

## НЕЙРОРЕГЕНЕРАТИВНІ «BYSTANDER»-ЕФЕКТИ КОНДИЦІЙОВАНОГО СЕРЕДОВИЩА ФІБРОБЛАСТОПОДІБНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ *IN VITRO*

Є.Г. ПЕДАЧЕНКО<sup>1</sup>, Л.Д. ЛЮБИЧ<sup>1\*</sup>, Л.П. СТАЙНО<sup>1</sup>, Д.М. ЄГОРОВА<sup>1</sup>, Т.Д. СКАТЕРНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

<sup>2</sup> Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

E-mail: lyubichld@gmail.com

Перспективним напрямком у розробці новітніх технологій для лікування захворювань центральної нервової системи є використання різних типів стовбурових клітин, зокрема, мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин (ММСК) та нейрогенних стовбурових/прогеніторних клітин (НСК/НПК). Альтернативою безпосередньої трансплантації клітин може стати використання їх кондіційованих середовищ (КС) як джерела секретому і ключового компоненту механізму реалізації їх потенціалу. В даний час у клінічних дослідженнях із застосуванням клітинної терапії при патології ЦНС найчастіше як джерела отримання ММСК або мононуклеарних клітин стромально-васкулярної фракції використовують жирову тканину, кістковий мозок, пуповину та пуповинну кров, а як джерело НСК/НПК – лінії імуорталізованих нейрогенних клітин, виділених зі структур головного або спинного мозку зародка людини. В умовах експерименту, зокрема у гризунів, одним із найбільш доступних джерел алогенних прогеніторних клітин мезенхімального типу є жирова тканина, а фетальний мозок є джерелом нейрогенних клітин. Мета роботи – дослідження нейрорегенеративного впливу КС фібробластоподібних клітин жирової тканини (ФПК ЖТ) та КС фетальних нейрогенних клітин (НК) щура *in vitro*. КС від 24-год культур ФПК ЖТ та фетальних НК (E14) щура досліджували за допомогою електрофорезу у 10%-вому поліакриламідному гелі. У 5–7-добових 2D-культурах нервових клітин щура (E14) проводили «scratch-тест» та додавали живильне середовище ДМЕМ з 10 % фетальної телячої сироватки (стандартні культуральні умови, контроль) або 0,10 мг/мл (за кількістю протеїнів) КС ФПК ЖТ чи КС НК. Упродовж 4-добового культивування проводили мікроскопічні та морфометричні дослідження. Після механічного перерізу у культурі нервових клітин за стандартних умов з 1-ї по 3-ю добу відбувались процеси ендогенної регенерації, які зменшувались до 4-ї доби. Додавання КС ФПК ЖТ і КС НК сприяло значущому посиленню ступеня і

тривалості процесів ендогенної регенерації у культурі нервових клітин. За впливу КС ФПК ЖТ у ділянці перерізу до 4-ї доби зростала кількість мігруючих клітин (у 7 разів), щільність відростків клітин (у 12,5 рази); за впливу КС НК – зростала кількість мігруючих клітин (у 3,5 рази), дистанція міграції клітин (у 1,4 рази), щільність відростків клітин (у 13 разів). Довжина зарощеної ділянки перерізу збільшувалась після впливу КС ФПК ЖТ у 1,7 рази, КС НК – утричі, досягаючи відповідно 23,7 та 43,5 % всієї довжини ділянки перерізу. У КС ФПК ЖТ виявлено 10 протеїнових фракцій: превалюючі 12, 15, 23, 30, 80 кДа та мінорні – 28, 35, 55, 65, 75 кДа; у КС НК – 9 фракцій: превалюючі 15, 23, 30, 35 кДа та мінорні – 37, 40, 46, 67, 80 кДа. КС від 24-год культур ФПК ЖТ щура та НК щура (E14) стимулюють процеси ендогенної регенерації в культурі нервових клітин головного мозку щура з механічним перерізом моношару. Чинниками нейрорегенеративних «bystander»-ефектів ФПК ЖТ та НК щура є секретовані біологічно активні протеїни – складові превалюючих та мінорних протеїнових фракцій КС.

**Ключові слова:** кондіційоване середовище, фібробластоподібні клітини жирової тканини, нейрогенні клітини, «scratch-тест», електрофорез, протеїнові фракції.

**Вступ.** Перспективним напрямком у розробці новітніх технологій для лікування захворювань центральної нервової системи (ЦНС) є використання стовбурових/прогеніторних клітин (СК/ПК) як стратегії відновлення та регенерації ушкодженого мозку. Нейрогенні СК/ПК (НСК/НПК) містяться у відповідних зонах («нішах») ЦНС дорослих ссавців (Ludwig, 2018) і здатні залучатися до регенеративних та репараційних процесів, забезпечуючи постійну природну компенсацію клітин нервової тканини, що втрачаються впродовж життя або при патологічних станах. Існують підтвердження внеску новоутворених нейронів у структури пошкодженого мозку за умов ішемії,

черепно-мозкової травми, нейродегенерації, психічних розладів, а також зв'язків нейрогенезу з когнітивними реакціями (Gomazkov, 2013). Проте можливості структурно-функціонального відновлення ЦНС за рахунок ендogenous нейрогенезу обмежені (Korach&Pivneva, 2018). Так, при ішемії НСК/НПК проліферують і мігрують до ішемічного вогнища (Lee et al, 2011), упродовж кількох тижнів 30-кратно примножують кількість нових нейронів, але замінюють лише 0,2 % загіблених клітин (Вaо et al, 2011), оскільки більшість НСК та новоутворених нейронів піддаються апоптозу, не досягають термінального диференціювання і не формують функціональні зв'язки.

Припускають можливість стимуляції утворення нервових клітин *de novo* у дорослому організмі і керування мультипотентними попередниками *in situ* для заміни втрачених або пошкоджених нейронів (Dobrowolski&Lepski, 2013). Обговорюються способи посилення нейрогенезу при патології ЦНС шляхом призначення екзогенних трофічних факторів та трансплантації різних типів СК/ПК, серед яких перевагу надають мезенхімальним мультипотентним стромальним клітинам (ММСК), порівняно з НСК/НПК (Ludwig, 2018; Qu&Sheng, 2018). Так, за даними Національних інститутів здоров'я США ([www.Clinicaltrials.gov](http://www.Clinicaltrials.gov)), на сьогодні у світі проводять понад 460 клінічних рандомізованих контрольованих випробувань щодо безпечності та ефективності застосування СК при захворюваннях ЦНС, з яких 154 – передбачають використання ММСК (з кісткового мозку, жирової тканини, пуповини, пуповинної крові), 39 – НСК/НПК, що пов'язано з етичними обмеженнями та відносно більшою доступністю джерел для отримання ММСК.

