

УДК 611.018.32:57.085.23:576.08

Рибачук О. А.<sup>1,2,3</sup>, Кирик В. М.<sup>3</sup>, Побережний П. А.<sup>3</sup>, Бутенко Г. М.<sup>3</sup>, Скибо Г. Г.<sup>1,2,3</sup>, Півнева Т. А.<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна<sup>2</sup>Державна Ключова Лабораторія молекулярної та клітинної біології, Київ, Україна<sup>3</sup>ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

e-mail: oks-ribachuk@yandex.ru

# ВПЛИВ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА СТАН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ *IN VITRO*

## РЕЗЮМЕ

Використання стовбурових клітин при uszkodженнях нервової системи є актуальним і перспективним напрямком сучасної регенеративної медицини. Останнім часом багато уваги приділяють саме вивченню регенераторних ефектів мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з різних джерел на uszkodжені тканини.

Метою даної роботи було виявити рівень пошкодження тканини гіпокампа на моделі ішемії *in vitro* та дослідити вплив ММСК кісткового мозку при їх безконтактному кокультуванні з пошкодженою ішемією тканиною. Ішемічне пошкодження моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації. Через 24 години кокультування органотипової культури гіпокампа після ішемічного пошкодження з ММСК кісткового мозку було показано зменшення кількості мертвих клітин та зниження активації гліальних клітин гіпокампа. В органотипових зрізах гіпокампа після моделювання ішемічного пошкодження головного мозку та кокультування з ММСК зберігались цитоархітектоніка та типоспецифічність клітин, характерних нервовій тканині.

Отримані нами дані вказують на нейропротекторний вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на нервову тканину після моделювання ішемічного пошкодження в умовах безконтактного співкультування.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, органотипова культура гіпокампа, киснево-глюкозна депривація, кокультування клітин, імуногістохімічне фарбування.

Ішемічні ураження головного мозку являють третю за поширеністю причину смертності у розвинених країнах і можуть бути наслідком як фокальних порушень кровообігу, так і транзиторної ішемії всього мозку, викликаной тимчасовим припиненням функції серця. Ішемічне ураження мозку – ішемічний інсульт або інфаркт мозку – є наслідком перекриття судин мікротромбами, утвореними при відриві атеросклеротичних бляшок. Було з'ясовано, що пошкодження тканини мозку, викликане ішемією, є наслідком низки взаємопов'язаних процесів, які мають розвиток у часі та просторі [1]. Розробка ефективних методів лікування цієї патології вимагає вивчення молекулярних і клітинних процесів, зумовлених порушенням мозкового кровотоку. Переважно на початкових стадіях розвитку вони значною мірою

пов'язані зі змінами біофізичних характеристик механізмів, що забезпечують інтегративну функцію нервових клітин: синаптичної передачі та функціонування іонних каналів, зокрема тих, що відповідають за електричну збудливість [1, 2]. Саме ці механізми відіграють важливу роль як і у природних, так і при штучних нейропротекторних впливах.

Існує багато методів лікування інсульту, але вони не є досконалими. На сьогодні велику увагу приділяють клітинній терапії. Зокрема, з кінця ХХ століття реалізується міжнародна програма з вивчення потенціалу стовбурових клітин, у тому числі і кістково-мозкового походження, що може призвести до значного прогресу у лікуванні нейродегенеративних захворювань [3-5].

Відомо, що мультіпотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) – це популяція клітин з високою адгезивною здатністю в умовах *in vitro*. Їм властиві значна проліферативна активність та збереження свого стовбурового стану. Вони також можуть диференціюватися у хондроцити, остеоцити, адипоцити та давати початок клітинам інших типів при створенні умов для індукції певного конкретного шляху диференціації [6, 7, 8].

Найбільш розповсюдженими є методи виділення ММСК з таких джерел, як кістковий мозок, жирова тканина, вартонів гель, плацента, кордова вена, амніотична рідина, амніотична оболонка, синовіальна рідина, скелетні м'язи, печінка та навіть кордова і периферична кров [9]. Потрібно відмітити, що субпопуляції ММСК зазвичай є гетерогенними за ступенем самовідтворення та потенціалом до диференціації [8, 9].

За допомогою методу проточної цитометрії з використанням великої кількості поверхневих маркерів було продемонстровано, що культивована популяція ММСК кісткового мозку людини є гомогенною більш ніж на 98%, і за певних умов *in vitro* дані клітини легко диференціюються. Кокультивування ММСК з гемопоетичними стовбуровими клітинами (ГСК) показало, що ММСК можуть підтримувати життєздатність або навіть процес поділу ГСК, при цьому ММСК формують функціональну строму [10]. У культурі стромальних прогеніторних клітин та ГСК ММСК слугують фідером для виживання усіх клонів гемопоетичних клітин. Крім цього, ММСК можуть синтезувати цитокіни для підтримки життєздатності гемопоетичних одиниць.

