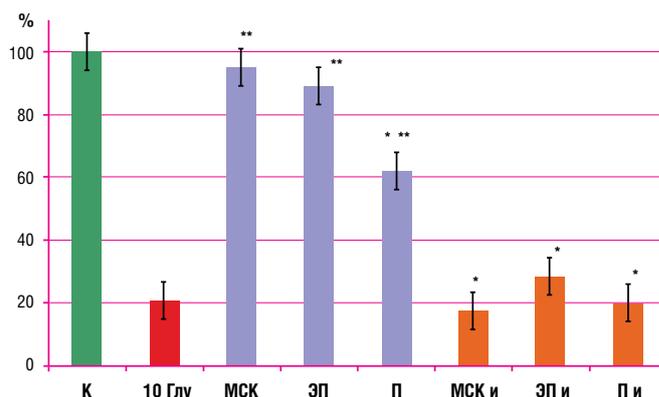
**Статистическая обработка результатов.** Результаты статистически обрабатывали с использованием критерия Манна-Уитни с помощью программного обеспечения Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway). Достоверным считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследовали влияние сред с плацентарными факторами на метаболическую активность НК. После добавления среды, кондиционированной с МСК, показатель МТТ возрастал более чем на 20 %. Среда с 10 % экстракта плаценты увеличивала показатель МТТ на 30 %, а среда, кондиционированная эксплантами плаценты, повышала его более чем на 25 %. В то же время все эти факторы после инактивации нагреванием не изменяли метаболическую активность НК (рис. 1). Такой результат согласуется с литературными данными по исследованию нейропротекторных свойств тканевых факторов [16], где приводится гипотеза о белково-пептидной природе веществ, влияющих на клетки.

На втором этапе исследовали нейропротекторное действие сред, содержащих плацентарные факторы, путем инкубирования с ними НК до воздействия глутамата. Было выяснено, что предварительное воздействие среды с плацентарными МСК или 10 % экстрактом плаценты делает НК практически нечувствительными к глутамату, среда же, кондиционированная с органотипической культурой плаценты, значительно снижает чувствительность НК к глутамату. Те же среды, инактивированные нагреванием, не имеют защитных свойств (рис. 2).

На третьем этапе исследования изучали регенерирующее влияние факторов плацентарного происхождения на культуру НК. Показано, что после воздействия глутамата и последующей регенерации в средах, содержащих плацентарные факторы, метаболическая

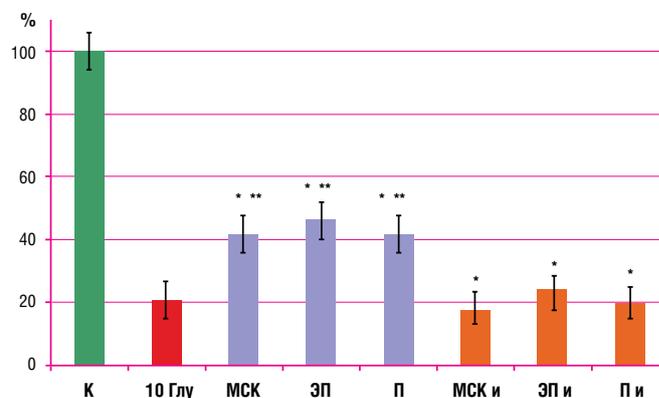


**Рис. 2.** Влияние предварительной инкубации с кондиционной средой с последующим воздействием 10 мМоль глутамата на метаболическую активность нейральных клеток по результатам МТТ-теста. К – контроль, НК без воздействия глутамата. 10 Глу – нейральные клетки после воздействия 10 мМоль глутамата, МСК – нейральные клетки после 10 мМоль глутамата, со средой, кондиционированной МСК, ЭП – нейральные клетки после 10 мМоль глутамата, с добавлением в среду 10 % экстракта плаценты, П – нейральные клетки после 10 мМоль глутамата, со средой, кондиционированной эксплантами плаценты. МСК и, ЭП и, П и – те же среды, инактивированные нагреванием.

Примечание:

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;

\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с 10 Глу.