Для об'єктивної оцінки терапевтичної ефективності трансплантованих клітин необхідно з'ясувати основні механізми реалізації їх потенціалу. На експериментальних моделях доведено, що трансплантовані НСК/НПК сприяють анатомічній реконструкції пошкодженої тканини, здатні до виживання, міграції в зону ураження та диференціації в нейрони, астроцити, олігодендроцити, утворюють зв'язки з тканиною реципієнта, сприяючи відновленню рухових і когнітивних функцій, знижують ін-

тенсивність запальної та імунної відповіді (Gao et al, 2016; Haus et al, 2016; Veretta et al, 2017; Korach&Pivneva, 2018). Подібні ефекти демонструють введені ММСК: сприяють відновленню нервової тканини, здатні виживати, мігрувати в зону ураження та диференціюватись і трансдиференціюватись у нейрони, астроцити, олігодендроцити, мікроглію та ендотеліоцити, утворюють зв'язки з тканиною реципієнта, сприяють відновленню рухових та когнітивних функцій, зменшують інтенсивність запалення та імунних реакцій, а також мають антиапоптичну дію та посилюють ангиогенез (Walker et al, 2011; Wei et al, 2012; Shi et al, 2016; Webb et al, 2018; Xu et al, 2020). Однак, залишаються відкритими питання щодо функціональної інтеграції екзогенних клітин і їх здатності до тривалого виживання в мозку реципієнта, оскільки лише 9–25 % трансплантованих НСК залишаються життєздатними через 3–5 міс після введення, диференціюючись у зрілі нейрони, астроцити та олігодендроцити (Haus et al, 2016; Veretta et al, 2017), і лише 0,01–0,001 % трансплантованих ММСК приживаються в ішемізованій корі і починають експресувати маркери нервових клітин та ендотеліоцитів (Walker et al, 2011; Wei et al, 2012).

Значну увагу зосереджено на модулюючих і регуляторних властивостях НСК/НПК і ММСК – опосередкованих паракринних «bystander»-ефектах (Kocan et al, 2017; Yang et al, 2018; Willis et al, 2020), основу яких становить здатність до експресії і продукції широкого спектру біологічно активних сигнальних молекул (секретом) (Walker et al, 2011; Kocan et al, 2017; Webb et al, 2018; Yang et al, 2018; Cunningham et al, 2020; Willis et al, 2020; Xu et al, 2020), серед яких – значна кількість нейротрофічних і ростових факторів, які модулюють мікросередовище та стимулюють власні клітини реципієнта, активуючи ендogenous репараційні механізми і сприяючи регенерації нервової тканини.

У зв'язку з існуючими на даному етапі застереженнями щодо клінічного застосування клітинної терапії, альтернативою безпосередньої трансплантації клітин може стати використання їх кондиційованих середовищ (КС) як джерела секретому та ключового компо-

нента мікросередовища («ніші») цих клітин. Перевагами такого підходу є те, що КС не містить клітин і при введенні в організм дозволяє уникнути імунообумовлених ускладнень та не вимагає застосування імуносупресивної терапії; КС збагачене біологічно активними молекулами з регенеративними властивостями; порівняно з клітинними препаратами для трансплантації, КС відносно легше виготовити, стандартизувати, дозувати, а також зберігати, пакувати і транспортувати.

В експериментальних умовах, зокрема у гризунів, одним з найбільш доступних джерел алогенних прогеніторних клітин мезенхімального типу є жирова тканина, а головний мозок плода є доступним джерелом нейрогенних клітин.

Мета роботи – дослідити нейрорегенеративний вплив кондиційованих середовищ фібробластоподібних клітин жирової тканини та фетальних нейрогенних клітин щура *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Усі маніпуляції з піддослідними тваринами, які використані в роботі (статевозрілі щури Wistar, самиці ( $n = 12$ ) розведення віварію Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук України») проводили відповідно до правових норм та вимог Закону України №3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки. Тварин утримували в стандартних умовах акредитованого віварію, знеболення та евтаназію проводили під ефірним наркозом.

Отримання фібробластоподібних клітин жирової тканини (ФПК ЖТ). ФПК ЖТ виділяли з ЖТ наркотизованих щурів (самиці,  $n = 12$ ). Вилучену з пахової ділянки ЖТ кілька разів промивали в свіжих порціях фосфатно-солевого буферу без  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$  («Sigma», Німеччина), подрібнювали до фрагментів 1–2 мм<sup>3</sup>, інкубували 60 хв у 0,075%-вому розчині колагенази (тип I, «Sigma», Німеччина) при 37 °С та помішуванні. Фермент інактивували додаванням (1 : 1) середовища DMEM («Sigma»,

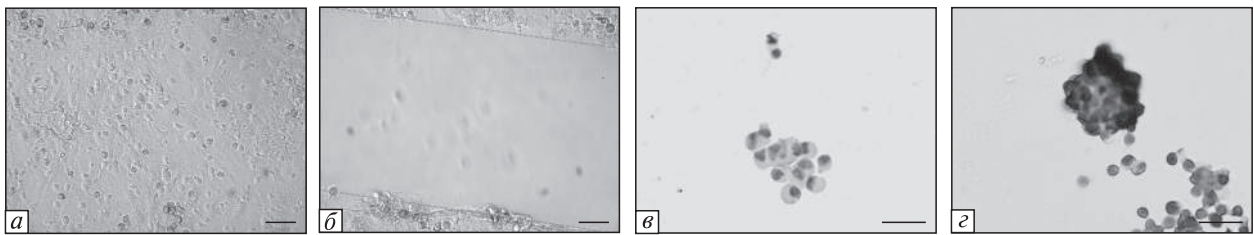
Німеччина) з 10 % фетальної телячої сироватки (ФТС, «BioWest», Франція), клітини осаджували центрифугуванням 10 хв при 1000 об/хв. Рідку фазу, що містила адипоцити, видаляли піпеткою Пастера; осад, що містив стромально-васкулярну фракцію клітин, ресуспендували в DMEM з 10 % ФТС, фільтрували крізь нейлоновий фільтр та виділяли мононуклеарні клітини центрифугуванням 30 хв при 1000 об/хв у градієнті щільності Histopaque («Sigma», Німеччина). Отриману суспензію клітин промивали двічі в DMEM (10 хв при 1000 об/хв), ресуспендували в DMEM і висівали у кількості  $2 \cdot 10^6$  клітин на дно пластикових чашок Петрі ( $d = 35$  мм).

Отримання нейрогенних клітин (НК). Кору головного мозку та зону гіпокампа, виділені з плодів (E14,  $n = 120$ ) наркотизованих самиць щурів ( $n = 12$ ), промивали в DMEM, переносили у свіжу порцію DMEM та механічно дисоціювали багатократним піпетуванням. Отримані суспензії клітин осаджували центрифугуванням 5 хв при 1500 об/хв, промивали DMEM, до осаду клітин додавали свіжу порцію DMEM і ресуспендували.

Кількість та життєздатність отриманих клітин визначали в стандартному цитологічному тесті з 0,2%-вим водним розчином трипанового синього («Merch», Німеччина).