Вивченню властивостей ММСК приділяють велику увагу в усьому світі, проводячи як фундаментальні, так і клінічні дослідження. Така зацікавленість зумовлена багатьма чинниками, серед яких відносна простота культивування, існування або можливість виявлення специфічних маркерів, наявність імуносупресорної дії при використанні алогенного матеріалу тощо. Унікальний потенціал ММСК уже почали використовувати в клініці для відновлення функціонування багатьох пошкоджених органів [11].

Цікавим в аспекті формування тканинних ніш є взаємодія стовбурових клітин різного генезу між собою та з диференційованими клітинами мікрооточення. Саме така взаємодія визначає самопідтримку прогеніторних клітин і/або напрямку їх подальшої диференціації. Проте механізми й особливості такої міжклітинної взаємодії в умовах зміненого вмісту кисню залишаються не до кінця зрозумілими. На моделі кокультивування гемопоетичних і стромальних прогеніторних клітин було показано, що в умовах зниженого вмісту кисню ММСК *in vitro* активно підтримують гемопоез і підсилюють утворення осередків кровотворення з наступною диференціацією гемопоетичних попередників. При цьому збільшується частина стромальних клітин, в яких експресується молекула адгезії *VCAM-1* і активується синтез інтерлейкінів (*IL-6*, *IL-8*). У дослідженнях *in vitro* виявлялося, що ММСК мають унікальні імунотулюючі властивості, зумовлені їх низькою імуногенністю і здатністю до пригнічення проліферації та активації лімфоцитів. При кокультивуванні лімфоцитів та ММСК відбувалася зміна популяційного складу імунотулюючих клітин за рахунок зменшення частки ембріональних клітин, збільшення частки *CD34+*-клітин, а також супресії активації *T*-клітин. Зниження вмісту кисню додатково пригнічує здатність *T*-клітин до презентації антигенів *HLA-DR* [12]. ММСК володіють імуносупресивною дією і тому при алогенній трансплантації можуть забезпечувати толерогенний ефект. У системі *in vitro* ММСК перешкоджають дозріванню дендритних клітин, блокують проліферацію *T*-лімфоцитів, інгібують хемотаксис і диференціацію *B*-лімфоцитів та індують розмноження регуляторних *T*-клітин [13]. Аналіз подібних даних вказує на те, що в клітинній взаємодії ММСК та імунотулюючих клітин різних субпопуляцій беруть участь механізми як контактної, так і опосередкованого взаємодію. Динамічні зміни рівнів цитокінів, факторів росту і кисню створюють унікальні ніші в умовах такої взаємодії [12].

При кокультивуванні ММСК трансгенних мишей з клітинами середнього мозку плодів мишей виявляли більшу кількість ММСК

із маркерами нейронів (*NeuN*) та астроглії (*GFAP*). Результати таких експериментів підтвердили гіпотезу про те, що прямий контакт між клітинами (на додачу до передачі сигналів трофічними факторами і цитокінами) має велике значення при диференціюванні ММСК. Крім ретиноєвої кислоти в якості фактора диференціювання ММСК у нейроноподібні клітини використовують диметилсульфоксид, гідроксианізол-бутилат, гідрокситолуол-бутилат та  $\beta$ -меркаптоетанол у безсироватковому середовищі. Застосовують й інші способи індукції нейродиференціювання *in vitro*. Наприклад, це використання 5-азацитину – деметилуючої речовини, здатної змінювати експресію генів – у середовищі, що містить у собі суміш фактора росту нервів (*NGF*), мозкового фактора росту нервів (*BDNF*) та нейротрофіну (*NTF*). Також досліджували дію нейронного індуктора *noggin* – агента, здатного до дифузії, що опосередковує нейронну індукцію на ранніх етапах ембріогенезу та нейрогенезу у дорослих. Отримані дані вказують на те, що нейрони утворювали відростки, в них виявлялися специфічні маркери і «нейронні» гени; клітини починали реагувати на дію деполаризуючих стимулів як функціонально зрілі нейрони [14].

Тому регенераторні властивості ММСК при ішемічному пошкодженні головного мозку можна розглядати як один з дієвих методів відновлення морфологічного та функціонального стану пошкодженої тканини.

