

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

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 надлежащее 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

 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

содержанием глюкозы и L-глутамином (*BioWest*, Франция), обогащенной 10 % фетальной бычьей сыворотки – FBS (*Lonza*, Германия) в CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. 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 CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

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•10⁶ клеток на 5 мл среды на 25 см² 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 CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

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

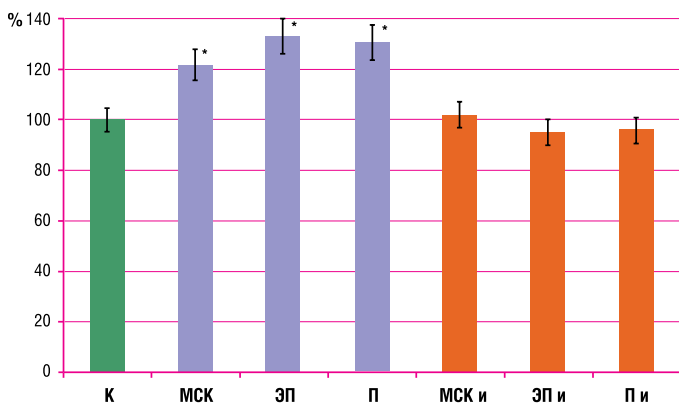


Рис. 1. Влияние факторов плацентарного происхождения на метаболическую активность нейральных клеток по результатам МТТ-теста. К – контроль, нейральные клетки без воздействия. МСК – нейральные клетки со средой, кондиционированной МСК, ЭП – нейральные клетки с добавлением в среду 10 % экстракта плаценты, 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 криобриках (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 понижает 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

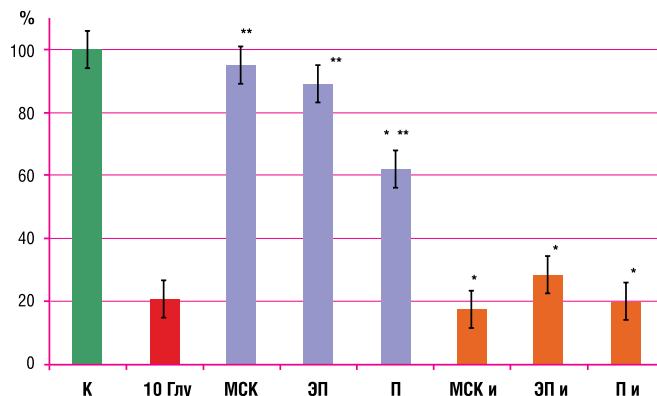


Рис. 2. Влияние предварительной инкубации с кондиционной средой с последующим воздействием 10 мМоль глутамата на метаболическую активность нейральных клеток по результатам МТТ-теста. К – контроль, НК без воздействия глутамата. 10 Глу – нейральные клетки после воздействия 10 мМоль глутамата, МСК – нейральные 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.

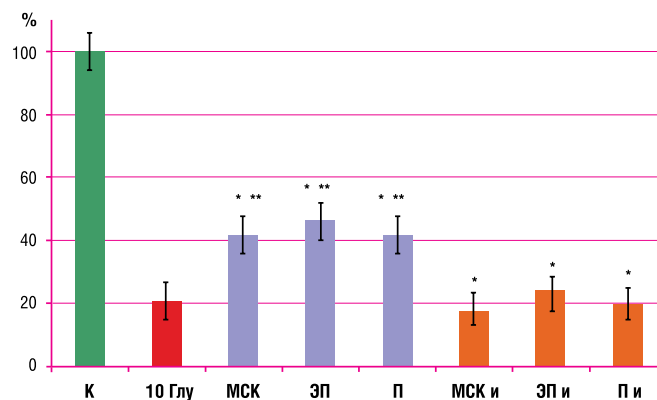


Рис. 3. Влияние кондиционных сред на метаболическую активность нейральных клеток после воздействия 10 мМоль глутамата по результатам МТТ-теста. К – контроль, нейральные клетки без воздействия глутамата. 10 Глу – нейральные клетки после воздействия 10 мМоль глутамата, МСК – нейральные клетки после 10 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 біоб'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

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).