Отримання КС ФПК ЖТ і КС НК. Об'єм отриманих суспензій ФПК ЖТ та НК у кількості  $6,0 \cdot 10^6$  клітин доводили до 6 мл додаванням DMEM з конканаваліном А (0,10 мг/мл), клітини інкубували 2 год у  $\text{CO}_2$ -інкубаторі («Nuve», Туреччина). Далі клітини осаджували центрифугуванням 5 хв при 1500 об/хв, ресуспендували в DMEM і висівали у кількості  $2 \cdot 10^6$  на дно пластикових чашок Петрі ( $d = 35$  мм). Культури тримали в  $\text{CO}_2$ -інкубаторі у стандартних умовах (95 % вологості, 37 °С, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Через 24 год інкубації піпеткою Пастера збирали КС ФПК ЖТ і КС НК, визначали в них концентрацію протеїнів за Лоурі, аліквотизували і зберігали при (– 20 °С).

Культури клітин фіксували в 10%-вому нейтральному формаліні («Bio-Optica», Італія) та проводили імуноцитохімічне дослідження на CD105 (ендоглілн, мембранний глікопротеїн I типу, маркер ММСК) з використанням ми-



**Рис. 1.** Мікрофотографії цитопрепаратів клітинних культур. Світлова мікроскопія: *a* – незабарвлена культура нейральних клітин щура (E14), зона росту, 6-а доба культивування; *б* – ділянка перерізу (краї позначено пунктирною лінією) відразу після розсічення зони росту культури нейральних клітин щура (E14), 6-а доба культивування; *в* – CD105<sup>+</sup>-клітини у культурі клітин, отриманих з ЖТ щура, 24 год культивування, імуноцитохімічне забарвлення на ендоглін; *г* – культура НК щура (E14), 24 год культивування, сфероїдний комплекс Nestin<sup>+</sup>-клітин (імуноцитохімічне забарвлення)

шачих моноклональних антитіл ENG (CD105) («OriGene», США, 1 : 200) та Nestin (протеїн проміжних філаментів, маркер НСК/НПК) із застосуванням кролячих афінних антитіл Anti-Nestin («Sigma-Aldrich», США, 1 : 100). Візуалізацію імуноцитохімічної реакції проводили за допомогою набору «Immunoperoxidase secondary Detection System» («Millipore», США).

Склад отриманих КС ФПК ЖТ і КС НК досліджували за допомогою електрофорезу у 10%-вому поліакриламідному гелі.

Отримання 2D-культур нервових клітин щура (E14) та проведення «scratch-тесту». Виділені нейральні клітини (E14) висівали у кількості  $2 \cdot 10^6$  на покривні скельця, попередньо вкриті поліетиленіміном («Sigma», Німеччина), і поміщали в чашки Петрі (d = 35 мм) з додаванням DMEM та 10 % ФТС. Культури тримали в CO<sub>2</sub>-інкубаторі в стандартних умовах, прижиттєве спостереження з мікрофотоереєстрацією проводили за допомогою інвертованого мікроскопа NIKON TS-100 (Японія). Після отримання конфлуентного шару проводили механічний розріз зони росту клітин металевим лезом. Клітини, що відкріплялись від поверхні, видаляли промиванням чашок Петрі середовищем DMEM.

Вивчення впливу КС ФПК ЖТ і КС НК у «scratch-тесті». До контрольних культур нервових клітин щура після розрізу зони росту додавали DMEM з 10 % ФТС (стандартні умови культивування, контроль). До дослідних культур додавали 0,10 мг/мл (за кількістю протеїнів) КС ФПК ЖТ або КС НК. Культури тримали в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за стандартних умов. Наприкінці досліду (4-а доба) культури

фіксували в 10%-вому нейтральному формаліні та забарвлювали гематоксилін-еозином за Караччі, тіоніном за Нісслем.

Мікроскопічне дослідження та фотореєстрацію цитологічних препаратів культур здійснювали на світлооптичному мікроскопі NIKON Eclipse E200 (Японія). Кількісні дослідження проводили в 10 репрезентативних полях зору зі стандартною вимірювальною шкалою (об'єкт – мікромметр). Цифрові зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageView (2020, Китай), визначаючи загальну кількість клітин, ширину ділянки перерізу, кількість мігруючих клітин, відстань їх міграції, довжину зарослої ділянки перерізу, щільність і довжину відростків.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програмного комплексу «Statistica 8.0» (StatSoft, Inc. (2007)). Застосовували непараметричні методи варіаційної статистики: рангово-дискримінантний аналіз (Kruskal-Wallis ANOVA-тест) для множинного порівняння та Mann-Whitney U-тест для попарного порівняння незалежних груп, тест Вілкоксона для попарного порівняння залежних груп (у динаміці спостереження). Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Вілка. Дані представлені у вигляді ( $M \pm m$ ), де  $M$  – середнє значення;  $m$  – стандартне відхилення від середнього значення; а також  $M$  (25; 75 %), де  $M$  – медіана, (25; 75 %) – міжквартильний діапазон між 25-м і 75-м процентилями. Відмінності при  $p < 0,05$  вважали статистично значущими, а при  $p < 0,01$  – статистично високозначущими.



**Результати та обговорення.** При культивуванні нейральних клітин щура (E14) на 5–7-у добу формувався конфлуентний моношар (рис. 1, а), після чого зони росту розсікали, створюючи ділянку перерізу (рис. 1, б) із середньою шириною ~450 мкм, довжиною 13 мм. Далі до дослідних культур додавали КС від 24-год культур клітин, отриманих з ЖТ та фетального головного мозку щура (E14).

Імуноцитохімічне дослідження виявило, що в 24-год культур клітин, виділених з ЖТ щура, кількість CD105<sup>+</sup>-клітин (імунопозитивних на ендоглін, один із маркерів ММСК) становила (82,84 ± 0,66) % (рис. 1, в). При подальшому культивуванні на адгезивній поверхні ці клітини утворювали моношар клітин з морфологічними характеристиками, подібними до фібробластів. Також у попередніх дослідженнях показано, що клітини, виділені з ЖТ щурів за використаним нами протоколом, при культивуванні після кількох пасажів (n = 5) здатні трансдиференціюватися в нейрогліальному напрямку за впливу специфічних індукторів, таких як ретиноева кислота та 5-азацитидин (Seменова et al, 2014). Таким чином, клітини 24-год культур з ЖТ щура, з яких отримано КС, є, відповідно, ФПК з переважанням CD105<sup>+</sup>-клітин, які з високою ймовірністю можуть бути ММСК.

У 24-год культурах клітин, виділених з фетального головного мозку щура (E14), кількість Nestin<sup>+</sup>-клітин (імунопозитивних за одним із маркерів НСК/НПК) становила (66,86 ± 0,94) % (рис. 1, г), частина з них утворювали сфероїдні комплекси (так звані «нейросфери»), що є характерною властивістю НСК/НПК і дозволяє стверджувати, що переважна кількість клітин у 24-год культурах НК, з яких отримано КС, є, відповідно, НСК/НПК.