Отже, метою даної роботи було виявити рівень пошкодження клітин тканини гіпокампа на моделі ішемії *in vitro* та дослідити вплив мультіпотентних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (ММСК-КМ) при їх кокультивуванні з пошкодженою ішемією тканиною.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі роботи з експериментальними тваринами проводились з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки [15].

### Отримання органотипової культури тканини гіпокампа

Для отримання зрізів гіпокампа використовували мишей лінії *FVB* дикого типу віком 8-9 діб. Тварин декапітували та виділяли мозок з черепної коробки. Виділення та культивування зрізів гіпокампа проводили за методом *L. Stoppini*: гіпокампи виділяли з мозку в охолоджену середовищу (50% *MEM*, 5 мМ *Tris*, 12,5 мМ *HEPES*, 25% 10-кратного сольового розчину *HBSS*, pH = 7,3) [16]. Потім за допомогою автоматичного чопперу (*McIlwain*, Великобританія) нарізали зрізи перпендикулярно до поздовжньої осі гіпокампа товщиною 350-375 мкм та культивували протягом 5-7 днів. Культивування зрізів проводили на напівпроникних мембранах, розміщених на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5%  $CO_2$ ) та рідкого середовища (50% *MEM*, 25% збалансованого сольового розчину *Хенкса*, 15 мМ *D*-глюкози, 25% інактивованої кінської сироватки, pH = 7,2) при +37 °C. Середовище культивування змінювали на другий день інкубації, а далі двічі або тричі на тиждень. Протягом 5-7 діб культивування зрізи гіпокампа повністю очищувалися від клітин, пошкоджених під час виділення, та досягали стабільного стану. Протягом цього часу зрізи розпластувалися, їх товщина зменшувалася з 300-400 мкм до 200-250 мкм.

Для виявлення пошкоджених клітин використовували метод забарвлення культивованих зрізів пропідіум йодидом (*PI*) – стійким флуоресцентним барвником, який проникає в клітини з пошкодженою мембраною, зв'язується з молекулою ДНК та набуває червоної флуоресценції. *PI* в концентрації 2 мкл/мл додавали в середовище культивування до проведення киснево-глюкозної депривації. Культури аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопу

XSP-139A-TP. Для експерименту відбирали зрізи, де практично не було виявлено забарвлення PI.

**Модельовання ішемічного пошкодження гіпокампа in vitro**

Киснево-глюкозну депривацію (КГД) створювали шляхом утримання зрізів у спеціальній камері, в якій кисень повітря був замінений на азот, а в середовищі культивування глюкоза була замінена на сахарозу. Тривалість КГД становила 10 хвилин. Надалі зрізи повертали до нормальних умов культивування на 2 години – нормоксична реоксигенація.

**Виділення та культивування ММСК-КМ**

Клітини кісткового мозку отримували від FVB-мишей віком 3 місяці шляхом вимивання з стегнових кісток середовищем RPMI-1640 (Sigma, США) в стерильних умовах. Висівали по  $4 \cdot 10^5$  клітин/см<sup>2</sup> та культивували протягом 2 тижнів, змінюючи поживне середовище кожні 2-3 дні. Культивування проводили в CO<sub>2</sub>-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5% CO<sub>2</sub> при температурі +37 °C [17]. Поживне середовище RPMI-1640:DMEM (1:1) містило 15% фетальної телячої сироватки (Sigma, США) та 2 mM L-глутаміну.

Перший пасаж проводили при 80% конфлуентності моношару, знімаючи клітини за допомогою 0,05% розчину трипсину, та пересаджували їх в нові флакон зі щільністю  $2 \cdot 10^4$  клітин на 1 см<sup>2</sup>. ММСК-КМ на другий пасаж висаджували в 6-лункові планшети по  $1,5 \cdot 10^5$  в кожную лунку та культивували протягом семи діб.

**Фенотипування культур клітин ММСК-КМ**

Фенотипування культур клітин за маркерами CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 проводили з використанням моноклональних антитіл до мембранних антигенів миші, мічених флуорохромами, згідно з рекомендаціями фірми-виробника (Becton Dickinson, США). До  $2 \cdot 10^5$  клітин в 50 мкл суспензії додавали моноклональні антитіла з розрахунку 0,5 мкг/10<sup>6</sup> клітин та інкубували протягом 20 хвилин при температурі +4 °C. Після інкубування клітини двічі відмивали в буфері CellWash (Becton Dickinson, США) та проводили вимірювання на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми BD FACSDiva 6.1.2.

Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному аналізі використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією кількох антитіл без одного з них (fluorescence minus one control). Рівень експресії поверхневих маркерів вимірювали у відсотках та статистично обраховували з використанням U-критерія Мауна-Уїтні.