**Рис. 3.** Влияние кондиционных сред на метаболическую активность нейральных клеток после воздействия 10 мМоль глутамата по результатам МТТ-теста. К – контроль, нейральные клетки без воздействия глутамата. 10 Глу – нейральные клетки после воздействия 10 мМоль глутамата, МСК – нейральные клетки после 10 мМоль глутамата, со средой, кондиционированной МСК, ЭП – нейральные клетки после 10 мМоль глутамата, с добавлением в среду 10 % экстракта плаценты, П – нейральные клетки после 10 мМоль глутамата, со средой, кондиционированной эксплантами плаценты. МСК и, ЭП и, П и – те же среды, инактивированные нагреванием.

Примечание:

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;

\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с 10 Глу.

активность клеток восстанавливается, однако не более чем на 50 % от контрольного значения (рис. 3). При этом среды, инактивированные нагреванием, такого действия не оказывают. Достоверных различий между средами, содержащими экстракт плаценты, и средами, кондиционированными МСК плаценты и эксплантами, не обнаружено.

Таким образом на всех трех этапах эксперимента показано, что факторы плацентарного происхождения повышают метаболическую активность НК по данным МТТ-теста, независимо от их источника: как среды, кондиционированные культурой клеток, либо органотипической культурой плаценты, так и экстракта плаценты. Это подтверждает мнение о паракринном влиянии МСК на нейральные клетки. Результаты исследования согласуются с литературными данными о нейропротекторном действии МСК [3, 5, 7, 8], плацентарных факторов [3, 15, 19], тканевых факторов [16]. Показано, что нейропротекторный эффект достигается гуморальным воздействием непосредственно на НК, а не на целый организм [5, 7, 8, 15, 19].

Термолабильность заставляет предположить, что эффект достигается за счет веществ белково-пептидной природы, а не эстрогенов, что показано рядом исследователей [2, 18]. По данным экспериментов нельзя сказать о преимуществах тех или иных агентов, поскольку для этого требуется подбор концентраций, который может отличаться для культур клеток, в экспериментах на животных и в клинических исследованиях. В то же время профилактическое использование производных плаценты более эффективно, чем их использование после токсического воздействия, что можно расценивать именно как нейропротекторное действие. Целесообразно рассматривать производные плаценты, прежде всего, как профилактическое и нейропротекторное средство в отношении нейральных клеток. На наш взгляд, на следующих этапах исследования перспективным является выявление нейропротекторного действия на разных типах нервных клеток с последующим выявлением действующих веществ и механизмов их влияния.

## ВЫВОДЫ

**Проведенные исследования показали следующее:**

- 1. Среды, кондиционированные с мезенхимальными стволовыми клетками плаценты, эксплантами плаценты или обогащенные экстрактом плаценты, характеризуются нейропротекторной активностью *in vitro*.**
- 2. Нейропротекторный эффект сред, кондиционированных с мезенхимальными стволовыми клетками плаценты, эксплантами плаценты или обогащенных экстрактом плаценты, более выражен при их воздействии на культуру нейральных клеток до воздействия глутамата, чем после глутаматной токсичности.**
- 3. Факторы плацентарного происхождения, характеризующиеся нейропротекторным действием, являются термолабильными.**

## СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Вплив кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на культуру клітин / О. С. Прокопюк, Н. О. Шевченко, В. Ю. Прокопюк, та ін. // Вісник проблем біології і медицини. – 2015 – Вип. 3. – Т. 1, № 122. – С. 160-164.
2. A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice / V. Benedusi, C. Meda, D. T. Sara, et al. // Endocrinology. – 2012. – Vol. 153, № 6. – P. 2777-2788.
3. Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats / J. Chen, A. Shehadah, A. Pal, et al. // Cell Transplant. – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 871-879.
4. Modulation properties of factors released by bone marrow stromal cells on activated microglia: an *in vitro* study / D. Cizkova, S. Devaux, F. Le Marrec-Croq, et al. // Sci Rep. – 2014. – № 4. – doi:10.1038/srep07514
5. Stem cell-based therapies for ischemic stroke: preclinical results and the potential of imaging-assisted evaluation of donor cell fate and mechanisms of brain regeneration / P. Gervois, E. Wolfs, J. Ratajczak, et al. // Med Res Rev. – 2016. – Vol. 36, № 6. – P. 1080-1126.
6. Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells / M. Fukui, J.-H. Song, J. Choi, et al. // European Journal of Pharmacology. – 2009. – Vol. 617, № 1-3. – P. 1-11.
7. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke / O. Honmou, R. Onodera, M. Sasaki, et al. // Trends Mol Med. – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 292-297.
8. Mesenchymal stem cell-based treatments for stroke, neural trauma, and heat stroke / Y. C. Hsuan, C. H. Lin, C. P. Chang, et al. // Brain Behav. – 2016. – Vol. 6, № 10. – P. e00526.
9. Kampo medicine, protects PC12 cells from glutamate induced death by augmenting gene expression of cystine glutamate antiporter system / H. Kanno, Z. Kawakami, K. Mizoguchi, et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 12. – P. e116275.
10. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin / D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh, et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 10. – P. 1-25.
11. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells / D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, et al. // Stem Cell Research & Therapy. – 2017. – Vol. 8. – P. 66.
12. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation / V. Yu. Prokopyuk, O. S. Prokopyuk, I. B. Musatova, et al. // Cell and organ transplantology. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 34-38.
13. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals / N. O. Schevchenko, K. V. Somova, V. V. Volina, et al. // Morphologia. – 2016. – Vol. 10, № 2. – P. 93-98.
14. Sukach A. N. Comparative study on influence of fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural cells / A. N. Sukach, M. V. Shevchenko, T. D. Liashenko // Biopolymers and cell. – 2014. – Vol. 30, № 5. – P. 394-399.
15. Placental extract improves hippocampal neuronal loss and fear memory impairment resulting from chronic restraint stress in ovariectomized mice / K. Takuma, H. Mizoguchi, Y. Funatsu, et al. // J Pharmacol Sci. – 2012. – Vol. 120. – P. 89-97.
16. Human adipose tissue conditioned media from lean subjects is protective against H2O2 induced neurotoxicity in human SH-SY5Y neuronal cells / Z. Wan, D. Mah, S. Simtchouk, et al. // Int J Mol Sci. – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 1221-31.

17. The top 10 causes of death – Режим доступу: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
18. Zhao L. Select estrogens within the complex formulation of conjugated equine estrogens (Premarin®) are protective against neurodegenerative insults: implications for a composition of estrogen therapy to promote neuronal function and prevent Alzheimer's disease / L. Zhao, R. D. Brinton // BMC Neuroscience. – 2006. – Vol. 7. – P. 24.
19. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cell-induced neural stem cells to treat spinal cord injury / L. Zhi, W. Zhao, W. Liu, et al. // Neural Regen Res. – 2014. – Vol. 9, № 24. – P. 2197-2204.



СТАТЬЯ НА САЙТЕ  
[TRANSPLANTOLOGY.ORG](http://TRANSPLANTOLOGY.ORG)

*Авторы подтверждают отсутствие возможных конфликтов интересов.*

*Поступила в редакцию 17.11.2016 г.*

*Принята к печати 27.04.2017 г.*

**ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ.**

*Работа выполнена в рамках НДР № 2.2.6.89 «Исследование геропротекторного и геротерапевтического действия плацентарных биообъектов», НДР № 0113U002955 «Генетическая модификация и долгосрочное хранение стволовых клеток плаценты для клинического использования», НДР «Нейропротективный потенциал криоконсервированных плацентарных МСК, экстракта, сыворотки плацентарной крови при повреждениях спинного мозга».*

**БЛАГОДАРНОСТИ.**

*Авторы благодарят сотрудников Медицинского университета г. Ганновер, Германия (Hannover Medical School, Germany) Dr. T. Mueller, Dr. D. Pogozhykh, Dr. O. Pogozhykh за помощь в проведении исследований (консультации по работе с плацентарными МСК, их характеристики).*