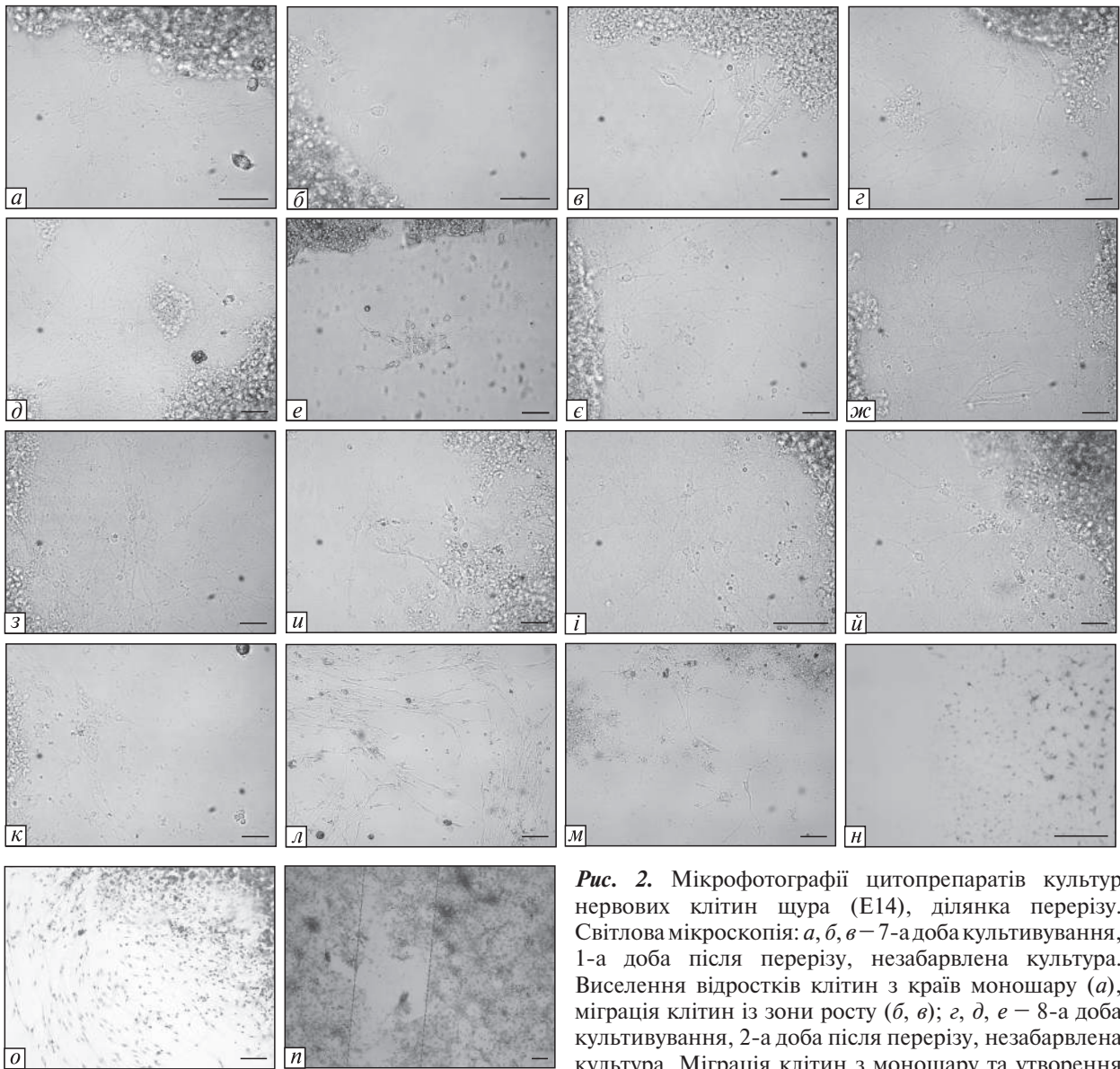
Як у контрольних, так і в дослідних культурах спостерігали процеси ендогенної регенерації, динаміка яких різнилася залежно від культивацийних умов.

За стандартних умов у контрольних культурах упродовж 1-ї доби після перерізу моношару спостерігали проростання численних довгих розгалужених відростків клітин із країв розсіченого моношару у ділянку перерізу по всій його довжині (рис. 2, а) та міграцію окремих клітин. Через 2 доби у ділянку перерізу мі-

грували поодинокі округлі та краплеподібні клітини з довгими відростками, а відростки клітин з моношару, що проросли перпендикулярно в напрямку протилежного краю ділянки перерізу, розгалужувалися, утворюючи мережу (рис. 2, з).

На 3-ю добу в ділянці перерізу спостерігали поодинокі клітини з довгими відростками або невеликі їх комплекси, в окремих частинах залишалися збереженими пророслі відростки (рис. 2, е); інші частини внаслідок редукції відростків та дегенерації клітин зазнавали спустошення, що посилювалось на 4-у добу (рис. 2, и, к, н). Кількість мігруючих у ділянку перерізу клітин з 1-ї по 3-ю добу культивування не змінювалась, надалі зменшувалась на 4-у добу (рис. 3, а). Відстань міграції клітин на 2-у добу збільшувалась у 1,7 рази (p = 5,7 · 10<sup>-10</sup>), але зменшувалась на 3–4-у добу (в 1,3 рази, p < 0,001, U-критерій Манна-Уїтні; рис. 3, б). З 1-ї по 3-ю добу культивування за рахунок проростання і розгалуження щільність відростків у ділянці перерізу зростала (уп'ятеро, p = 0,022), але різко меншала з 3-ї по 4-у добу спостереження (p = 0,05, U-критерій Манна-Уїтні; рис. 3, в). Середня довжина зарослої ділянки перерізу становила (1198,5 ± 13,9) мкм, тобто 9,2 % її повної довжини. Таким чином, після механічного перерізу в культурі нервових клітин за стандартних умов з 1-ї по 3-ю добу відбувались процеси ендогенної регенерації, які, однак, зменшувались до 4-ї доби спостереження.