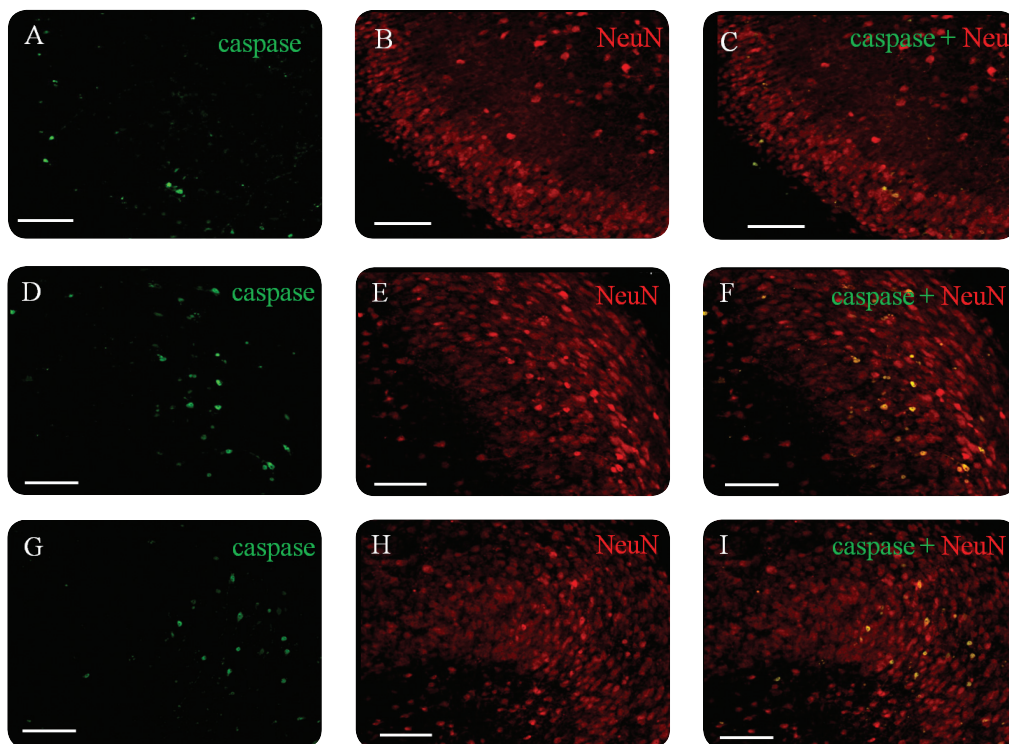
Відсоток загиблих та життєздатних ММСК-КМ в суспензії визначали на лазерному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-AAD. Відсоток життєздатних клітин в культурі становив  $93,6 \pm 0,5\%$ .

Отримана культура клітин за фенотипом та здатністю до направлено мультилінійного диференціювання відповідала мінімальним критеріям ММСК [18, 19].

**Кокультивування ММСК-КМ з пошкодженою ішемією нервовою тканиною та її подальша імуногістохімічна оцінка**

Культивовані на напівпроникній мембрані зрізи гіпокампа після короткотривалої КГД поміщали в 6-лункові планшети, де попередньо (7 діб) культивувались ММСК-КМ. Середовище культивування ММСК-КМ було повністю замінено перед початком кокультивування. Через 24 години після кокультивування органотипові зрізи гіпокампа фіксували та в подальшому проводили імуногістохімічний аналіз.

Для ідентифікації нейронів та клітин глії використовували подвійне імуногістохімічне забарвлення курячими поліклональними антитілами до маркера астроцитів GFAP, титр 1:1500 (Dako, Данія); мишачими моноклональними до маркера нейронів NeuN, титр 1:1000 (Chemicon, Великобританія); кролячими поліклональними до маркера клітин мікроглії Iba-1, титр 1:750 (Molecular Probes Inc., США); кролячими поліклональними до маркера апоптотичних ядер caspase-3, титр 1:200 (Molecular Probes Inc., США). Органотипові культури гіпокампа фіксували 4% розчином формальдегіду, відмивали 0,1 М фосфатним буфером (ФБ), обробляли блокуючим розчином (0,3% Triton X-100, 0,5% сироваткового альбуміну корів – BSA на 0,1 М ФБ) для кращого проникнення антитіл та запобігання зайвого неспецифічного зв'язування. Протягом 24 годин культури гіпокампа інкубували у суміші первинних антитіл. Після відмивання у 0,1 М ФБ



**Рис. 1.** Мікροфотографії імуногістохімічного фарбування культивованих зрізів гіпокампа, CA1 зона. **A-C** – Контроль. **D-F** – 24 години після КГД. **G-I** – 24 години після КГД + ММСК-КМ. Подвійне імуногістохімічне фарбування на caspase-3-позитивні ядра нервових клітин (зелений колір) та NeuN-позитивні ядра нейронів (червоний колір). Масштабна лінійка – 50 мкм.

зрізи обробляли протягом 1 год сумішшю вторинних антимишачих *Alexa Fluor 555*-кон'югованих (титр 1:1000, *Invitrogen*, США), антикроячих *Alexa Fluor 488*-кон'югованих та антикурячих *Alexa Fluor 647*-кон'югованих антитіл (титр 1:1000, *Invitrogen*, США).

Після відмивання 0,1М ФБ культури фіксували покривним склом у спеціальному середовищі для флуоресцентних препаратів (*Dako*, Данія). Зрізи гіпокампа вивчали за допомогою конфокального мікроскопа *FluoView™ FV1000* (*Olympus Inc.*, Японія) з цифровою фотокамерою, поєднаною з комп'ютером.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одним із прогресивних дослідницьких методів, які застосовуються в клітинній та молекулярній біології, є культивування клітин і тканин. Системи *in vitro* є зручним експериментальним інструментом для точного контролю, тонких маніпуляцій і тривалого моніторингу нормальних і патологічних процесів, що мають місце у різних тканинах і, зокрема, в нервовій тканині.

Тому об'єктом наших досліджень ми обрали органотипову культуру гіпокампа. Гіпокамп – це структура головного мозку, відповідальна за навчання, пам'ять та просторову орієнтацію і поряд з корою головного мозку та стріатумом є надзвичайно чутливою до пошкоджуючих впливів, зокрема до нестачі кисню та глюкози [20-22]. Відомо, що гіпокамп є однією з найчутливіших частин головного мозку під час ішемічного пошкодження з вибірковою шкодою пірамідних нейронів в *str. pyramidale CA1* зони [23-24]. Також показано, що глія бере активну участь у контролі нейронної активності та синаптичної передачі в нормі та при різних патологічних станах [25].

Мікроскопічний аналіз органотипової культури гіпокампа у контрольних зразках без КГД показав, що в тканині гіпокампа зберігається типова топографія клітинних шарів і зон, які характерні для гіпокампа у природних умовах, а саме нейрони зони *CA1* розташовуються в середині зрізу (4-8 шарів пірамідних клітин) та мають традиційну пірамідну форму (рис. 1). Клітини глії рівномірно локалізуються у всіх шарах *CA1* зони гіпокампа; до поверхні напівпроникної мембрани прилягає шар гліальних клітин з тонкими відростками,

які забезпечують фіксацію культивованих зрізів на мембрані, виконують трофічну та захисну функції. В органотиповій культурі гіпокампа зберігаються всі типи клітин, які зустрічаються в гіпокампі в природних умовах – пірамідні та гранулярні нейрони, інтернейрони та гліальні клітини (астроцити, мікроглія, олігодендроцити) [26, 27].

Таким чином, в даній органотиповій культурі нервової тканини *in vitro* тривалий час протягом періоду культивування зберігається цитоархітектоніка, типоспецифічність клітин, міжклітинні зв'язки та інші особливості, характерні для живої тканини, і, в той же час вона є набагато зручнішою для експериментальних маніпуляцій, ніж моделі *in vivo* [28].

Після експериментальної киснево-глюкозної депривації в органотиповій культурі гіпокампа мишей спостерігали ушкодження пірамідних нейронів зони *CA1* гіпокампа разом із активацією гліальних клітин (рис. 1, 2). Уже в перші години після моделювання ішемічного пошкодження в *CA1* зоні гіпокампа спостерігали підвищення імунореактивності гліальних клітин та структурну реорганізацію нейронів.

На зрізах органотипової культури гіпокампа можна побачити, що непошкоджені нейрони, які вижили, розташовуються нерівномірно та втрачають компактність їх розташування (рис. 1). Між нейронами спостерігали появу пустот та збільшення міжклітинного простору. Поява багаточисленних пустот в *str. pyramidale* та реструктуризація компактного розташування пірамідних нейронів безпосередньо пов'язана із загибеллю вищевказаних нейронів (рис. 1). При подвійному імуногістохімічному фарбуванні маркерами *caspase-3* і *NeuN* було виявлено, що при ішемічному пошкодженні значно збільшується кількість *caspase-3*-позитивних ядер нейронів. Отримані результати вказують на те, що частина нейронів гине за апоптотичним механізмом. Відомо, що механізм загибелі пірамідних нейронів *CA1* зони при ішемії відбувається як за некротичним, так і за апоптотичним фенотипом [29, 30].