Додавання до стандартного культурального середовища КС ФПК ЖТ і КС НК сприяло значному зростанню ступеня та тривалості процесів ендогенної регенерації в культурі нервових клітин. Упродовж 1–2-ї доби за впливу КС ФПК ЖТ і КС НК ділянка перерізу інтенсивніше заповнювалась відростками, спрямованими перпендикулярно і вздовж країв моношару, а також округлими клітинами без відростків або з одним коротким відростком та комплексами таких клітин (рис. 2, б, в, д). Але в культурах з додаванням КС НК молодиференційовані клітини і їх кластери активніше мігрували в ділянку перерізу і зазнавали початкового диференціювання (рис. 2, е). Через 3 доби за впливу КС ФПК ЖТ і КС НК в окремих ділянках відбувалось повне «зши-

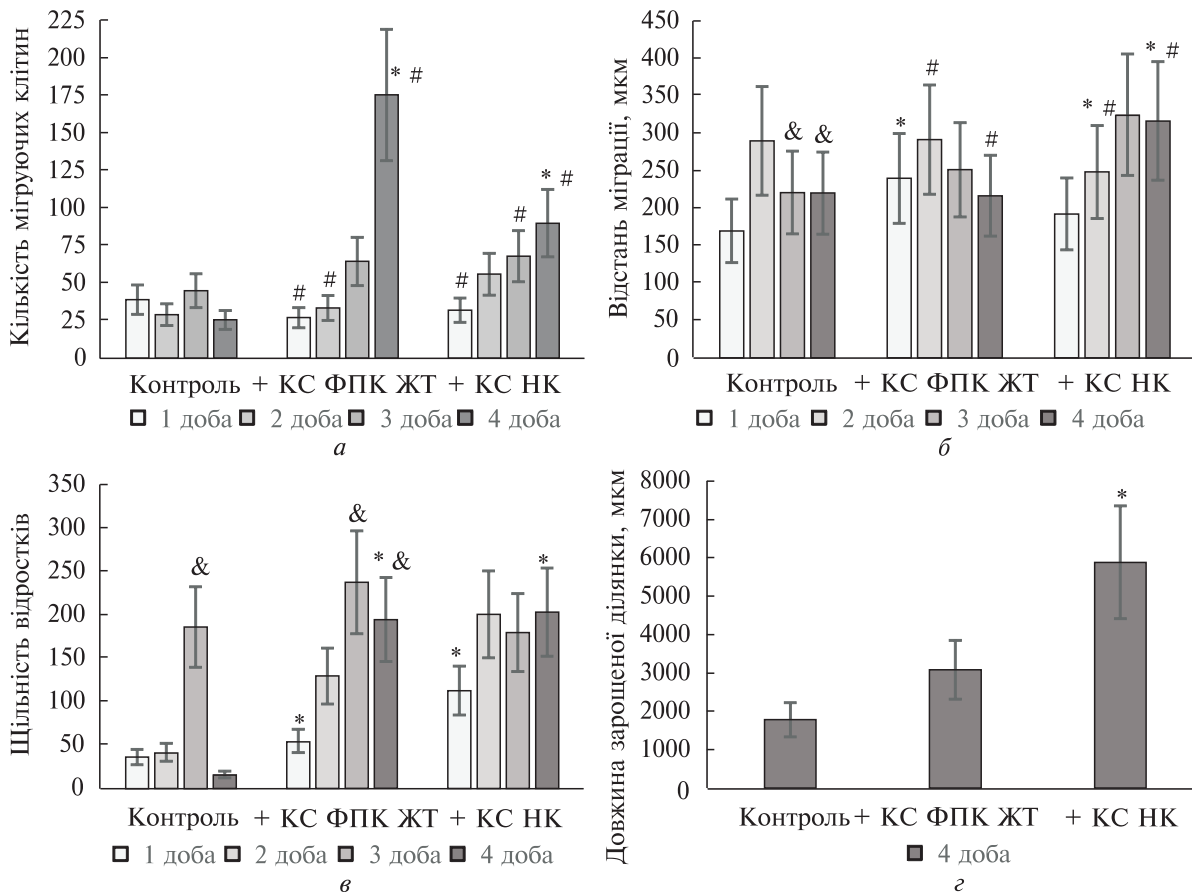


**Рис. 2.** Мікрофотографії цитопрепаратів культур нервових клітин щура (E14), ділянка перерізу. Світлова мікроскопія: *a, б, в* – 7-а доба культивування, 1-а доба після перерізу, незабарвлена культура. Виселення відростків клітин з країв моношару (*a*), міграція клітин із зони росту (*б, в*); *г, д, е* – 8-а доба культивування, 2-а доба після перерізу, незабарвлена культура. Міграція клітин з моношару та утворення

мережі відростків (*г*), заповнення ділянки перерізу виселеними клітинами та відростками (*д*), виселення пластів клітин та їх диференціювання (*е*) в ділянці перерізу; *є, ж, з* – 9-а доба культивування, 3-а доба після перерізу, незабарвлена культура. Редукція відростків і дегенерація клітин в ділянці перерізу (*є*), «зшивання» обох країв ділянки перерізу ланцюжками клітин та їх відростками (*ж, з*); *и–п* – 10-а доба культивування, 4-а доба після перетину, незабарвлена культура (*и–м*) та забарвлення гематоксиліном-еозином (*н–п*). Редукція відростків і дегенерація клітин в ділянці перерізу (*и, к, н*), утворення щільної мережі відростків і міграція клітин в ділянку перерізу (*і, й, л, о*), диференціація виселених клітин (*м*), заростання ділянки перерізу (*п*)

вання» обох країв розрізаного моношару клітинними відростками, які своїми розгалуженнями утворювали щільну сітку (рис. 2, *ж, з*); спостерігали міграцію малодиференційованих округлих клітин на значну відстань від краю

моношару з утворенням груп (після додавання КС ФПК ЖТ), а також зміщення цілих пластів, з яких масово мігрували гліальноподібні диференційовані клітини (після додавання КС НК). Через 4 доби за впливу КС ФПК ЖТ

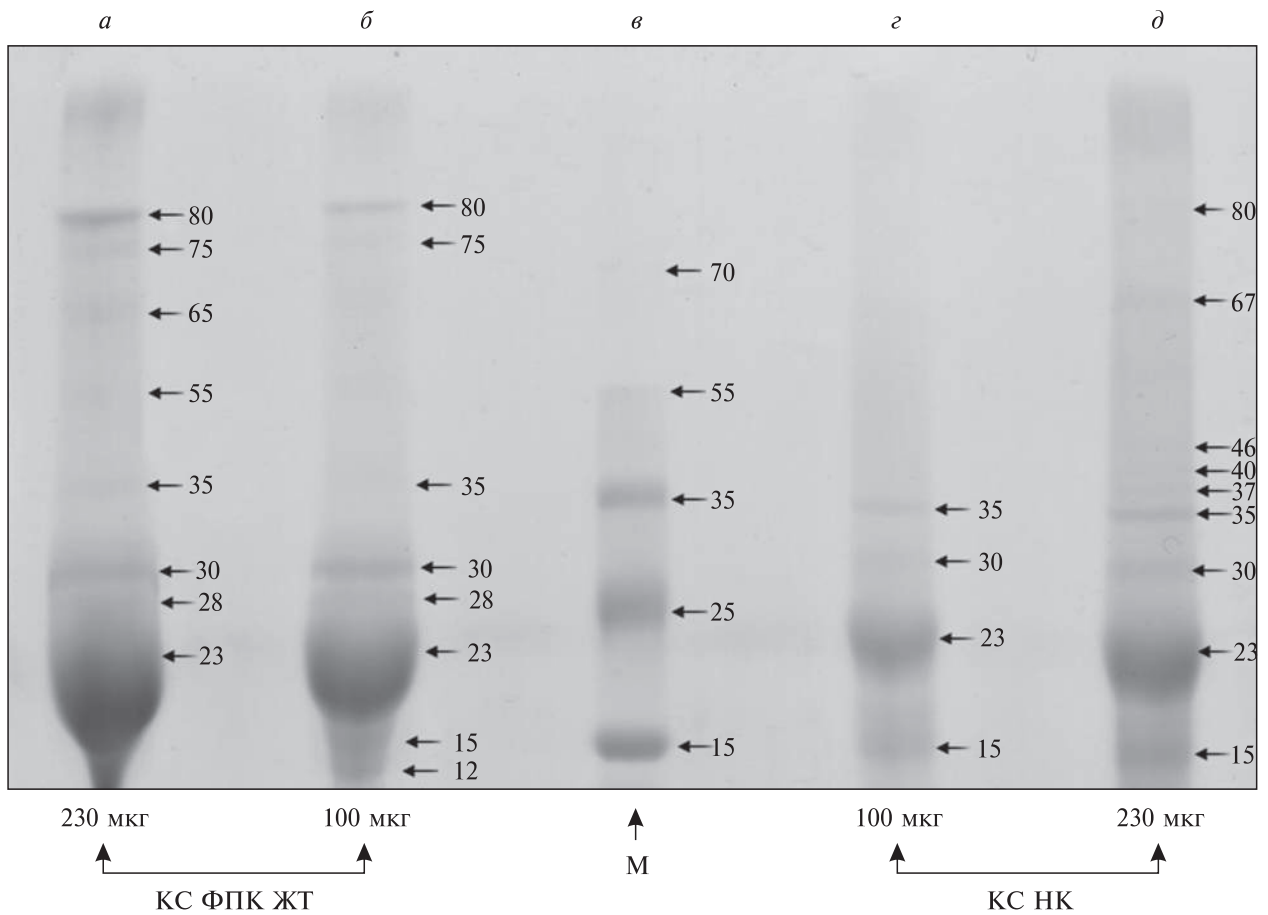


**Рис. 3.** Стимуляція клітинної міграції та зарощення ділянки перерізу за впливу КС ФПК ЖТ та КС НК; відмінності статистично значущі: \* – у порівнянні з контролем ( $p < 0,01$ ); # – між показниками груп ( $p < 0,05$ ); & – між показниками всередині групи у різні строки спостереження ( $p < 0,05$ )

проростання відростків у ділянці перерізу продовжувалось з утворенням мережі (рис. 2, і), виявляли як малодиференційовані клітини, так і клітини гліального фенотипу трикутної та зірчастої форми з відростками та їх невеликі комплекси, окремі частини ділянки розрізу повністю заповнювались відростками та клітинами (рис. 2, л, о). За впливу КС НК відбувалась міграція цілих пластів відрощатих клітин гліального фенотипу та їх диференціювання (рис. 2, й, м), окремі частини ділянки перерізу повністю зарощувались, а в кількох випадках відбувалось моношарове зарощення обох терміналей ділянки перерізу (рис. 2, н).

За впливу КС кількість клітин, що мігрували з моношару в ділянку перерізу, зростала з 2-ї по 4-у добу спостереження, відповідно, в

3,5 рази (після додавання КС НК) та у 7 разів (після додавання КС ФПК ЖТ), порівняно з показниками контрольних культур за стандартних умов на 4-у добу ( $p = 0,001-0,015$ , U-критерій Манна-Уїтні; рис. 3, а). При цьому відстань, на яку мігрували клітини, досягала найвищих значень за впливу КС НК на 3–4-у добу спостереження (рис. 3, б), перевищуючи показники контрольних культур та культур після впливу КС ФПК ЖТ у 1,4–1,5 рази ( $p = 0,006-0,019$ , U-критерій Манна-Уїтні). Щільність клітинних відростків у ділянці перерізу за впливу КС НК та КС ФПК ЖТ значуще перевищувала показники контрольних культур за стандартних умов на 1-у (відповідно  $p = 0,014$ ,  $p = 0,048$ ) та 4-у добу спостереження ( $p = 0,006$ ,  $p = 0,019$ , U-критерій Манна-Уїтні;



**Рис. 4.** Електрофореграма в 10%-вому поліакриламідному гелі: а, б – склад протеїнових фракцій КС ФПК ЖТ (кількість протеїнів 230 мкг (а) і 100 мкг (б)); в – Thermo Fisher Scientific Page Ruler Plus Prestrained Protein Ladder (10–100 кДа, США); з, д – склад протеїнових фракцій КС НК (кількість протеїнів 100 мкг (з) і 230 мкг (д))

рис. 3, в). Довжина зарослої частини ділянки перерізу зростала за впливу КС ФПК ЖТ в 1,7 рази, КС НК – утричі ( $p = 0,005$ , U-критерій Манна-Уїтні; рис. 3, з). Середня довжина зарослої частини за впливу КС ФПК ЖТ становила 23,7 % загальної довжини ділянки перерізу, а за впливу КС НК – 43,5 % її загальної довжини, тобто при додаванні КС ФПК ЖТ та КС НК відносна (%) довжина зарослої частини збільшилась, порівняно з контрольними умовами, у 2,6 та 4,7 рази відповідно.

Отже, проведені дослідження засвідчили стимулюючий вплив КС від 24-год культур ФПК ЖТ та НК (E14) щура на зарощення ділянки перерізу моношару культур нервових клітин головного мозку щура. Виявлений активуючий

щодо ендогенної регенерації вплив КС від 24-год культур ФПК ЖТ та НК (E14) щура, вочевидь, має в своїй основі ефекти біологічно активних агентів (нейротрофічних і ростових факторів, цитокінів, позаклітинних везикул), що входять до складу КС досліджуваних клітин.

За даними електрофоретичного дослідження в 10%-вому поліакриламідному гелі, до складу досліджуваних КС входять кілька протеїнових фракцій у різних концентраціях (рис. 4). Дослідження збільшеної кількості КС (230 мкг, порівняно зі 100 мкг у перерахунку на загальну концентрацію протеїнів) виявило не лише превалюючі протеїнові фракції, а й кілька додаткових мінорних. Так, у КС ФПК ЖТ виявлено десять фракцій: превалюючі про-



теїнові фракції з молекулярною масою 12, 15, 23, 30, 80 кДа, а також мінорні – 28, 35, 55, 65, 75 кДа (рис. 4, а, б). У КС НК виявлено дев'ять фракцій: превалюючі протеїнові фракції з молекулярною масою 15, 23, 30, 35 кДа, а також мінорні фракції – 37, 40, 46, 67, 80 кДа (рис. 4, з, д).