Також уже через 24 години після КГД спостерігали процес реактивного гліозу (рис. 2). Мікрогліальні клітини трансформувались зі стану спокою, на що вказує добре розгалужена сітка відростків, які відходять від соми невеликого розміру, в амебоїдну форму. Відростки таких клітин вкорочувались та потовщувались, а розмір соми значно збільшувався. У клітин астроцитарного фенотипу спостерігали

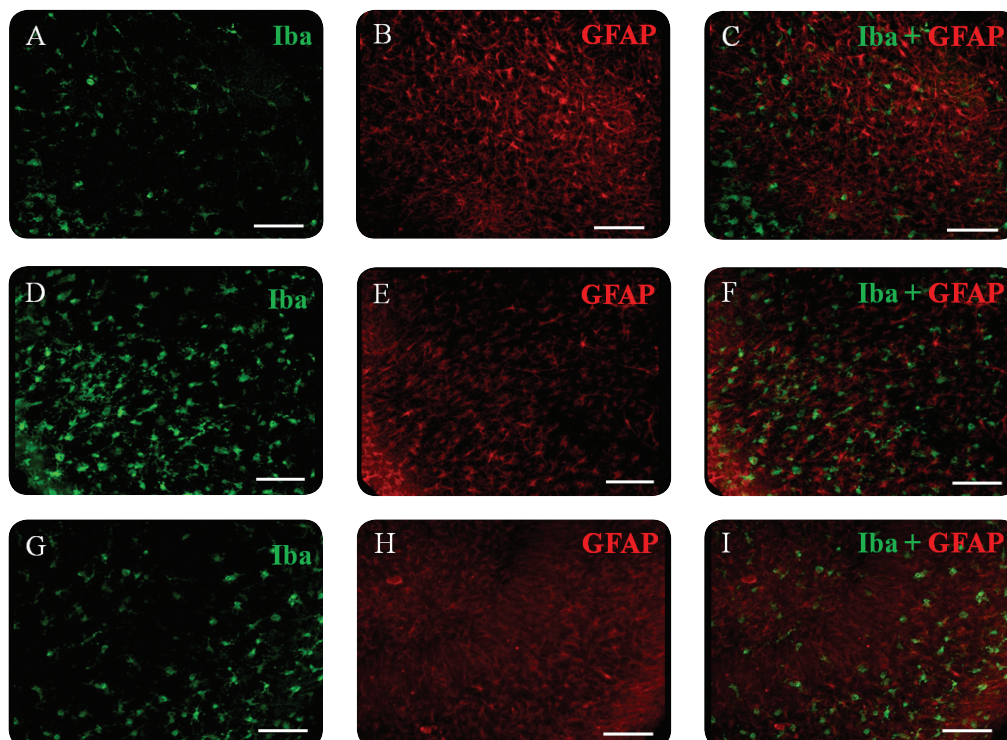


Рис. 2. Мікροфотографії імуногістохімічного фарбування культивованих зрізів гіпокампа, *CA1* зона. А-С – Контроль. D-F – 24 години після КГД. G-I – 24 години після КГД + ММСК-КМ. Подвійне імуногістохімічне фарбування на *Iba1* – мікроглія (зелений колір) та *GFAP* – астроглія (червоний колір). Масштабна лінійка – 50 мкм.

гіпертрофію соми та відростків. Відмічені зміни в структурі гліальних клітин є показником піку реактивного астрогліозу [31, 32].

Імуногістохімічний аналіз через 24 години кокультування ММСК-КМ з ОКГ після ішемічного пошкодження показав значне зменшення кількості caspase-3-позитивних ядер нервових клітин у порівнянні з такими при ішемічному пошкодженні, але без кокультування з ММСК-КМ, та зменшення рівня активації гліальних клітин гіпокампа (рис. 1, 2). Необхідно підкреслити, що після кокультування зрізів гіпокампа після КГД з ММСК-КМ зберігалась цитоархітектоніка та типоспецифічність клітин нервової тканини: нейрони щільно та компактно розташовувались, а також зменшився міжклітинний простір.

Показано, що ММСК-КМ при кокультуванні з пошкодженою ішемією нервовою тканиною значно покращують морфологічний стан останньої. Таким чином, мультипотентні мезенхімальні стро-

мальні клітини кісткового мозку на нашій моделі проявили нейропротекторні властивості. Точний механізм дії ММСК-КМ на ішемізований мозок поки що невідомий. Але ми припускаємо, що таке покращення морфофункціонального стану ішемізованої тканини відбувається саме завдяки активації синаптогенезу, нейрогенезу або нейропротекції за рахунок ростових факторів, про що зазначають ряд авторів [12, 33-35].