Таким чином, як КС ФПК ЖТ, так і КС НК містять фракції 15, 23, 30, 35, 65–67 і 80 кДа, що дає можливість стверджувати секрецію цими клітинами біологічно активних медіаторів, які належать щонайменше до 6 подібних протеїнових фракцій із загального переліку продукованих молекул. Подібність секретому ФПК ЖТ і НК, вочевидь, пояснює подібність стимулюючого впливу КС від 24-год культур цих клітин на ендogenous регенерацію в культурах нервових клітин головного мозку щура з перерізом моношару. Водночас, різні концентрації цих секретованих молекул, а також наявність у КС від культур досліджуваних клітин різних протеїнових фракцій, характерних лише для одного з типів клітин (12, 55, 75 кДа для КС ФПК ЖТ; 37, 40, 46 кДа для КС НК), ймовірно, є чинниками зареєстрованих відмінностей у динаміці та вираженості процесів ендogenous регенерації в культурах нервових клітин.

Як зазначено вище, КС були отримані від 24-год культур клітин, які є, відповідно, ФПК ЖТ з переважанням CD105<sup>+</sup>-клітин (ймовірно, ММСК ЖТ) та НК з переважанням Nestin<sup>+</sup>-клітин (вірогідно, НСК/НПК).

Отримані дані, загалом, відповідають відомим даним (Kocan et al, 2017; Willis et al, 2020; Xu et al, 2020). Слід, однак, зазначити, що дані про склад секретому, протеїнові про-

філі, протеомні бібліотеки ММСК та НСК/НПК все ще накопичуються і не завжди є співставленими через різні протоколи отримання КС, різні рівні дослідження (генна експресія, протеїнова експресія та секреція) та різні використовувані методики (RT-PCR, секвенування, рідинна хроматографія, імуноцитохімія, імуноферментний аналіз). Згідно з різними даними, НСК/НПК, а також ММСК ЖТ здатні експресувати і продукувати велику кількість сигнальних молекул (таблиця). Ці протеїни є ростовими та нейротрофічними факторами, морфогенами, модулюючими та регуляторними цитокінами, які залучаються у численні біологічні процеси (індивідуальний розвиток, клітинний метаболізм, проліферація, диференціація, виживання та/або апоптоз).

Серед них такі фактори росту, як VEGF (19 кДа (мономер), 38 кДа (димер)), NGF (біологічно активна β-субодиниця 26 кДа), BDNF (14 кДа (мономер), ~28 кДа (димер)), FGF (18 кДа), TGF-β (25 кДа (димер 2 × 12,5 кДа)), молекулярні маси яких наближаються або відповідають деяким протеїновим фракціям, що виявлені нами при електрофоретичному дослідженні. Зазначені протеїни, з огляду на їх відомі властивості, з великою ймовірністю, є чинниками зареєстрованих активуючих нейро-регенеративних опосередкованих bystander-ефектів ФПК ЖТ і НК в культурі нервових клітин, що через паракринну передачу сигналів стимулюють процеси клітинної міграції та диференціювання і в кінцевому підсумку сприяють зарощенню ділянки перерізу.

Таким чином, наші дані сприяють підтвердженню концепції, яка пояснює покращення функціонального відновлення при модельова-

#### Сигнальні молекули, що експресуються і продукуються НСК/НПК і ММСК ЖТ

Тип клітин	Продуковані фактори	Посилання
НСК/НПК	IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ, TGF-β1, TGF-β2, TNF-α, NGF, BDNF, NT-3, VEGF	Webb et al, 2018; Willis et al, 2020; Zhong et al, 2020
ММСК ЖТ	IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN-γ, TGF-β1, TGF-β2, TNF-α, NGF, BDNF, GDNF, VEGF, IGF-1, GM-CSF, G-CSF, PDGF, FGF, EGF, HGF	Kocan et al, 2017; Xu et al, 2020

них ураженнях ЦНС опосередкованим паракринним впливом трансплантованих СК/ПК, та відкривають перспективи щодо переваг можливого використання КС як альтернативи безпосередній трансплантації клітин при лікуванні захворювань ЦНС.

**Висновки.** КС від 24-год культур ФПК ЖТ та НК щура (E14) стимулюють процеси ендогенної регенерації в культурі нервових клітин головного мозку щура з механічним перерізом моношару. За впливу КС ФПК ЖТ у ділянці перерізу до 4-ї доби спостереження зростала кількість мігруючих клітин (у 7 разів), щільність відростків клітин (у 12,5 рази) та довжина зарослої ділянки (у 1,7 рази); за впливу КС НК — зростала кількість мігруючих клітин (у 3,5 рази), відстань міграції клітин (у 1,4 рази), щільність відростків клітин (у 13 разів) та довжина зарослої ділянки (утричі). Чинниками нейрорегенеративних «bystander»-ефектів ФПК ЖТ та НК щура є секретовані біологічно активні протеїни: у складі КС ФПК ЖТ виявлено 10 фракцій — превалюючі протеїнові фракції (12, 15, 23, 30, 80 кДа) та мінорні (28, 35, 55, 65, 75 кДа); до складу КС НК входять 9 фракцій — превалюючі (15, 23, 30, 35 кДа) та мінорні (37, 40, 46, 67, 80 кДа).

**Дотримання етичних стандартів.** Дослідження схвалено Комітетом з біоетики Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук України» (протокол № 26 від 11 травня 2018 р.).

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Дослідження виконано в рамках фінансування науково-дослідної роботи за № державної реєстрації 0119U000114.

NEUROREGENERATIVE «BYSTANDER»-EFFECTS OF CONDITIONED MEDIA FROM ADIPOSE TISSUE-DERIVED FIBROBLAST-LIKE CELLS *IN VITRO*

E.G. Pedachenko, L.D. Liubich, L.P. Staino, D.M. Egorova, T.D. Skaterna

The State Institution «Romodanov Neurosurgery Institute, the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»  
Palladin Institute of Biochemistry  
of the National Academy of Sciences of Ukraine

E-mail: lyubichld@gmail.com

The use of different types of stem cells, including mesenchymal multipotent stromal cells (MMSCs) and neurogenic stem/progenitor cells (NSCs/NPCs), is a promising direction in the development of new technologies for the treatment of central nervous system diseases. An alternative to direct cell transplantation may be the use of their conditioned media (CM) as a source of secretome and a key component of the mechanism to realize their potential. Current clinical trials, using cell therapy in case of CNS pathology, mostly use adipose tissue, bone marrow, umbilical cord, and cord blood as a source of isolating MMSCs or mononuclear cells of the stromal-vascular fraction, and the lines of immortalized neurogenic cells, isolated from structures of the brain or spinal cord of the human embryo, — as a source of NSCs/NPCs. In experimental conditions, in particular in rodents, adipose tissue is among the most available sources of allogenic progenitor cells of the mesenchymal type, and fetal brain is an accessible source of neurogenic cells. The aim was to study the neuroregenerative effects of conditioned media from rat adipose tissue-derived fibroblast-like cells and fetal neurogenic cells *in vitro*. CM from 24-h cultures of rat adipose tissue-derived fibroblast-like cells (ad-FLCs) and fetal neurogenic cells (NCs, E14) were examined using electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel. On day 5–7, in 2D cultures of rat neural cells (E14) the «scratch assay» was performed and nutrient medium DMEM with 10% FCS (standard culture conditions, control) or 0.10 mg/ml (by amount of protein) ad-FLCs CM or NCs CM were added. Microscopic and morphometric studies were performed during four days of cultivation. After mechanical transection in the culture of neural cells under standard conditions from the first to the third day there were processes of endogenous regeneration, which decreased to the fourth day. The addition of ad-FLCs CM or NCs CM contributed to a significant increase in the degree and duration of endogenous regeneration processes in neural cell culture. Under the exposure to ad-FLCs CM up to the fourth day, the number of migrated cells and the density of cell processes in the scratch area increased 7 and 12.5 times, respectively; the exposure to NCs CM increased the number of migrated cells (3.5 times), the distance of cell migration (1.4 times), the density of cell processes (13 times). The length of the overgrown section of the scratch area increased 1.7 times after the exposure to ad-FLCs CM, NCs CM — 3 times, amounting to 23.7 and 43.5 % respectively of the total length of the transection zone. 10 protein fractions were detected in the ad-FLCs CM: predominant 12, 15, 23, 30, 80 kDa and minor — 28, 35, 55, 65, 75 kDa; in NCs CM — 9 fractions: prevailing 15, 23, 30, 35 kDa and minor —

37, 40, 46, 67, 80 kDa. CM from 24-h cultures of rat ad-FLCs or NCs (E14) stimulate endogenous regeneration processes in rat brain cell culture with mechanical monolayer transection. The affecting factors of neuro-regenerative «bystander» effects of rat ad-FLCs or NCs are secreted biologically active proteins – components of the CM predominant and minor protein fractions.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bao X, Feng M, Wei J et al. (2011) Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats *Eur J Neurosci* 34:87–98. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07733.x
- Beretta S, Cunningham KM, Haus DL et al. (2017) Effects of Human ES-Derived Neural Stem Cell Transplantation and Kindling in a Rat Model of Traumatic Brain Injury *Cell Transplant* 26:1247–1261. doi: 10.1177/0963689717714107
- Cunningham CJ, Enrich MV, Pickford MM et al. (2020) The Therapeutic Potential of the Stem Cell Secretome for Spinal Cord Repair: A Systematic Review and Meta-Analysis *OBM Neurobiology* 4(4). doi: 10.21926/obm.neurobiol.2004080
- Dobrowolski S, Lepski G. (2013) Stem cells in traumatic brain injury *Am J Neurosci* 4:13–24. doi: 10.3844/ajns.2013.13.24
- Gao J, Grill RJ, Dunn TJ et al. (2016) Human Neural Stem Cell Transplantation-Mediated Alteration of Microglial/Macrophage Phenotypes after Traumatic Brain Injury *Cell Transplant* 25:1863–1877. doi: 10.3727/096368916X691150
- Gomazkov OA. (2013) Neurogenesis as an adaptive function of the brain. Moscow, Ikar:79–110 (Russian) ISBN: 978-5-7974-0313-5
- Haus DL, Lypez-Velázquez L, Gold EM et al. (2016) Transplantation of human neural stem cells restores cognition in an immunodeficient rodent model of traumatic brain injury *Exp Neurol* 281:1–16 doi: 10.1016/j.expneurol.2016.04.008
- Kocan B, Maziarz A, Tabarkiewicz J et al. (2017) Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential *Stem Cells Int* 2017:1653254. doi: 10.1155/2017/1653254
- Kopach O, Pivneva T. (2018) Cell-based therapies for neural replacement strategies in stroke-related neurodegeneration: neurophysiological insights into stem progenitor cell neurogenesis within a host environment *Neural Regen Res* 13:1350–1351. doi: 10.4103/1673-5374.235224
- Lee MC, Jin CY, Kim HS et al. (2011) Stem cell dynamics in an experimental model of stroke *Chonnam Med J* 47:90–98. doi: 10.4068/cmj.2011.47.2.90
- Ludwig PE, Thankam FG, Patil AA et al. (2018) Brain injury and neural stem cells *Neural Regen Res* 13:7–18. doi: 10.4103/1673-5374.224361
- Qu X, Sheng H. (2018) Stem Cell Therapy for Traumatic Brain Injury: A Progress Update *Ann Neurol Surg* 2:1008
- Semenova V, Lisianyi N, Stayno L et al. (2014) Proliferative and differentiated potential of mesenchymal stem cells from adipose tissue under cultivation conditions *Ukr Neurosurg J* (3):24–29. doi: 10.25305/unj.47487
- Shi W, Huang CJ, Xu XD et al. (2016) Transplantation of RADA16-BDNF peptide scaffold with human umbilical cord mesenchymal stem cells forced with CXCR4 and activated astrocytes for repair of traumatic brain injury *Acta Biomater* 45:247–261. doi: 10.1016/j.actbio.2016.09.001
- Walker PA, Letourneau PA, Bedi S et al. (2011) Progenitor cells as remote «bioreactors»: neuroprotection via modulation of the systemic inflammatory response *World J Stem Cells* 3:9–18. doi: 10.4252/wjsc.v3.i2.9
- Webb RL, Kaiser EE, Spellicy S et al. (2018) Human Neural Stem Cell Extracellular Vesicles Improve Tissue and Functional Recovery in the Murine Thromboembolic Stroke Model *Transl Stroke Res* 9:530–539. doi: 10.1007/s12975-017-0599-2
- Wei L, Fraser JL, Lu ZY et al. (2012) Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats *Neurobiol Dis* 46:635–645. doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.002
- Willis CM, Nicaise AM, Hamel R et al. (2020) Harnessing the Neural Stem Cell Secretome for Regenerative Neuroimmunology *Front Cell Neurosci* 14:590960. doi: 10.3389/fncel.2020.590960
- Xu Ch, Diao YF, Wang J et al. (2020) Intravenously infusing the secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates neuroinflammation and neurological functioning after traumatic brain injury *Stem Cells and Development* 29:222–234. doi: 10.1089/scd.2019.0173
- Yang H, Wang C, Chen H et al. (2018) Neural Stem Cell-Conditioned Medium Ameliorated Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats *Stem Cells International*. doi:10.1155/2018/4659159
- Zhong D, Cao Y, Li CJ et al. (2020) Neural stem cell-derived exosomes facilitate spinal cord functional recovery after injury by promoting angiogenesis *Exp Biol Med* 245:54–65. doi: 10.1177/1535370219895491

Надійшла в редакцію 12.07.21  
Після доопрацювання 03.11.21  
Прийнята до друку 18.03.22