Таким чином, виходячи з літературних даних та отриманих нами результатів, використання стовбурових клітин у лікуванні наслідків ішемічного пошкодження головного мозку може зайняти одну з провідних позицій. На даний час цей напрямок клітинної трансплантології знаходиться на етапі всебічного експериментального вивчення. Можливо, що отримані позитивні результати в експерименті будуть підтверджені і в клінічних дослідженнях ефективності цього методу лікування наслідків ішемічного пошкодження головного мозку.

## ВИСНОВКИ

ЗА УМОВ КОРОТКОТРИВАЛОЇ КГД У ОРГАНОТИПОВІЙ КУЛЬТУРІ ГІПОКАМПА ЗМЕНШУЄТЬСЯ КІЛЬКІСТЬ НЕЙРОНІВ ТА СПОСТЕРІГАЄТЬСЯ АКТИВАЦІЯ АСТРОГЛІАЛЬНИХ ТА МІКРОГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН.

ПРИ КОКУЛЬТИВУВАННІ ММСК-КМ З ПОШКОДЖЕНОЮ ІШЕМІЄЮ НЕРВОВОЮ ТКАНИНОЮ ЗНАЧНО ПОКРАЩУЄТЬСЯ МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ОСТАННЬОЇ ТА ПРОЯВЛЯЄТЬСЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНА ДІЯ ММСК-КМ.

АНАЛІЗУЮЧИ ОТРИМАНІ НАМИ ДАНІ, А ТАКОЖ ДАНІ ЛІТЕРАТУРИ, МОЖНА ПРИПУСТИТИ, ЩО ПОКРАЩЕННЯ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ІШЕМІЗОВАНОЇ ТКАНИНИ ВІДБУВАЄТЬСЯ САМЕ ЗАВДЯКИ АКТИВАЦІЇ СИНАПТОГЕНЕЗУ, НЕЙРОГЕНЕЗУ АБО НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ЗА РАХУНОК РОСТОВИХ ФАКТОРІВ.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Dirnagl U. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view [Text] / U. Dirnagl, C. Iadecola, M. Moskowitz // Trends Neurosci. – 1999. – Vol. 22. – P. 391-397.
2. Kristian T. Changes in ionic fluxes during cerebral ischemia [Text] / T. Kristian, B. Siesjo // Int. Rev. Neurobiol. – 1997. – Vol. 40. – P. 27-45.
3. Dunnett S.B. Clinical translation of cell transplantation in the brain [Text] / S.B. Dunnett // Curr Opin Organ Transplant. – 2011. – Vol. 16, № 6. – P. 632-639.
4. Miller R.H. Translating stem cell therapies to the clinic [Text] / R.H. Miller, L. Bai // Neurosci Lett. – 2012. – Vol. 519, № 2. – P. 87-92.
5. Mizusawa H. Brain ischemia – regenerative therapy using human neural stem cells [Text] / H. Mizusawa // Rinsho Shinkeigaku. – 2003. – Vol. 43, № 11. – P. 832-833.
6. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! [Text] / M. Secco, E. Zucconi, N.M. Vieira et al. // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, № 2. – P. 146-150.
7. Silva L. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells [Text] / L. Silva, M. Arnold // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, № 3. – P. 2287-2299.
8. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord [Text] / C. Qiao, W. Xu, W. Zhu et al. // Cell Biol. Int. – 2008. – Vol. 32, № 1. – P. 8-15.
9. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. [Text] / H.S. Wang, S.C. Hung, S.T. Peng et al. // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22, № 7. – P. 1330-1337.
10. Петренко А.Ю. Трансплантация стволовых клеток – терапия XXI века. Характеристика и свойства стволовых клеток [Текст] / А.Ю. Петренко, В.И. Грищенко // Пробл. Кробиологии. – 2001. – Вып. 16, № 2. – С. 3-12.
11. Зозуля Ю.А. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток [Текст] / Ю.А. Зозуля, Н.И. Лисяний // Киев, Экспресс Полиграф, 2005. – 364 с.
12. Зубов Д.О. Остеоимунитет та культивовані мезенхімальні стовбурові клітини [Текст] / Д.О. Зубов, В.М. Оксимець // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. – 2008. – Вып. 8. – P. 324-331.
13. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells [Text] / J.M. Gimble, F. Guilak, M.E. Nuttall, et al. // Transfus. Med. Hemother. – 2008. – Vol. 35, № 3. – P. 228-238.
14. Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка (от фундаментальной биологии к медицине) [Текст] / В.С. Репин // Успехи физиол. наук. – 2001. – Vol. 32, № 1. – P. 3-19.
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 1986. – P. 48.
16. Stoppini L. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue [Text] / L. Stoppini, P.A. Buchs, D. Muller // Journal of Neuroscience Methods. – 1997. – Vol. 37, № 2. – P. 173-182.
17. Harting M.T. Isolation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Green Fluorescent Protein Positive (GFP+) Transgenic Rodents: The Grass Is Not Always Green(er) [Text] / M.T. Harting, F. Jimenez, C.S. Cox // Stem cells and development. – 2009. – Vol. 18, № 1. – P. 127-135.
18. Ooi Y.Y. Mouse bone marrow mesenchymal stem cells acquire CD45CD106+ immunophenotype only at later passages [Text] / Y.Y. Ooi, R. Ramasamy, S. Vidyadaran // Med J Malaysia. – 2008. – P. Vol. 63(suppl A). – P. 65-66.
19. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement [Text] / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315-317.
20. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies [Text] / N. Daviaud, E. Garbayo, P.C. Schiller et al. // Exp Neurol. – 2013. – Vol. 248. – P. 429-440.

21. *Виноградова О.С.* Гиппокамп и память [Текст] / *О.С. Виноградова* // Москва, Наука, 1975. – 267 с.
22. *Гамбарян Л.С.* Гиппокамп. Физиология и морфология [Текст] / *Л.С. Гамбарян, И.Н. Коваль* // Ереван, Академия наук Армянской ССР, 1973. – 104 с.
23. Deferoxamine, allopurinol and oxypurinol are not neuroprotective after oxygen/glucose deprivation in an organotypic hippocampal model, lacking functional endothelial cells [Text] / *C. Peeters, D. Hoelen, F. Groenendaal et al.* // *Brain Res.* – 2003. – **Vol. 963, № 12.** – P. 72-80.
24. Kirino T. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia [Text] / *T. Kirino, K. Sano* // *Acta Neuropathol.* – 1984. – **Vol. 62.** – P. 201-208.
25. Winkelmann E.R. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion [Text] / *E.R. Winkelmann, A. Charcansky, M.C. FaccioniHeuser* // *Anat. Embryol. (Berl).* 2006. – **Vol. 211, № 5.** – P. 423-434.
26. Kettenmann H. Neuroglia [Text] / *H. Kettenmann, B.R. Ransom.* – 2nd ed. – Oxford. – University Press, 2005. – 601 p.
27. *Bahr B.A.* Longterm hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes [Text] / *B.A. Bahr* // *J. Neurosci. Research.* – 1995. – **Vol. 42, №3.** – P. 294-305.
28. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence [Text] / *J. Laake, F.M. Haug, T. Wieloch et al.* // *Brain Research Protocols.* – 1999. – **Vol. 4, № 2.** – P. 173-184.
29. Yuan J. Apoptosis in the nervous system [Text] / *J. Yuan, B.Y. Yankner* // *Nature.* – 2000. – **Vol. 407.** – P. 802-809.
30. Zeng Y.S. Coexistence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia [Text] / *Y.S. Zeng, Z.C. Xu* // *Neurosci Res.* – 2000. – **Vol. 37.** – P. 113-125.
31. Objectbased analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury [Text] / *D. Wagner, J. Scheibe, I. Glocke et al.* // *Acta Neurobiol Exp (Wars).* – 2013. – **Vol. 73, № 1.** – P. 79-87.
32. *Sukumari Ramesh S.* Astrocytespecific expression of survivin after intracerebral hemorrhage in mice: a possible role in reactive gliosis? [Text] / *S. Sukumari Ramesh, C.H. Alleyne Jr, K.M. Dhandapani* [Text] / *J. Neurotrauma.* – 2012. – **Vol. 29, № 18.** – P. 2798-804.
33. *Kokaia Z.* Neurogenesis after ischaemic brain insults [Text] / *Z. Kokaia, O. Lindvall* // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2003. – **Vol. 13, № 1.** – P. 127-132.
34. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors [Text] / *H. Nakatomi, T. Kuriu, S. Okabe et al.* // *Cell.* – 2002. – **Vol. 110, № 4.** – P. 429-441.
35. Cell transplantation for stroke [Text] / *S.I. Savitz, D.M. Rosenbaum, J.H. Dinsmore* // *Ann Neurol.* – 2002. – **Vol. 52, № 3.** – P. 266-275.

**Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.**

Стаття надійшла до редакції 04.02.2014 р.

Прийнята до друку 03.03.2014 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування.



**СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG**