

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

---

**ЦУПИКОВ ОЛЕГ МИХАЙЛОВИЧ**

УДК 616-089.843:591.398:611.018.82:616-089.811

**ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРОЦЕСИ  
РЕГЕНЕРАЦІЇ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО  
УШКОДЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора медичних наук

**Київ – 2018**

## Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

**Науковий консультант:** доктор медичних наук, професор  
**Скибо Галина Григорівна**  
завідувач відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

**Офіційні опоненти:** Член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, професор  
**Чайковський Юрій Богданович**  
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, завідувач кафедри гістології та ембріології

Член-кореспондент НАМН України, доктор медичних наук, професор  
**Лісяний Микола Іванович**  
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМНУ», керівник відділу нейроімунології

доктор біологічних наук, професор  
**Борисова Тетяна Олександрівна**  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
завідувач відділу нейрохімії

Захист відбудеться «20» березня 2018 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті Інституту <http://biph.kiev.ua/>

Автореферат розіслано «07» лютого 2018 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

**Любанова О. П.**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Актуальним завданням сучасної патологічної фізіології є з'ясування механізмів репаративної регенерації тканин та органів при багатьох патологічних процесах, що дозволить запропонувати нові підходи їх корекції, зокрема, із залученням стовбурових клітин. Відомо, що стовбурові клітини здатні розрізняти ділянки ушкодженої тканини, мігрувати у ці зони та диференціюватися у тип клітин, необхідний для відновлення втраченої функції (Ottoboni et al., 2017).

Останнім часом активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин для лікування захворювань нервової системи. Неврологічні захворювання належать до найпоширеніших хвороб в Україні, розповсюдженість яких за останні роки значно зросла (Мельник та ін., 2017). Перше місце серед неврологічних захворювань посідають цереброваскулярні хвороби, серед яких найбільш тяжким вважається мозковий інсульт. Проблема цереброваскулярних захворювань актуальна не лише для дорослого населення, але й для новонароджених. Перинатальна патологія ЦНС становить 49,8% всіх неврологічних захворювань у дітей (Fineschi et al., 2017). Інвалідність дитячого населення внаслідок перинатальних уражень ЦНС, які призводить до порушення психофізіологічного розвитку дитини, продовжує зростати і коливається від 0,5 до 4-х випадків на 1000 населення (або на 200-300 дитячого населення) (Скворцов та ін., 2003).

Активно ведеться пошук нейропротекторних засобів, здатних впливати на механізми ішемічно-реперфузійних ушкоджень мозку. Припускають, що наслідки ішемічного ушкодження нервової тканини можуть бути компенсовані завдяки активації власних репаративних механізмів або корекції за допомогою різних терапевтичних підходів (Yuh et al., 2017).

Одним з перспективних напрямків у лікуванні, розробці профілактичних протиінсультних заходів і реабілітації пацієнтів з ішемічними ураженнями головного мозку є клітинна терапія із використання нейральних стовбурових клітин (НСК) (Ottoboni et al., 2017). В основу таких досліджень покладено теоретичні та експериментальні розробки, що вказують на здатність стовбурових клітин диференціюватися в нейрони або гліальні клітини, компенсуючи тим самим функцію загинувших тканин. Як відомо, під час ембріогенезу НСК здатні диференціюватися в усі типи клітин, які необхідні для формування ЦНС (Tang et al., 2017). Тому терапевтичне застосування фетальних нейральних стовбурових клітин передбачає їх диференціювання в спеціалізовані клітини ЦНС і в дорослому організмі.

Оскільки ще не до кінця встановлені механізми репаративної регенерації нервової тканини під час ішемічного ушкодження головного мозку, виникає необхідність проведення експериментальних досліджень впливу трансплантації стовбурових та прогеніторних клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини в ЦНС. Для дослідження ефективності клітинної терапії широко використовують моделювання пошкодження мозку з подальшою трансплантацією стовбурових клітин (Ottoboni et al., 2017). Ішемічне ураження

головного мозку лабораторних тварин в експерименті дозволяє відтворити наслідки ішемічного інсульту в людини, а трансплантація клітин різного походження з різним потенціалом диференціювання має на меті вивчення їх регенеративного потенціалу та загальних закономірностей функціонування у відновних процесах у вогнищі ішемії. Це дозволить суттєво поглибити знання про клітинні механізми регенеративного потенціалу стовбурових клітин при ішемічних ушкодженнях головного мозку та обґрунтувати можливість застосування клітинної терапії при цій патології.

Враховуючи вищевикладене, ми вважали за доцільне дослідити вплив трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження головного мозку у лабораторних тварин.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Робота виконана в рамках наукових програм відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Дослідження регенеративного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при перинатальній патології ЦНС» (2015-2019 рр.) №00115U003633, «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012-2016 рр.) №0112U001475, «Клітинні та молекулярні механізми нейродегенерації та шляхи її корекції» (2014-2018 рр.) №0113U007273; на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології – «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» (№UF45.2/001); у рамках гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених «Клітинна терапія при експериментальному ішемічному ушкодженні головного мозку» (2010-2011 рр.) №0111U005283, у рамках спільного проекту НАН України та Українського науково-технологічного центру «Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини при перинатальній патології ЦНС» (2014-2016 рр.) № 0114U006119, у рамках спільного швейцарсько-українського проекту SCOPES «Ectopic niche formation by grafted neural stem/progenitors in the ischemic cerebral cortex» (2009-2012 рр.) № IZ73Z0\_1 28015.

**Мета дослідження:** визначення впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження мозку.

### **Завдання дослідження:**

1. Встановити вплив трансплантації суспензії фетальної нервової тканини на структуру гіпокампа дорослих щурів у тривалі строки після трансплантації.
2. Оцінити можливість довгострокового виживання у мозку реципієнта фетальних GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин (НПК), трансплантованих тваринам після ішемічного ушкодження мозку, їх диференціювання у зрілі клітини нервової тканини та формування синаптичних контактів між нейронами реципієнта і донорськими GFP-позитивними НПК.
3. Охарактеризувати вплив трансплантованих НПК на ендогенний

нейрогенез у гіпокампі мишей після ішемічного ушкодження мозку.

4. Описати вплив трансплантації НПК на когнітивні функції мишей після церебральної ішемії-реперфузії.

5. Визначити вплив трансплантації стовбурових клітин на стан нервової тканини і поведінкові реакції експериментальних тварин на *in vivo* моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ).

6. Створити *in vitro* модель ПВЛ на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

7. Установити вплив надекспресії фактора росту фібробластів-2 (FGF-2) у НПК на функціональний стан цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку.

8. З'ясувати вплив надекспресії індуктора екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ (EMMPRIN) у НПК на їх міграційні здібності із субвентрикулярної зони до ділянки ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі.

9. Оцінити можливість формування синаптичних контактів між нейронами реципієнта і донорськими нейронами, утвореними з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) людини, після їх трансплантації у мозок ішемізованих щурів.

*Об'єкт дослідження* – структурно-функціональні зміни в головному мозку експериментальних тварин, викликані трансплантацією стовбурових клітин після ішемічного ушкодження мозку.

*Предмет дослідження* – морфологічна характеристика нервової тканини головного мозку та показники поведінкових феноменів.

**Методи дослідження.** Для досягнення мети даної роботи були використані методи: виділення та культивування нейральних стовбурових клітин, проточна цитофлюорометрія, таймлапс (time-lapse) аналіз, продукція лентівірусних векторів, трансфекція культури клітин, желатинова зимографія, моделювання ішемічних ушкоджень мозку; імуноцито- та гістохімія на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях; лазерна доплерографія, поведінкові тести, статистичні методи.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У дисертаційній роботі представлені оригінальні результати морфофункціональних досліджень впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження головного мозку як у дорослих, так і у новонароджених тварин.

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей продемонстровано, що субокципітально трансплантовані фетальні GFP-позитивні НПК здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони CA1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони з добре розвиненими дендритами і шипиками та виживати у мозку ішемізованих тварин як мінімум 90 діб після трансплантації. За допомогою ультраструктурного аналізу

показано, що субокципітальна або стереотаксична трансплантація GFP-позитивних НПК у мозок ішемізованих тварин сприяє утворенню простих та перфорованих синаптичних контактів між донорськими клітинами та нейронами реципієнта.

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей також продемонстровано, що ішемічне ушкодження гіпокампа викликає порушення когнітивних функцій (просторової пам'яті), а стереотаксична трансплантація НПК сприяє відновленню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку.

На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) показано, що сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після ПВЛ, зменшує деградацію основного білка мієліну та гальмує розвиток астро- та мікрогліозу. Для з'ясування патогенетичних механізмів ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції, а також для дослідження шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології створено нову експериментальну *in vitro* модель цієї патології на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

На створеній нами *in vitro* моделі ПВЛ уперше показано, що ММСК в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Рір-імунопозитивних олігодендроцитів.

Досліджено вплив трансформації НПК у напрямку надекспресії FGF-2 на поведінку цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку та можливість утворення ними локальних навколосудинних проліферативних кластерів із нейрогенним потенціалом.

Уперше показано, що надекспресія FGF-2 у НПК сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU-позитивних спіралеподібних проліферативних кластерів та утворенню пулу незрілих DCX-позитивних нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

Уперше показано, що НПК, які надекспресують EMMPRIN, мігрують у пошкоджену соматосенсорну кору далі порівняно із контрольними НПК та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу вперше показано, що GFP-негативні аксони щура формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з іПСК людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дослідження мають передусім фундаментальне значення, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про клітинні механізми нейропротекторної дії трансплантованих стовбурових клітин при ішемічних ушкодженнях головного мозку та особливості поведінки цих клітин в організмі. Використання GFP-мічених трансплантованих клітин дає можливість тривало простежувати їх

міграцію, інтеграцію та диференціювання в тканинах реципієнта.

Практичне значення одержаних результатів полягає в знаходженні нових підходів для лікування ішемічних уражень головного мозку та обґрунтуванні застосування методів клітинної терапії із використанням стовбурових клітин при цій патології.

Розроблену у дисертаційній роботі нову експериментальну *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку ПВЛ, а також для пошуку шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології.

Отримані дані дають нове розуміння взаємозв'язку між трансплантованими НПК, що надекспресують FGF-2, та судинами реципієнта. Створення штучної ектопічної нейрогенної ніші має практичне значення для подолання низького регенеративного потенціалу кори головного мозку завдяки підтримці міграційного та проліферативного стану НПК і збільшенні пулу незрілих нейронів, необхідних для регенерації мозку.

Перспективним джерелом донорського матеріалу при аутологічній трансплантації є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК). У наших експериментах з використанням фібробластів шкіри людини для отримання з них іПСК з подальшим диференціюванням їх у нейральному напрямку ми продемонстрували утворення синаптичних контактів між трансплантованими клітинами і нейронами реципієнта, що може стати майбутнім перспективним терапевтичним підходом у лікуванні наслідків ішемічного інсульту.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в матеріали науково-методичних рекомендацій кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та Центру молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія».

**Особистий внесок здобувача.** Автором особисто обрано і обґрунтовано напрямок і схему наукової роботи, проведено критичний аналіз літературних джерел відповідно до сучасних уявлень про нейральні стовбурові клітини та можливість їх застосування при ішемічному ушкодженні головного мозку. Сформульовані мета, основні завдання дисертаційної роботи, визначено репрезентативний об'єм наукових досліджень та комплекс методів, організовано і проведено основну частину експериментів, аналіз отриманих результатів, статистичну обробку фактичного матеріалу, його наукову інтерпретацію, узагальнення результатів і формулювання висновків.

Особисто здобувачем була виконана більшість представлених у роботі експериментів з моделювання ішемічного ушкодження мозку, культивування нейральних стовбурових клітин та їх трансплантації у мозок ішемізованих тварин.

Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України д.б.н. Т. А. Півневою та к.б.н. І. В. Лушніковою, співробітниками ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» к.мед.н. В.

М. Кириком та к.б.н. А. М. Устименко, співробітником Інституту нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України О. В. Гаращуком. Експерименти з використанням нейральних прогеніторних клітин, що надекспресують FGF-2 або EMMPRIN, були проведені на базі відділу фундаментальних нейронаук Женевського університету (керівник проф. Ж. З. Кіш) спільно з М. Канеміцу. Експерименти з використанням індукованих плюрипотентних стовбурових клітин людини були проведені на базі Лабораторії стовбурових клітин і відновлювальної неврології Лундського університету (керівник проф. З. Кокайя) спільно з Д. Торнеро.

**Апробація результатів дисертації.** Усі матеріали дисертації доповідалися на семінарах Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, а також на наукових симпозиумах і з'їздах: форумах Федерації Європейських нейрофізіологічних товариств (Амстердам, 2010; Барселона, 2012), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи» (Київ, 2010), конгресі Міжнародної організації з дослідження мозку (Флоренція, 2011), світовій конференції з регенеративної медицини (Лейпциг, 2011), конгресі Товариства нейронаук (Вашингтон, 2011), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології» (Київ, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє» (Київ, 2014), міжнародному симпозиумі «Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning» (Монпельє, 2015), а також на засіданнях сектору молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

**Публікації.** За результатами дослідження опубліковано 35 наукових робіт, з яких 21 стаття у вітчизняних та іноземних наукових журналах фахового спрямування та 14 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, дев'яти розділів, висновків та списку використаної літератури.

У першому розділі наведено критичний аналіз сучасних наукових літературних джерел щодо стану вивчення нейральних стовбурових клітин дорослого організму та можливості їх застосування при ішемічному ушкодженні головного мозку та перинатальній патології ЦНС.

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» описані експериментальні *in vivo* та *in vitro* моделі ішемічного ушкодження головного мозку, методи виділення та культивування стовбурових клітин різного генезу, методи конструювання лентивірусних векторів та трансдукції нейральних прогеніторних клітин, способи трансплантації стовбурових клітин, методи імуноцито- та гістохімії на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях, методи дослідження поведінкових реакцій експериментальних тварин.

У третьому-восьмому розділах наведено результати експериментальних досліджень і статистичний аналіз отриманих даних.



У дев'ятому розділі «Обговорення результатів» здійснено аналіз і узагальнення отриманих результатів дослідження, на основі яких зроблено висновки.

Список використаної літератури налічує 357 джерел.

Обсяг дисертації становить 335 сторінок, із них основного тексту – 266 сторінок. Дисертаційна робота ілюстрована 107 рисунками і 3 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літературних даних** має три підрозділи, в яких наведено сучасні уявлення щодо механізмів ішемічного ушкодження головного мозку та можливостей застосування стовбурових клітин різного генезу при цій патології. Аналіз літературних даних свідчить про те, що спроби використання стовбурових клітин при ішемічному ушкодженні головного мозку дають позитивні результати, проте ефективність такої трансплантації стовбурових клітин недостатньо висока. Досі не визначено який тип стовбурових клітин є найбільш безпечним і водночас ефективним для трансплантації при ішемічному ушкодженні головного мозку. Також значний інтерес викликає можливість компенсації наслідків ішемічного ушкодження нервової тканини шляхом активації власних репаративних механізмів. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаного у дисертаційній роботі.

### Матеріали і методи дослідження

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятими в установах Національної академії наук України.

В експериментах використовували піщанок монгольських (*Meriones unguiculatus*), щурів ліній Спрейг-Дуулі (Sprague Dawley), Вістар (Wistar) та атимічних голих щурів (Charles River), мишей лінії FVB "дикого" типу та FVB-C-Tg (GFPU) 5Nagy/J, трансгенних за зеленим флюоресцентним білком (GFP), яких утримували за стандартних умов та раціону харчування з вільним доступом до води.

У роботі були використані **експериментальні моделі ішемічного ушкодження головного мозку**: глобальна короткотривала ішемія, фокальна, гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку новонароджених щурів, *in vivo* та *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ). Нами була створена *in vitro* модель ПВЛ з використанням органотипової культури зрізів головного мозку 7-денних мишей лінії FVB. Зрізи культивували на пористих напівпроникних нітроцелюлозних мембранах (Millicell-CM, Millipore, MA), розміщених у CO<sub>2</sub>-інкубаторі на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5% CO<sub>2</sub>) та рідкого середовища у 6-лункових планшетах при 35 °C. ПВЛ

моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) для імітації процесу запалення. КГД створювалась у спеціальній камері, де газове середовище містило 95 % азоту ( $N_2$ ) і 5 %  $CO_2$ , а рідке середовище – PBS, 12,5 ммоль Нерес з додаванням сахарози (15 ммоль D-сахарози) замість глюкози. Тривалість КГД становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивалися і поверталися до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація протягом 24 та 48 годин). Після КГД у культуральне середовище додавали 100 нг/мл ЛПС (L4130, Sigma-Aldrich, США).

**Кількісна оцінка цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі.** Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі визначали колориметричним методом за допомогою тест-набору G1780 (“Promega”, USA). Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою спектрофотометру uniSPEC 2 (LLG, Німеччина) у мікрокуветах при довжині хвилі 492 нм. Проби відбиралися через 24 та 48 годин після експериментальних впливів (коли ефекти на життєздатність були достатньо виражені) у дублях та визначали середнє значень для кожної лунки. Як контроль використовували: 1 – середовище культивування з лунки, де не було органотипової культури (значення оптичної щільності якого віднімалося від показників, отриманих з експериментальних лунок); 2 – середовище культивування з лунки, де знаходилися необроблені ЛПС та КГД культури. Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину, нормалізованим до площі тканини у відповідній лунці.

**Адгезивні культури нейральних прогеніторних клітин (НПК)** отримували з фетального гіпокампа мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за GFP, або з субвентрикулярної зони (CB3) мозку новонароджених (P0) щурів лінії Спрейг-Доулі (Sprague Dawley). Очищену суспензію НПК отримували шляхом центрифугування у 22%-му розчині Percoll (Jenny et al., 2009). Отриману суспензію НПК культивували з щільністю  $4 \times 10^5$  клітин на 35-мм чашках Петрі, вкритих Matrigel (1:500), у середовищі Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad, CA) з додаванням 20 нг/мл FGF-2 людини (рекомбінантний, R&D, Міннеаполіс), 2 % B27 Supplement (Invitrogen), 2 mM L-глютаміну, 1 mM пірувату натрію, 2 mM N-ацетил-цистеїну і 1 % пеніциліну-стрептоміцину. Перед трансплантацією клітини трипсинізували на 5-ту добу культивування, центрифугували і ресуспендували в середовищі Neurobasal.

**Адгезивні культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК)** отримували з жирової клітковини або плаценти GFP-позитивних мишей. Клітинні суспензії культивувалися у повному середовищі DMEM-LG, яке містило 15 % FBS, антибіотики (пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)), 1:100 замінні амінокислоти (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в  $CO_2$ -інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 %  $CO_2$  при температурі 37 °C. Пасажування проводили

при досягненні 80 % конфлюентності моношару. Для трансплантації використовували клітини 2-3 пасажів. Фенотипічні характеристики культивованих ММСК визначали методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл проти поверхневих антигенів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117. Для введення отриманих стовбурових клітин в організм реципієнта використовували різні типи трансплантації: ксеногенну, алогенну та сингенну.

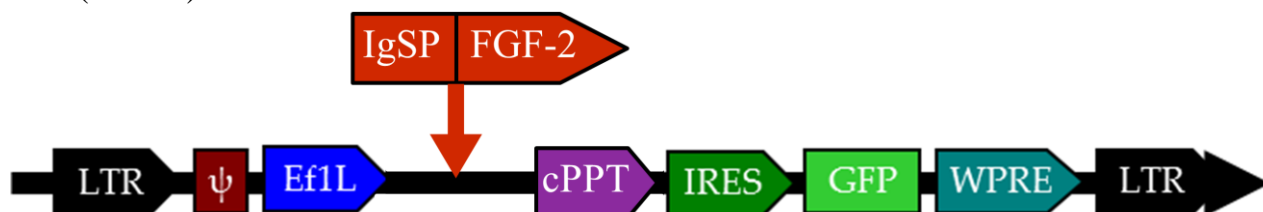
**Органотипову культуру зрізів головного мозку** отримували з новонароджених (P3) щурів Вістар. Зрізи висаджували на пористі напівпроникні нітроцелюлозні вставки (Millicell-CM, Millipore) і культивували при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> в 60 × 15 мм чашках Петрі, що містили 5 мл культурального середовища з 25 % кінської сироваткою. Через 6 годин культуральне середовище з сироваткою замінювали безсироваткове середовище (Neurobasal (Invitrogen) з додаванням B27, 200 мМ L-глутаміну, 1 М N-ацетил-цистеїну, 1 М Na-пірувату, 1 % пеніцилін-стрептоміцин).

НПК, трансдуковані лентивірусними векторами EMMPRIN-GFP або контрольним GFP, концентрували до 50 × 10<sup>3</sup> клітин/мкл і приблизно 0,5 мкл GFP-позитивної клітинної суспензії наносили на органотипові зрізи головного мозку. Зрізи інкубували при 37 °C протягом 90 годин з подальшою фіксацією у 4%-му розчині формальдегіду протягом 24 год при температурі 4 °C.

Для отримання **індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) людини** використовували метод ретровірусної трансдукції. Ретровірусні часточки для трансдукції отримували за допомогою трансфекції епітеліальних клітини PhoenixGP (ATCC, кат. №3514) плазмідами, що кодують вірусний глікопротеїн VSV-G (Addgene, кат. № 12259) і репрограмуєчі фактори: Oct4, Sox2, Klf4 і c-Myc (Addgene, кат. №17217-17220). Отриманими ретровірусними часточками двічі трансдукували культуру фібробластів шкіри людини. Після трансдукції клітини висаджували у культуральні плашки, які містили ембріональні фібробласти миші. На 6-у добу після трансдукції культуральне середовище було замінено на середовище для культивування іПСК людини, що містило DMEM/F12 та 0,1 мМ замінних амінокислот, 1 мМ L-глутаміну, 0,1 мМ β-меркаптоетанолу і 50 нг/мл FGF-2 (Life Technologies), а потім середовище міняли через день. Для нейронного диференціювання іПСК індукували формування ембріональних тілець (ЕТ) шляхом посіву колоній на неадгезивні культуральні чашки, які містили середовище для культивування іПСК людини без додавання FGF-2. Через 2 доби для отримання довготривалих ліній нейроепітеліїподібних стовбурових клітин, плаваючі розетки дисоціювали з використанням трипсину з подальшим гальмуванням дії трипсину інгібітором трипсину (Life Technologies). Клітини центрифугували протягом 5 хвилин при 300 g і потім культивували у плашках, покритих полі-L-орнітином і 10 мкг/мл ламініном (Sigma) у тому ж середовищі з додаванням 10 нг/мл FGF-2, 10 нг/мл EGF (R&D Systems, Міннеаполіс, США) та 1 мкл/мл B27 (Life Technologies). НПК, отримані з іПСК, пасажували в співвідношенні 1:2–1:3 кожну другу або третю добу з використанням трипсину (Sigma).

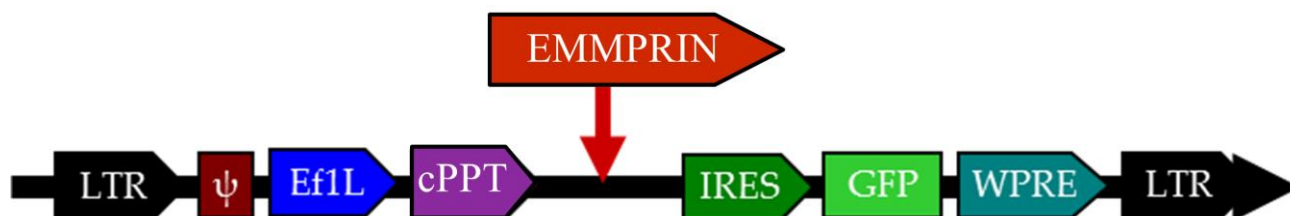
**Конструювання лентивірусних векторів та трансдукція НПК.** Для трансдукції НПК було створено 2 конструкції на основі лентивірусних векторів:

1) pWPI\_SPbFGF лентивірусний вектор, який кодує фактор росту фібробластів FGF-2. кДНК, що кодує FGF-2 людини (18 кДа), була сполучена з сигнальним пептидом імуноглобуліну (IgSP), який покращує секрецію FGF-2 (Rinsch et al., 2001). Отриману конструкцію клонували в біцистронний лентивірусний вектор pWPI. pWPI - це SIN вектор, отриманий з BIL-1, що містить альфа промотор EF1 і цистрон EMCV-IRES-GFP. FGF-2 був клонований в сайт PmeI, розташований між EF1 альфа промотором і послідовністю IRES-GFP (Рис. 1).



**Рис. 1.** Схематичне зображення конструкції лентивірусного вектора pWPI\_SPbFGF.

2) Для створення EMMPRIN лентивірусного вектора використовували кДНК, що кодує EMMPRIN людини (28 кДа). кДНК була люб'язно надана професором Jian Cao (Stony Brook University). кДНК клонували в лентивірусний вектор pWPI, що містив альфа промотор EF1 і цистрон EMCV-IRES-GFP/Tomato (Рис. 2).



**Рис. 2.** Схематичне зображення конструкції лентивірусного вектора EMMPRIN.

У контрольному лентивірусному векторі pFUGW експресія GFP була під контролем промотора убіквітину.

Лентивірусні вектори були сконструйовані, концентровані і титровані відповідно до стандартних протоколів. Контрольні та FGF-2 лентивірусні вектори мали титри в діапазоні від  $10^8$  до  $10^9$  трансдукуючих одиниць (ТО)/мл. НПК (50 000–75 000 клітин на 35 мм чашку Петрі) трансдукували на третю добу культивування контрольним або FGF-2 лентивірусними векторами у концентрації від  $5 \times 10^4$  до  $5 \times 10^5$  ТО.

**Ін'єкція BrdU.** Для виявлення клітин, що проліферують, тваринам перед забором матеріалу для морфологічних досліджень вводили 5-бромдезоксіуридин (BrdU). Ін'єкції BrdU (50 мг/кг) робили

внутрішньоочеревинно протягом 2 діб перед забором матеріалу двічі на день.

**Ін'єкція лентивірусного вектора.** Перед ін'єкцією лентивірусного вектора новонароджених (P0) щурів Wistar наркотизували сумішшю ізофлуран (Foren; 100 %), 30 % O<sub>2</sub> і 70 % повітря. 2 мкл концентрованої суспензії лентивірусного вектора вводили в бічний шлуночок за допомогою шприца Hamilton (10 мкл Hamilton (Reno, NV) з голкою 28-го калібру) за такими координатами від брегми: 0,5 мм lateral, 0,5 мм anterior і 2 мм вглиб від поверхні мозку.

Дослідження **поведінкових реакцій тварин** здійснювали з використанням таких тестів: "водний лабіринт Морріса" (оцінка просторової пам'яті) і тест "діставання і виймання їжі" (оцінка кортикоспинальної функції).

**Таймлапс аналіз EMMPRIN-трансформованих нейтральних прогеніторних клітин.** Для таймлапс (time-lapse) аналізу ефекту надекспресії EMMPRIN у НПК культуру трансформованих лентивірусами (EMMPRIIN або контрольним) клітин поміщали в камеру флюоресцентного мікроскопа Eclipse TE2000-U (Nikon Corp., Zürich, Switzerland). У камері мікроскопа підтримувалися температура 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. Клітини фотографувалися протягом 6 годин з 5-хвилинними інтервалами. Зображення клітин були отримані за допомогою цифрової камери (Retiga EX: Qimaging, Burnaby, Канада) та програмного забезпечення OpenLab. Аналіз відстеження окремих клітин був виконаний за допомогою програмного забезпечення Metamorph (Molecular Devices, версія 7.4). Для кількісної оцінки випадковим чином обирали двадцять клітин на культуральну чашку.

**Імуногістохімічний аналіз GFP-позитивних трансплантованих клітин на електронно-мікроскопічному рівні.** Вібратомні зрізи головного мозку завтовшки 150 мкм інкубували протягом ночі з первинними антитілами проти GFP (1:500, Novus Biologicals) при 4 °C. Потім тканину інкубували при кімнатній температурі протягом 2 год з біотинілізованими вторинними антитілами (1:200, DakoCytomation). Для візуалізації вторинних антитіл використовували авідин біотин пероксидазний комплекс (Vector Laboratories) з подальшою інкубацією з 3,3'-діамінобензидином тетрахлоридом (DAB) і 0,015 % перекисом водню. Після DAB реакції зрізи дофіксували в 1 % розчині осмію (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М ФБ, у висхідних концентрацій спирту, а потім переносили в епоксидну смолу Епон. Ультратонкі зрізи нарізали за допомогою діамантового ножа і контрастували цитратом свинцю і ураніл ацетатом. Для ідентифікації GFP/DAB-мічених клітин і синаптичних контактів зрізи досліджували на електронному мікроскопі JEOL 100-CX (JEOL, Японія).

**Імуногістохімічний аналіз вібраторних зрізів** головного мозку проводили з використанням специфічних первинних антитіл:

№	Назва	Фірма-виробник
1	Rabbit anti-Aquaporin-4 (AQP-4)	Abcam
2	Rat anti-BrdU, clone BU1/75	Oxford Biotech
3	Mouse anti-CD34	BD Biosciences
4	Mouse anti-CD44	BD Biosciences
5	Mouse anti-CD45	BD Biosciences

6	Mouse anti-CD73	BD Biosciences
7	Mouse anti-CD90	BD Biosciences
8	Mouse anti-CD117	BD Biosciences
9	Mouse anti-Desmin	Abcam
10	Goat anti-Doublecortin (DCX)	Santa Cruz
11	Rabbit anti-EGFR	Abcam
12	Mouse anti-human EMMPRIN	BD Bioscience
13	Goat anti-rat EMMPRIN	Santa Cruz Biotechnology
14	Rabbit anti-GFAP	DakoCytomation
15	Anti-human GFAP	RNDsystems
16	Goat anti-GFP	Novus Biologicals
17	Rabbit anti-Iba-1	Wako
18	anti-MBP	SigmaAldrich
19	Mouse anti-Nestin, clone rat-401	Chemicon
20	Mouse anti-NeuN, clone A60	Chemicon
21	Mouse anti-NG2	Millipore
22	Mouse anti-RECA-1, clone HIS52	Serotec
23	Mouse anti-Rip	Abcam
24	Goat anti-SOX2	Santa Cruz Biotechnology
25	Rabbit anti-Turbored	Evrogen JSC

Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з Alexa Fluor 488, 555, 568, 594 та 647 (1:1000, Molecular Probes Inc., США). Пофарбовані зрізи покривали середовищем Immu-MOUNT (Thermo Scientific, США) та досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

Для **обробки та статистичного аналізу** результатів використовували такі програми: Statistica (версія 5, Statsoft, США) та XLSTAT 2009.4.06 (Addinsoft, США). Для аналізу вибірок визначали середнє значення, стандартну похибку середнього, стандартне відхилення середнього. *t*-тест Стюдента використовували для визначення достовірності різниці у експериментальних групах, що відповідали нормальному розподілу. Нормальність розподілу всіх рядів отриманих значень у експериментах з трансплантацією фетальної нервової тканини перевіряли з використанням тесту Шапіро-Вілка. Розподіл значень лінійної щільності (ЛЩ) інтактних пірамідних клітин на 1 мм довжини CA1 зони гіпокампа в експериментальних групах, в яких він не відповідав вимогам нормального, наведений у вигляді «медіана (I квартиль-III квартиль)». Значення ЛЩ порівнювали за допомогою U-критерія Манна-Вітні. Розподіл значень ширини променистого шару (ШПШ) у групах, де його вимірювання було можливим, задовольняв вимоги нормального розподілу. Тому значення ШПШ наведені у вигляді середнє  $\pm$  стандартне відхилення, порівняння проводили з використанням *t*-тесту Стюдента. Різницю вважали достовірною при  $P < 0,05$ .

## Результати досліджень та їх обговорення

**Вплив пізньої трансплантації фетальної нервової тканини (ФНТ) на структуру гіпокампа щурів у віддаленому періоді після ішемічного ушкодження мозку.** Досліджували вплив більш пізньої (через 30 діб після ішемічного ураження головного мозку) трансплантації ФНТ на структуру гіпокампа дорослих лабораторних щурів у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс).

Морфометричний аналіз показав, що лінійна щільність (ЛЩ) інтактних пірамідних клітин на 1 мм довжини СА1-зони гіпокампа контрольних тварин становила 198 (182–208) кл/мм. Променистий шар мав радіально орієнтовані рівнобіжні апікальні дендрити, його ширина (ШПШ) становила  $682 \pm 36$  мкм.

Через 7 місяців після ішемії-реперфузії пірамідні нейрони в СА1-зоні гіпокампа були розташовані у 2–3 ряди з ЛЩ 134 (117–154) кл/мм. Нейропіль, зокрема в променистому шарі, містив достатньо великі ділянки мікровакуолізації ближче до лакунозно-молекулярного шару, однак структура променистого шару наближалась до нормальної. Ширина променистого шару (ШПШ) становила  $432 \pm 108$  мкм.

Пізня, через 30 діб після ішемії, стереотаксична трансплантація суспензії ФНТ в СА1 зону гіпокампа щурів, що перенесли транзиторну глобальну ішемію головного мозку, сприяла відновленню цитоархітекτονіки гіпокампа навіть у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс) шляхом зростання лінійної щільності нейронів (до 150 (128–168) кл/мм порівняно із групою ішемії – 134 (117–154) кл/мм,  $U = 1414$ ,  $U_p = 1920$ ,  $P = 0,012$ ) у пірамідному шарі. У ділянках введення трансплантату спостерігали розрідження пірамідного шару, яке повністю нівелювалось на відстані 60–70 мкм від точки трансплантації. Структура нейропіля променистого шару відповідала нормальній, зі збереженням рівнобіжності волокон, ШПШ становила  $582 \pm 130$  мкм порівняно із групою ішемії –  $432 \pm 108$  мкм,  $t = -7,88$ ,  $t_{крит} = 1,65$ ,  $P < 1 \times 10^{-9}$ . Ділянки мікровакуолізації поодинокі. Також трансплантація ФНТ сприяла зменшенню кількості GFAP-позитивних астроцитів порівняно із групою ішемізованих тварин без трансплантації ФНТ.

Отже, пізня, через 30 діб після ішемії, трансплантація суспензії фетальної нервової тканини, що містить клітини СА1-зони та зародкової зубчастої звивини, спричиняє тривале стимулювання репаративних процесів у гіпокампі і прискорює відновлення його цитоархітекτονіки шляхом зростання ЛЩ нейронів у пірамідному шарі та ШПШ, а також зменшення реактивного астрогліозу.

**Вплив трансплантації НПК на стан нервової тканини та поведінкові реакції мишей після ішемічного ушкодження мозку.** Із результатів попереднього дослідження виникає питання: завдяки чому відбуваються репаративні процеси у гіпокампі – структурній та функціональній інтеграції трансплантованих клітин у нейронні мережі реципієнта та довготривалому їх виживанню чи завдяки гуморальному ефекту – короткотривалому існуванню донорських клітин, їх загибелі і вивільнені нейропротекторних факторів?



Для відповіді на це питання необхідно помітити трансплантовані клітини для дослідження їх міграції, інтеграції та можливого диференціювання у тканині реципієнта. Тому в подальших експериментах ми використовували НПК, мічені зеленим флюоресцентним білком (GFP).

Методом проточної цитометрії на лазерному цитофлюориметрі-сортері FACS Aria («Becton Dickinson», США) визначали відсоток життєздатних свіжоізолюваних нейральних прогеніторних клітин після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD).

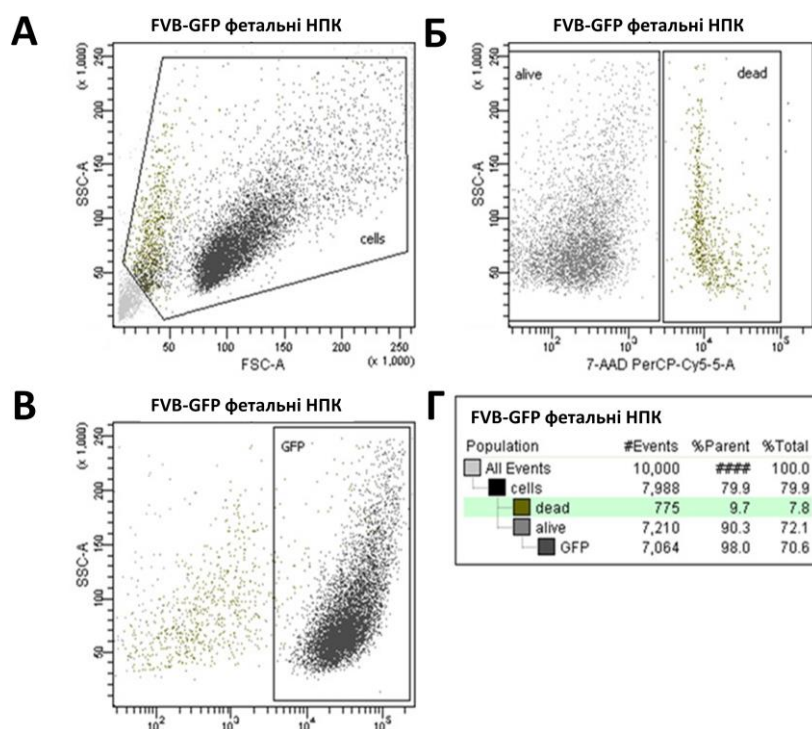
Відсоток життєздатних клітин після виділення з гіпокампа і очищення становив від 89,8 % до 93,5 %. Вміст GFP-позитивних клітин серед життєздатних у даній фракції становив від 97,5 % до 99,6 % (Рис. 3).

Імуноцитохімічний аналіз показав, що на третю добу культивування більшість клітин ( $95,2 \pm 2,4$  %) експресували нестін, що характерно для нейральних клітин-попередників (Kempermann et al., 2004).

Імуногістохімічне фарбування зрізів головного мозку мишей показало, що на 7-му добу після трансплантації фетальних НПК основна кількість GFP-позитивних клітин знаходилась на епендимальній поверхні 3 шлуночка мозку і була представлена округлими клітинами без відростків.

На 14-ту добу після трансплантації GFP-позитивні клітини мігрували у зону ішемічного ушкодження, вбудовувалися в CA1 зону гіпокампа та диференціювалися в клітини з нейронним (експресія маркера NeuN) та гліальним (GFAP-позитивні) фенотипом.

На 90-ту добу GFP-позитивні нейрони мали добре розгалужене дендритне дерево з чітко вираженими шипиками, що може свідчити про утворення синаптичних контактів між трансплантованими клітинами та нейронами гіпокампа реципієнта.



**Рис. 3.** Визначення за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACS Aria кількості життєздатних і GFP-позитивних клітин. (А) Відбір популяції непошкоджених клітин. (Б) Виявлення загинувших клітин на каналі флюоресценції PerCP-Cy5.5. (В) Виявлення GFP-позитивних живих клітин на каналі флюоресценції FITC. (Г) Абсолютна та відносна кількість проаналізованих клітин за ієрархією аналізу.



Ультраструктурний аналіз показав, що дійсно GFP/DAB-позитивні постсинаптичні структури утворювали контакти із GFP-негативними пресинапсами (Рис. 4).

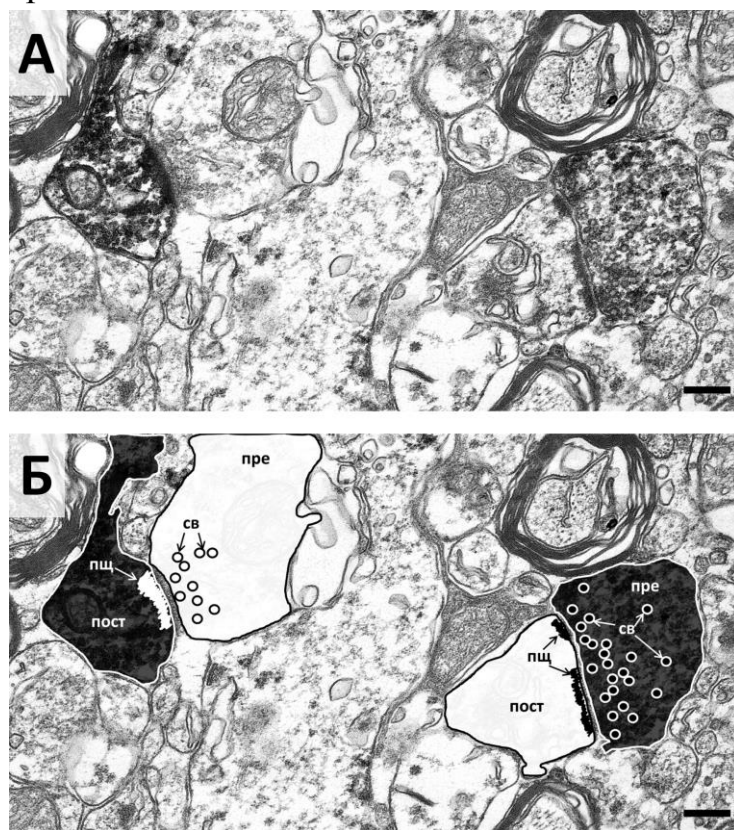
Ультраструктурні характеристики синаптичних контактів, утворених донорськими клітинами, не відрізнялися від синапсів у гіпокампі реципієнта.

Спостерігали різні типи синаптичних контактів: прості, що мали безперервну ПЩ (Рис. 4 лівий синапс) і перфоровані з переривчастою ПЩ (Рис. 4 правий синапс).

Отже, ультраструктурний аналіз показав, що субокципітальна трансплантація GFP-позитивних фетальних нейральних клітин сприяла утворенню синаптичних контактів між донорськими клітинами та нейронами реципієнта на 90-ту добу після трансплантації ішемізованим тваринам.

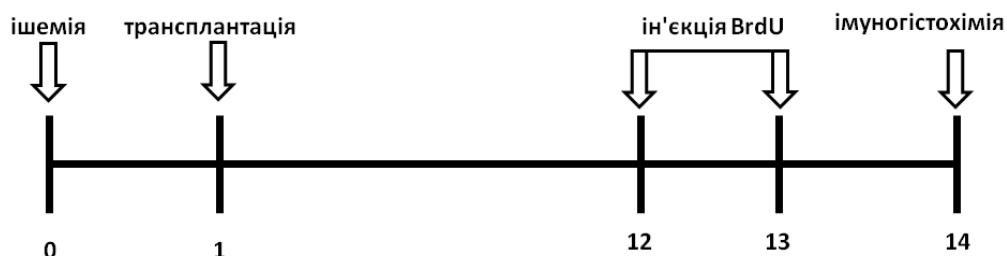
Крім паратопічної трансплантації (введення трансплантату в лікворний простір головного мозку шляхом субокципітальної пункції) досить поширеною є ортотопічна – інтрацеребральне введення нейротрансплантату в певні структури головного мозку за допомогою стереотаксичної техніки. Тому в подальших експериментах ми використовували стереотаксичну трансплантацію.

Через 24 години після двобічної оклюзії загальних сонних артерій мишам лінії FVB стереотаксично трансплантували у гіпокамп свіжоізолювані GFP-позитивні нейральні прогеніторні клітини.



**Рис. 4.** Електронограма GFP/DAB-позитивних синаптичних контактів. (А) Два GFP/DAB-позитивні синаптичні контакти. Зліва – простий синапс з безперервною постсинаптичною щільністю (ПЩ) у GFP/DAB-позитивній постсинаптичній структурі (ПОСТ), що контактує з GFP-негативною пресинаптичною термінальною (ПРЕ). Справа – перфорований синапс з чітким перериванням ПЩ у GFP/DAB-негативній постсинаптичній структурі (ПОСТ), що контактує з GFP-позитивною пресинаптичною термінальною (ПРЕ). (Б) Схематичне зображення електронограми (А). Чорним кольором позначені GFP/DAB-позитивні структури, білим – GFP/DAB-негативні. СВ – синаптичні везикули. Шкала = 0,2 мкм.

Для дослідження впливу трансплантації НПК на ендогенний нейрогенез у мишей після ішемічного ушкодження мозку за дві доби до забору матеріалу для морфологічних досліджень тваринам з усіх експериментальних груп вводили BrdU – синтетичний нуклеозид, здатний замінювати тимідин у процесі реплікації ДНК, вбудовуючись в нову ДНК, що дозволяло виявляти пул проліферуючих клітин (**Рис. 5**).



**Рис. 5.** Схема експерименту.

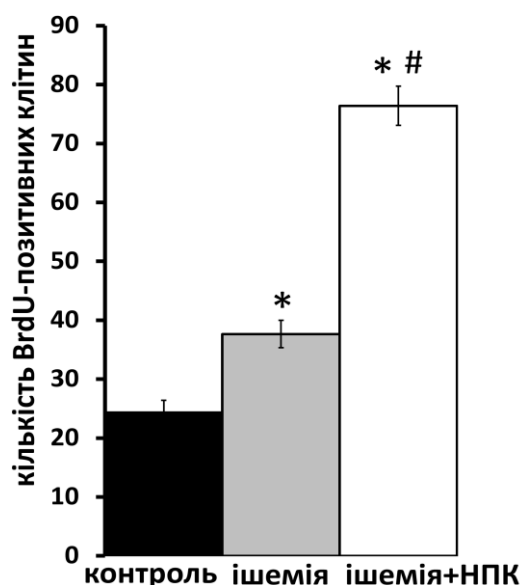
Кількість BrdU-позитивних клітин підраховували в зубчастій звивині в кожному 5-му фронтальному зрізі мозку (координати: від 1,7 мм до 2,3 мм posterior від брегми). Усього було досліджено по 5 зрізів на тварину.

Імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням антитіл до BrdU показало, що в гіпокампі контрольних тварин спостерігався базовий рівень включення BrdU в клітини субгранулярної зони зубчастої звивини і кількість BrdU-позитивних клітин становила  $24,33 \pm 2,06$  (**Рис. 6**).

Після ішемії-реперфузії мозку у мишей лінії FVB спостерігалось збільшення кількості BrdU-мічених ядер і їх значення сягало  $37,66 \pm 2,33$  (**Рис. 6**).

Трансплантація нейральних прогеніторних клітин збільшувала кількість BrdU-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини вдвічі порівняно із групою ішемії і становила  $76,4 \pm 3,33$  (**Рис. 6**).

BrdU-позитивні клітини у тварин усіх експериментальних груп утворювали проліферативні кластери у субгранулярній зоні, що є характерним для клітин-попередників зубчастої звивини (Gould et al., 1997).



**Рис. 6.** Кількість BrdU-мічених клітин у зубчастій звивині гіпокампа тварин контрольної групи, ішемічної та групи ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ), # – статистично достовірна відмінність порівняно з групою ішемізованих тварин ( $P < 0,05$ ).

Імуногістохімічний аналіз із використанням антитіл проти даблкортин (DCX) – маркера незрілих неронів – показав, що після ішемії-реперфузії спостерігалось збільшення кількості DCX-позитивних клітин ( $227,67 \pm 10,27$ ) у тварин 2-ї групи (ішемія) порівняно із контрольною групою, в якій кількість DCX-позитивних клітин становила  $136,33 \pm 6,36$  (Рис. 7).

У тварин 3-ї групи (ішемія+трансплантація НПК) кількість DCX-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини збільшувалась в 1,6 рази порівняно із 2-ю групою тварин і становила  $362,6 \pm 18,56$  (Рис. 7).

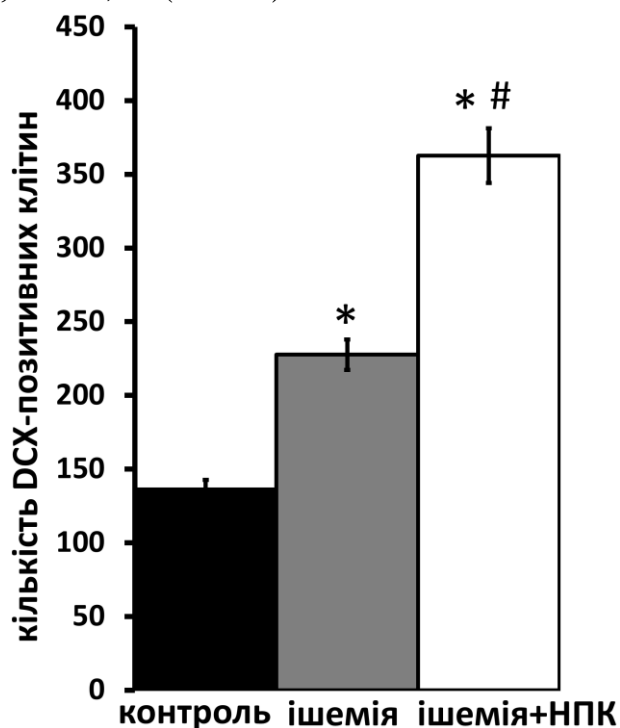
Отже, НПК, трансплантовані в гіпокамп ішемізованих мишей, здатні стимулювати ендогенний нейрогенез у субгранулярній зоні зубчастої звивини.

Вплив ішемічного ушкодження головного мозку на когнітивні функції і можливий нейропротекторний ефект трансплантації НПК у нашій роботі були оцінені за допомогою поведінкового тесту – водний лабіринт Морріса (ВЛМ).

У тварин контрольної групи, час пошуку платформи становив  $35,3 \pm 3,4$  с на 12-ту добу, а потім зменшувався до  $20,3 \pm 2,1$  с на 15-ту добу (Рис. 8).

У порівнянні з контрольними, ішемізовані тварини мали більш високі показники, що свідчило про дефіцит просторової пам'яті і здатності до навчання. Час пошуку платформи у цій групі тварин також зменшувався з 12-ї доби до 15-ї доби і становив  $48 \pm 2,7$  с і  $32 \pm 2,3$  с, відповідно (Рис. 8).

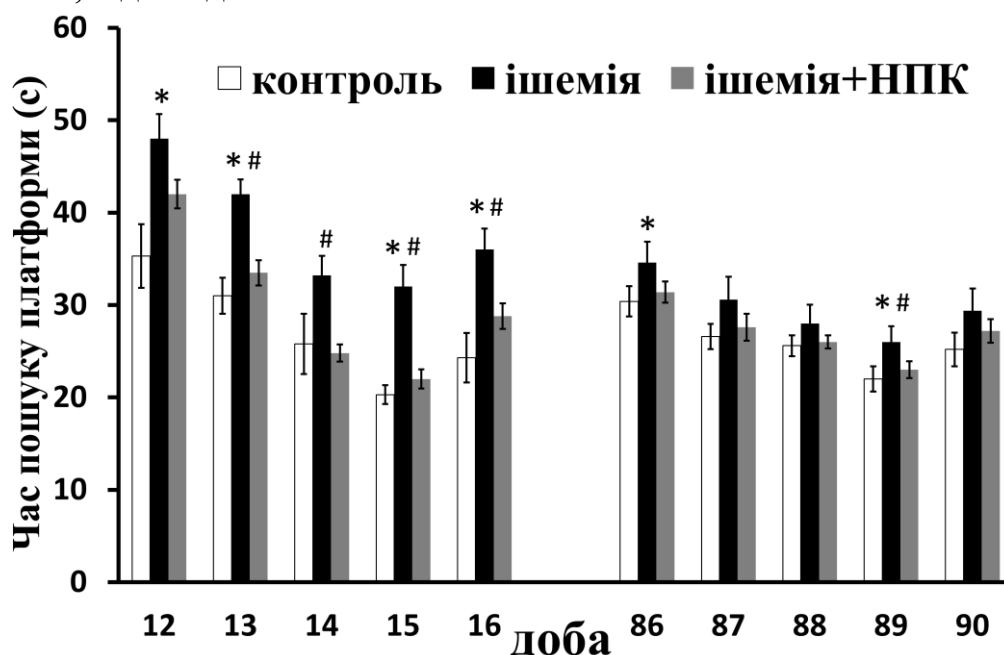
У групі тварин з трансплантацією НПК після ішемічного ушкодження мозку спостерігався більш швидкий регрес когнітивних порушень, зокрема зниження дефіциту просторової пам'яті й здатності до навчання. Час пошуку у цій групі зменшувався з 12-ї доби до 15-ї доби і становив  $42 \pm 1,5$  с і  $22 \pm 1,0$  с, відповідно (Рис. 8).



**Рис. 7.** Кількість DCX-мічених клітин у зубчастій звивині гіпокампа тварин контрольної групи, ішемічної та групи ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ), # – статистично достовірна відмінність порівняно з групою ішемізованих тварин ( $P < 0,05$ ).

На 16-ту добу, коли платформа була занурена під поверхню води, час пошуку платформи збільшився у всіх групах тварин і становив  $24,3 \pm 2,7$ ,  $36 \pm 2,3$  і  $28,8 \pm 1,4$  с у контрольних, ішемізованих та групі з ішемією плюс трансплантація НПК, відповідно.

З 86-ї по 89-ту добу час пошуку платформи знижувався у всіх експериментальних групах тварин, а на 90-ту добу, коли платформа була занурена, час збільшувався у всіх групах і становив  $25,2 \pm 1,8$ ,  $29,4 \pm 2,4$  і  $27,2 \pm 1,3$  у контрольних, ішемізованих та групі з ішемією плюс



**Рис. 8.** Час пошуку платформи у водному лабіринті Морріса. Графік демонструє середній час пошуку платформи тваринами у контрольній групі, ішемічній та групі ішемізованих тварин, яким трансплантували НПК (ішемія+НПК). \* –  $P < 0,05$  порівняно з контрольною групою, # –  $P < 0,05$  порівняно з групою тварин з ішемією плюс трансплантація НПК.

трансплантація НПК, відповідно. У цей проміжок часу не спостерігалось статистично достовірних відмінностей в усіх експериментальних групах, за винятком 86-ї і 89-ї доби. Не існувало жодних статистично достовірних відмінностей між контрольними тваринами і групою «ішемія плюс трансплантація НПК» у всі часові інтервали.

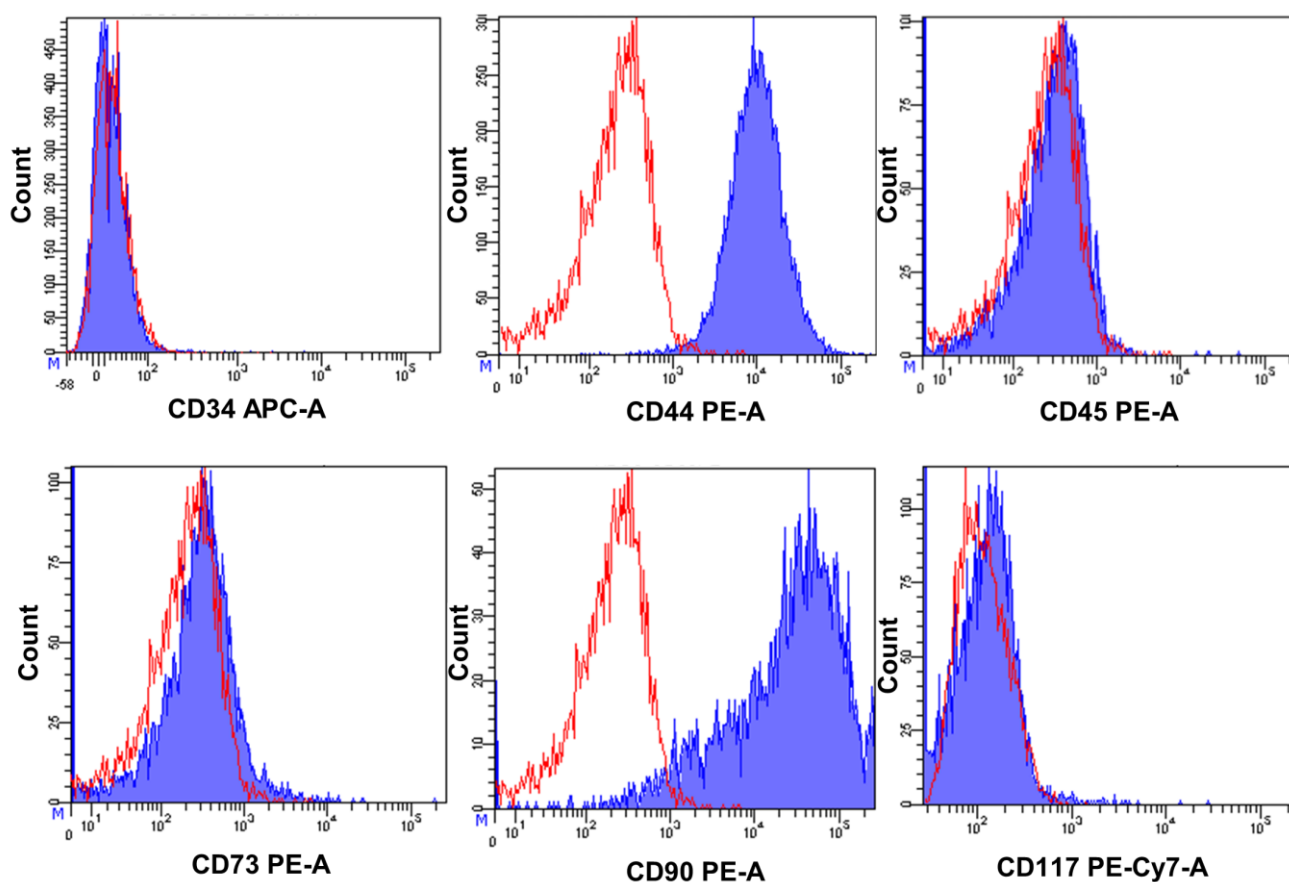
Таким чином, двостороння оклюзія загальних сонних артерій може викликати порушення когнітивних функцій (просторової пам'яті). Стереотаксична трансплантація НПК сприяє відновленню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку.

**Вплив трансплантації ММСК на стан нервової тканини і поведінкові реакції мишей після ПВЛ.** У попередніх експериментах для моделювання ішемічного інсульту ми використовували дорослих тварин. Але проблема ішемічного ушкодження головного мозку актуальна не лише для дорослого населення. Тому в наступній серії експериментів ми досліджували вплив трансплантації стовбурових клітин на стан нервової тканини і поведінкові

реакції експериментальних тварин при перинатальній патології ЦНС.

Перспективним клітинним агентом у регенеративній медицині є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК). Показано, що ММСК мають тропність до зони пошкодження, можуть пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи завдяки фізичній та/або хімічній взаємодії з клітинами імунної системи (Ahn et al., 2014). Вони забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, власне для самих себе. При цьому використання аутологічних ММСК дозволило б вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу (Chernykh et al., 2014). Тому в наших подальших експериментах із моделюванням перинатальної патології ЦНС ми використовували ММСК.

Адгезивну культуру ММСК отримували з жирової клітковини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J. При фенотипуванні культури ММСК жирової клітковини методом проточної цитометрії виявлено високий рівень експресії маркерів CD44, CD73, CD90, при цьому відносний вміст клітин з експресією гемопоетичних маркерів CD45 та CD117 становив менше 2 % (**Рис. 9**).



**Рис. 9.** Експресія маркерів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 в культурі ММСК жирової клітковини, пасаж 2.

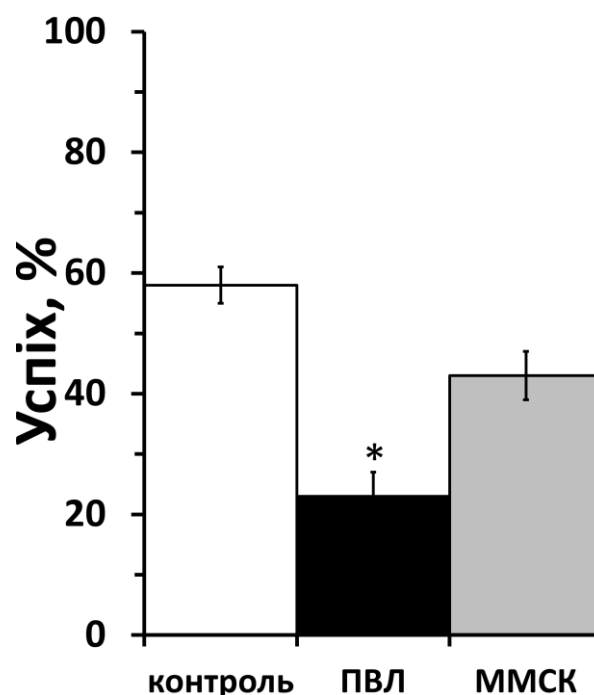
Для дослідження впливу трансплантації ММСК на поведінкові реакції мишей використовували модель перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo*.

Після моделювання ПВЛ прооперовані тварини відставали у розвитку у порівнянні із контрольними мишами. Тварини з моделлю ПВЛ мали меншу вагу і зріст та розлади статокінетичного рефлексу.

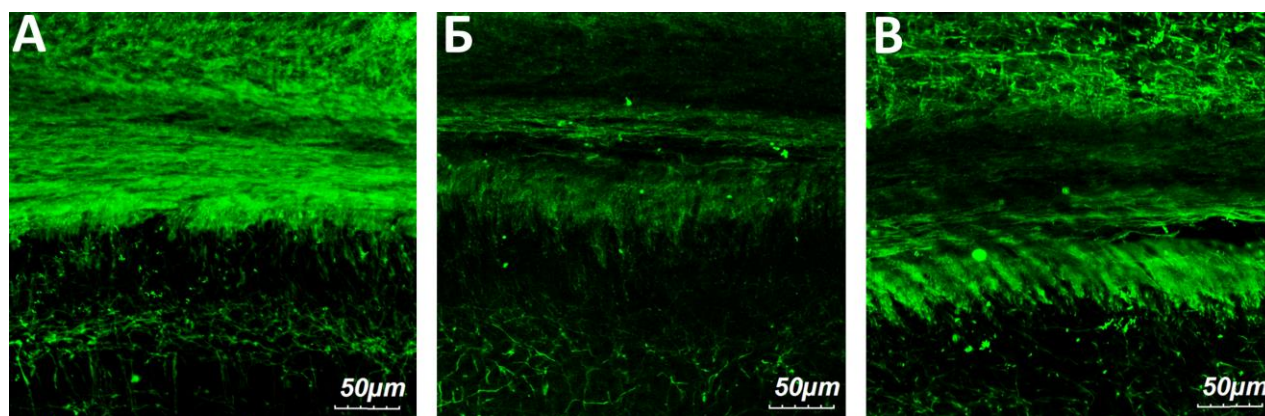
Поведінковий тест «діставання і виймання їжі» показав, що у порівнянні з контрольними, тварини з ПВЛ мали більш низькі показники успішних спроб. Успіх у контрольних тварин становив  $58 \pm 3 \%$ , а у тварин з ПВЛ –  $23 \pm 4\%$  (Рис. 10).

У групі тварин з трансплантацією ММСК після моделювання ПВЛ спостерігалось відновлення кортикоспинальної функції і кількість успішних спроб становила  $43 \pm 4 \%$  (Рис. 10).

Для оцінки ступеня ушкодження, спричиненого ПВЛ, використовували імуногістохімічне фарбування на основний білок мієліну (МВР) і шкалу від 0 до 5. Імуногістохімічний аналіз показав, що у контрольних тварин мозолисте тіло інтенсивно зафарбовувалося антитілами до основного білка мієліну і за шкалою оцінки відповідало 0 (Рис. 11).



**Рис. 10.** Оцінка кортикоспинальної функції за допомогою поведінкового тесту «діставання і виймання їжі». ПВЛ – перивентрикулярна лейкомаляція, ММСК – мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини. \* –  $P < 0,05$  порівняно з контрольною групою.



**Рис. 11.** Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованого на основний білок мієліну (МВР). (А) Контрольна тварина. (Б) Тварина з ПВЛ. (В) Тварина з ПВЛ та трансплантацією ММСК (30-а доба після трансплантації).

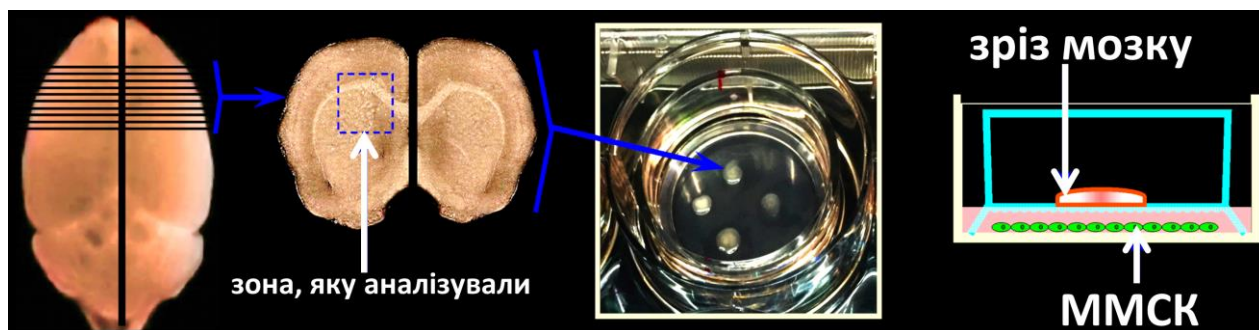


Після перивентрикулярної лейкомаляції інтенсивність фарбування на МВР зменшувалася і відповідала за шкалою оцінки пошкодження від 3 до 4, а після трансплантації ММСК – від 1 до 2 (**Рис. 11**). Трансплантація ММСК також гальмувала розвиток як мікро- так і астрогліозу.

Таким чином, моделювання ПВЛ може викликати порушення кортикоспинальної функції, що є результатом ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і активації астро- і мікроглії. Сингенна стереотаксична трансплантація ММСК сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після ПВЛ, зменшує деградацію МВР і гальмує розвиток гліозу.

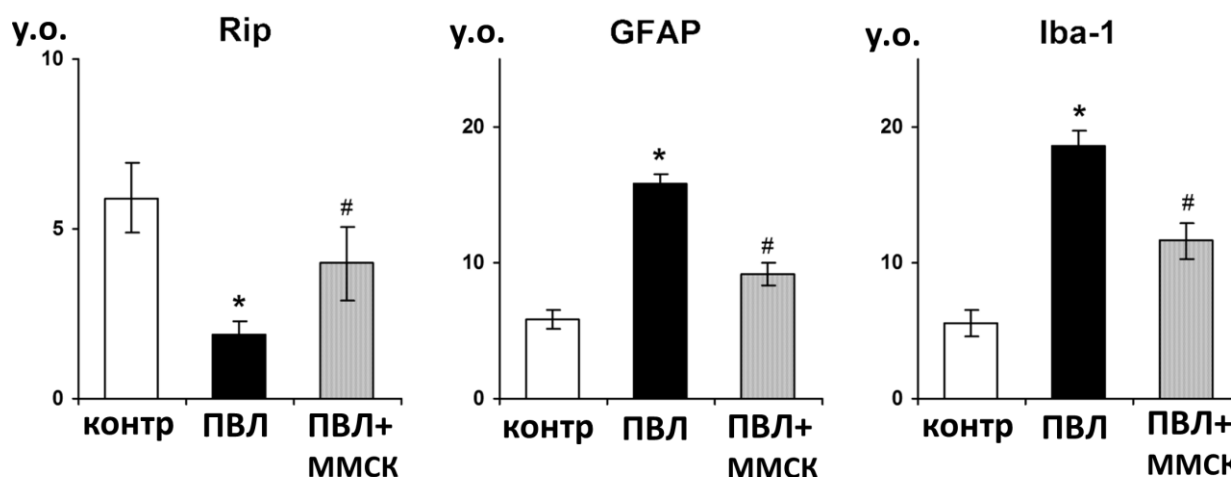
**Моделювання ПВЛ *in vitro* на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.** Для оцінки терапевтичного ефекту фармакологічних засобів та регенеративного потенціалу різних типів стовбурових клітин при захворюваннях ЦНС актуальним залишається вибір адекватних моделей пошкодження нервової тканини *in vitro* та *in vivo*. Найбільш прийнятними для моделювання патологічних процесів *in vitro* та розробки стратегій їх корекції є органотипові культури. Тому метою подальших експериментів була розробка *in vitro* моделі ПВЛ на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

З цією метою ММСК 2-го пасажу переносили в 6-лункові планшети для подальшого безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку, які культивувалися на пористих напівпроникних мембранах (**Рис. 12**).



**Рис. 12.** Схема безконтактного співкультивування ММСК з органотиповою культурою зрізів головного мозку мишей. Квадратом позначена зона, яку брали для імуногістохімічного аналізу.

Імуногістохімічний аналіз культивованих зрізів головного мозку на наявність маркера олігодендроцитів Рір, показав, що через 48 годин після моделювання ПВЛ та безконтактного співкультивування зрізів мозку з ММСК відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Рір-позитивних олігодендроцитів ( $4,0 \pm 1,1$  у.о.) у порівнянні з групою ПВЛ ( $1,9 \pm 0,4$  у.о.), але не сягало контрольного значення ( $5,9 \pm 1,1$  у.о.) (**Рис. 13**).



**Рис. 13.** Гістограми інтегральної щільності флюоресценції в умовних одиницях (у.о.) імунопозитивних клітин. Контр – контрольні умови, ПВЛ – через 48 годин після моделювання ПВЛ, ПВЛ+ММСК – після ПВЛ і безконтактного співкультивування з ММСК. \* – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем, # – порівняно з ПВЛ ( $P < 0,05$ ). Rip – маркер олігодендроцитів, GFAP – маркер астроцитів, Iba-1 – маркер мікроглії.

Оцінка інтегральної щільності флюоресценції GFAP- та Iba-1-позитивного сигналу показала, що ПВЛ призводило до збільшення відповідного сигналу (GFAP+, Iba-1+) у порівнянні з контрольною групою. У випадку астроцитів інтегральна щільність флюоресценції GFAP-позитивного сигналу через 48 годин після моделювання ПВЛ збільшилася до  $15,8 \pm 0,7$  у.о. порівняно із контрольною групою ( $5,8 \pm 0,7$  у.о.) (**Рис. 13**).

У групі ПВЛ також збільшилася інтегральна щільність флюоресценції Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин до  $18,6 \pm 0,7$  у.о. порівняно із контролем –  $5,5 \pm 0,9$  у.о. (**Рис. 13**).

Через 48 годин після моделювання ПВЛ та безконтактного співкультивування зрізів мозку з ММСК спостерігалось зменшення GFAP- та Iba-1-імунопозитивних сигналів порівняно з групою ПВЛ. Інтегральна щільність флюоресценції GFAP- та Iba-1-позитивних сигналів становила  $9,2 \pm 0,8$  у.о. і  $11,6 \pm 1,3$  у.о. відповідно (**Рис. 13**).

Таким чином, ми показали, що ММСК в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину після моделювання ПВЛ *in vitro*, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Rip-імунопозитивних олігодендроцитів. Це може свідчити про те, що ММСК реалізують свої нейропротекторні властивості не лише через диференціювання у клітини нервової тканини, а також й паракринно завдяки секреції різноманітних факторів.



### ***Трансформація НПК у напрямку надекспресії FGF-2 для утворення навколосудинних кластерів з нейрогенним потенціалом***

У попередніх експериментах ми показали, що НПК, трансплантовані в гіпокамп ішемізованих мишей, здатні стимулювати ендогенний нейрогенез у СГЗ зубчастої звивини і тим самим сприяти відновленню втрачених функцій. Проте, такі нейрогенні ніші є лише у СГЗ гіпокампа та СВЗ бокових шлуночків і характерною особливістю цих ніш є тісний контакт НСК/НПК із кровоносними судинами. Інші ділянки мозку, зокрема кора, мають низький регенеративний потенціал і однією з причин цього є відсутність локальних ніш стовбурових клітин.

Можливим шляхом вирішення проблеми низького регенеративного потенціалу кори мозку може бути створення локальних навколосудинних нейрогенних ніш у корі головного мозку тварин після ішемічного ушкодження мозку.

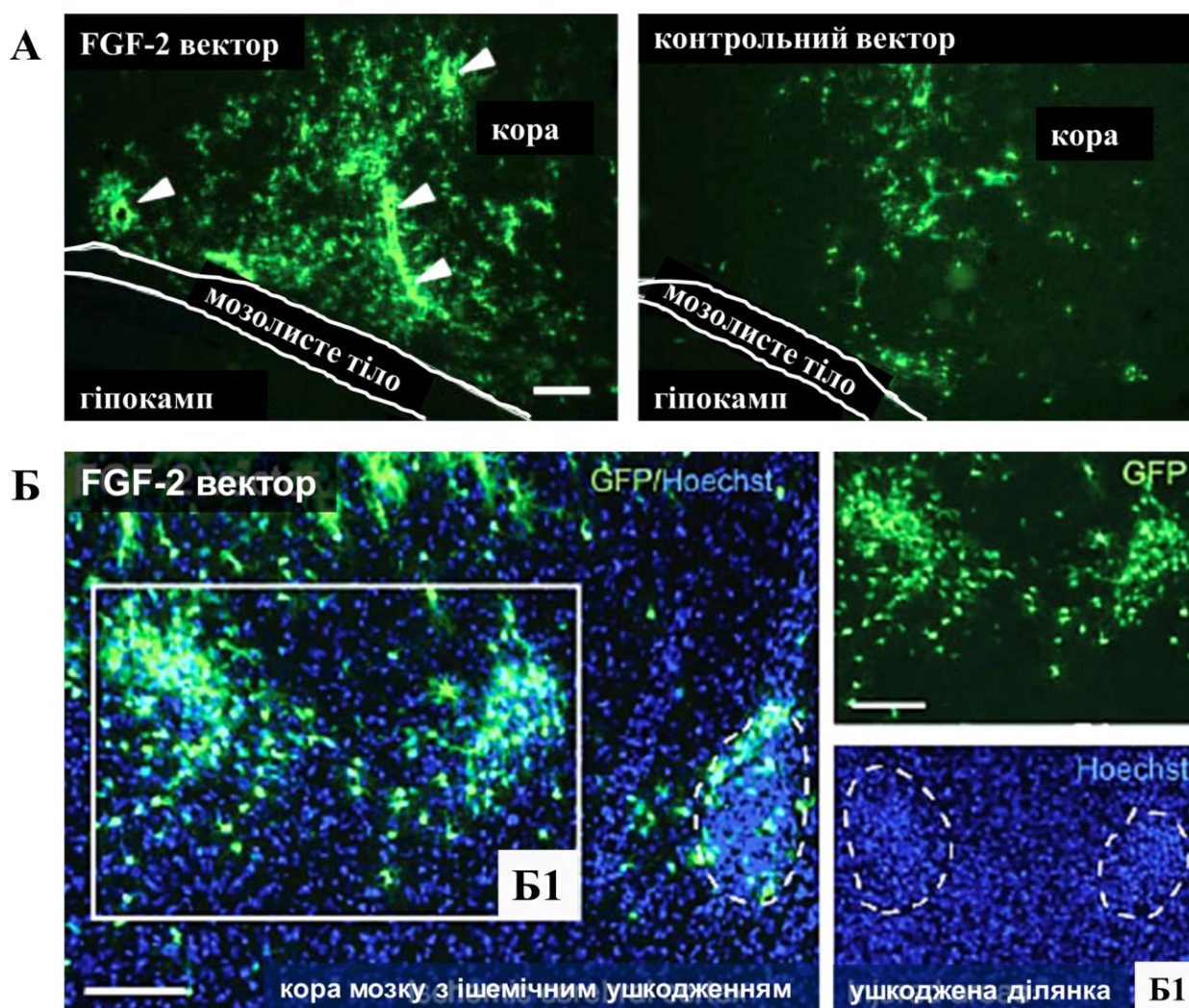
Відомо, що фактор росту фібробластів-2 (FGF-2) відіграє значну роль у нейрогенезі в нейрогенних нішах стовбурових клітин та є потужним модулятором проліферації і диференціювання мультипотентних НСК/НПК (Raballo et al., 2000, Reus et al., 2003).

Тому цікавим було дослідити вплив трансформації НПК у напрямку надекспресії FGF-2 на поведінку цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку та можливість утворення ними локальних навколосудинних нейрогенних ніш з проліферативним потенціалом у корі мозку.

Для реалізації цього завдання робили стереотаксичну трансплантацію у соматосенсорну кору 3-денних щурят лінії Вістар суспензії НПК, отриманих з субвентрикулярної зони новонароджених щурів. Перед трансплантацією НПК були трансфектовані лентивірусним вектором для надекспресії FGF-2 та експресії GFP (для візуалізації трансплантованих клітин). Після трансплантації FGF-2-трансформованих НПК у щурят були електрокоагульовані праві сонні артерії і вони були перенесені у камеру з 6 % O<sub>2</sub> на 30 хвилин для моделювання гіпоксично-ішемічного ураження мозку.

Після моделювання гіпоксично-ішемічного ушкодження мозку пошкоджені ділянки соматосенсорної кори можна було чітко визначити за значною загибеллю нейронів та реактивним астрогліозом.

Імуногістохімічний аналіз фронтальних зрізів головного мозку щура показав, що після трансплантації FGF-2-трансформовані НПК розподілялися більш дисперсно порівняно з контрольними НПК (**Рис. 14А**) та мігрували в ділянки ушкодження соматосенсорної кори (**Рис. 14Б**).



**Рис. 14.** Епіфлюоресцентні зображення головного мозку щура після ішемічного ушкодження та трансплантації НПК. (А) Розподіл FGF-2-трансформованих НПК (ліве зображення) і контрольних НПК (праве зображення) у соматосенсорній корі через 2 тижні після трансплантації. FGF-2-трансформовані НПК мали чітку тенденцію до накопичення навколо кровоносних судин (вказано стрілками на лівому зображенні). (Б) FGF-2-трансформовані НПК мігрували до ушкоджених ділянок кори (Б1). Зона ішемії, що відокремлена пунктирною лінією, характеризується значною гліальною реакцією (підвищена Hoechst реакція). Шкала: (А) = 200 мкм, (Б) = 100 мкм.

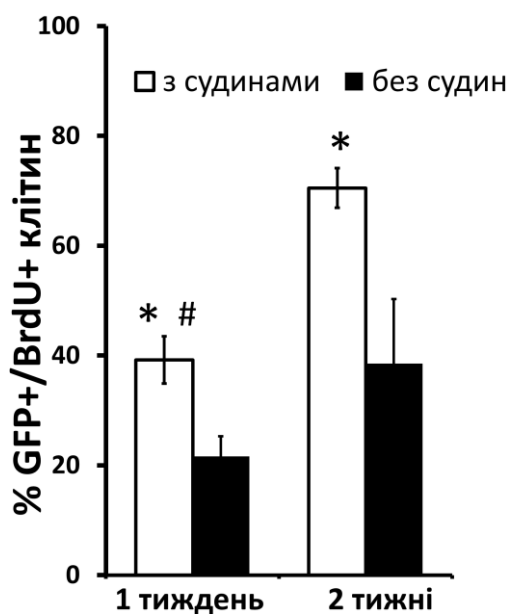
Цікавим є той факт, що переважна більшість FGF-2-трансформованих НПК контактувала безпосередньо із судинами, тоді як контрольні НПК не мали такої тенденції (**Рис. 14А**).

Підрахунок трансплантованих GFP-позитивних клітин показав, що через 2 тижні після їх трансплантації більшість FGF-2-трансформованих НПК ( $67,2 \% \pm 7,3 \%$  (середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього)) перебувала в тісному контакті з судинами у порівнянні з лише  $15,2 \% \pm 4,3 \%$  контрольних НПК ( $P < 0,001$ ,  $t$ -тест) (**Рис. 15**).

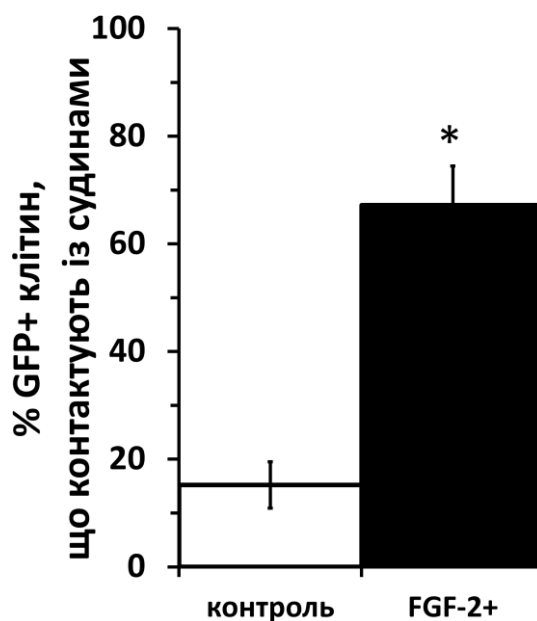
Наступним кроком було дослідження впливу навколосудинного середовища на проліферативну активність НПК.

Для оцінки проліферації НПК робили внутрішньочеревні ін'єкції маркера проліферації клітин (S-фази) – BrdU на 7-му та 14-ту доби після трансплантації.

Ми знайшли значну кількість BrdU-позитивних трансплантованих клітини у безпосередній близькості від судин через тиждень та через 2 тижні після трансплантації. Кількісний аналіз показав, що через тиждень після трансплантації  $39,2 \% \pm 4,3 \%$  FGF-2-трансформованих НПК, що контактували з судинами, були BrdU позитивними в порівнянні з лише  $21,6 \% \pm 3,7 \%$  трансплантованими НПК, що не контактували з судинами ( $P < 0,05$ , *t*-тест) (Рис. 16).



**Рис. 16.** Графік, що демонструє збільшення частки BrdU+клітин у FGF-2-трансформованих клітинних кластерах, що контактують із судинами, порівняно із тими, що не контактують (\*,  $P < 0,05$ , *t*-тест), 1 та 2 тиждів після трансплантації (#,  $P < 0,05$ , *t*-тест).



**Рис. 15.** Графік, що демонструє відсоток FGF-2-трансформованих і контрольних НПК, які контактували з кровоносними судинами через 2 тижні після трансплантації (\*,  $P < 0,001$ , *t*-тест).

Крім того, через 2 тижні після трансплантації,  $70,5 \% \pm 3,6 \%$  FGF-2-трансформованих НПК, що контактували з судинами, були BrdU-позитивні в порівнянні з лише  $38,5 \% \pm 11,8 \%$  трансплантованих НПК, що не контактували з судинами ( $P < 0,05$ , *t*-тест) (Рис. 16).

Ці результати вказують на те, що FGF-2-трансформовані НПК, що контактували із судинами, мали проліферативну активність принаймні протягом 2 тижнів після трансплантації у соматосенсорну кору.

Ключовим питанням трансплантації НПК у ішемізовану кору головного мозку є можливість утворення трансплантованими НПК пулу незрілих нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

Було показано, що в ішемічній корі  $8,2 \% \pm 0,7 \%$  трансплантованих FGF-2-трансформованих НПК були позитивними

на даблкортин (DCX), маркер незрілих нейронів, у порівнянні лише з  $0,5 \% \pm 0,2 \%$ , після трансплантації в кору контрольних тварин ( $P < 0,01$ ,  $t$ -тест) (Рис. 17).

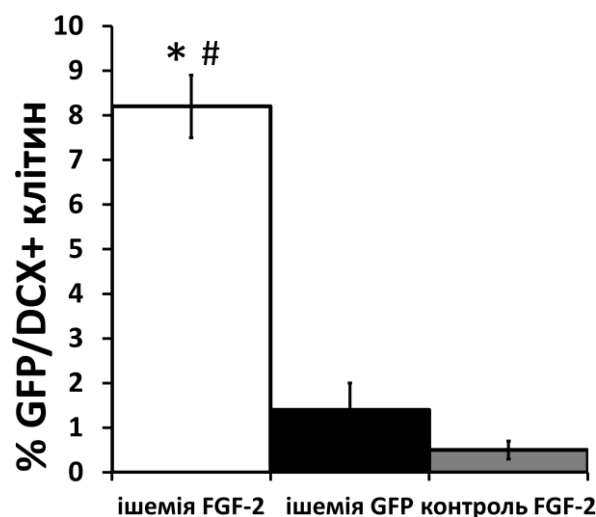
Після трансплантації контрольних GFP+ НПК у соматосенсорну кору після ішемічного ушкодження лише  $1,4 \% \pm 0,6 \%$  трансплантованих НПК були DCX-позитивними ( $P < 0,01$ ,  $t$ -тест) (Рис. 17).

Незрілі FGF-2-трансформовані нейрони були виявлені в ділянках ушкодження кори і більшість DCX-позитивних НПК були знайдені в безпосередній близькості від судин  $68,1 \% \pm 3,5 \%$  у порівнянні з лише  $31,9 \% \pm 3,5 \%$ , що не контактували з судинами ( $P < 0,05$ ) (Рис. 18).

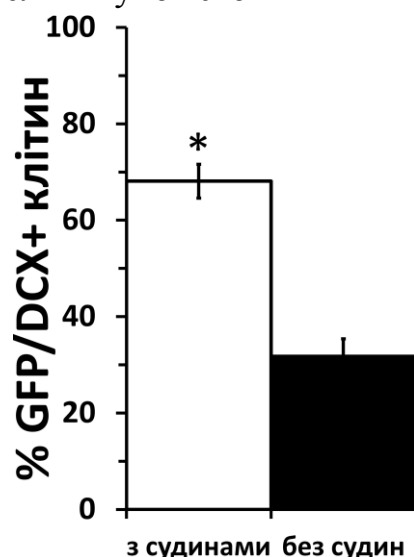
Таким чином, ці результати вказують на те, що трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК утворюють пул незрілих нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

Для більш детальної характеристики навколосудинних кластерів, які утворювали трансплантовані клітини, ми провели імуногістохімічний аналіз зрізів мозку на десмін – один із динамічних молекулярних маркерів, що присутній в перицитах. За характером розташування перицитів на кровоносних судинах можна визначити тип судини.

Подвійне імуногістохімічне фарбування на десмін і RECA-1 показало, що венули були частково покриті десмін-позитивними перицитами, тоді як артеріоли були повністю вкриті цими клітинами (Рис. 19А). Середній діаметр судин, з якими контактували GFP-позитивні кластери (більше 3 GFP/BrdU-позитивних клітин) трансплантованих клітин, становив  $26,89 \pm 4,01$  мкм. Усі GFP-позитивні кластери ( $n = 65$ ) контактували з венулами, а не з артеріолами чи капілярами.

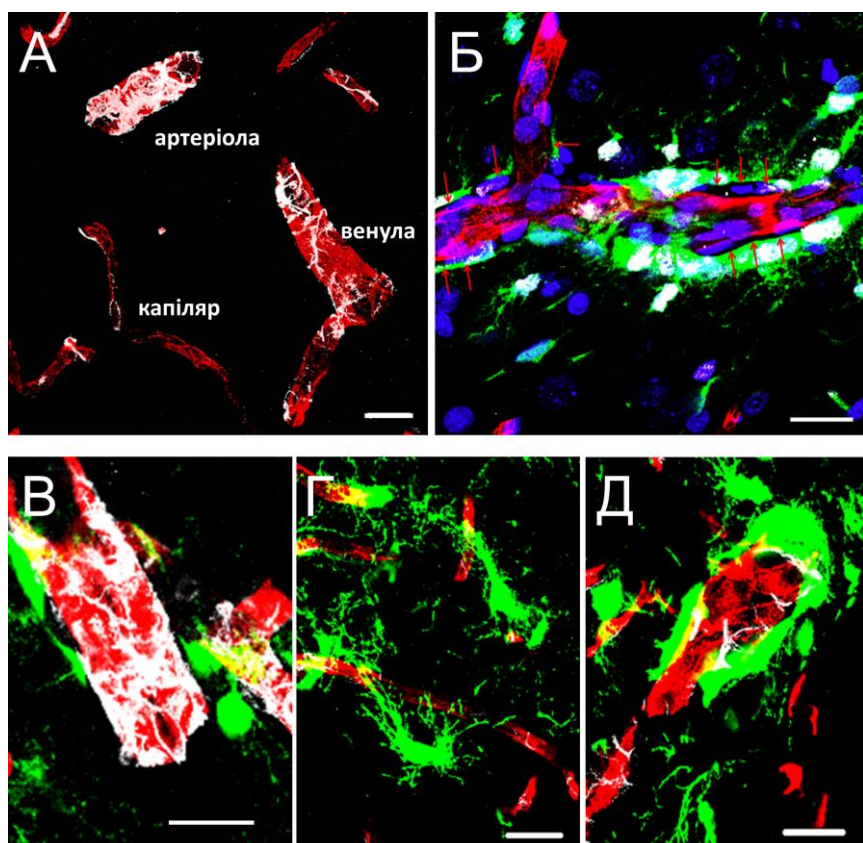


**Рис. 17.** Графік, що відображає відсоток FGF-2+ НПК, що експресують DCX, після ішемії в порівнянні з контрольною корою (\*,  $P < 0,01$ ,  $t$ -тест), а також відсоток трансплантованих контрольних GFP+ НПК, що експресують DCX, після ішемії у порівнянні з FGF-2+ НПК (#,  $P < 0,01$ ,  $t$ -тест).



**Рис. 18.** Графік демонструє, що після ішемії більшість новоутворених незрілих нейронів контактували з кровоносними судинами (\*,  $P < 0,05$ ,  $t$ -тест).





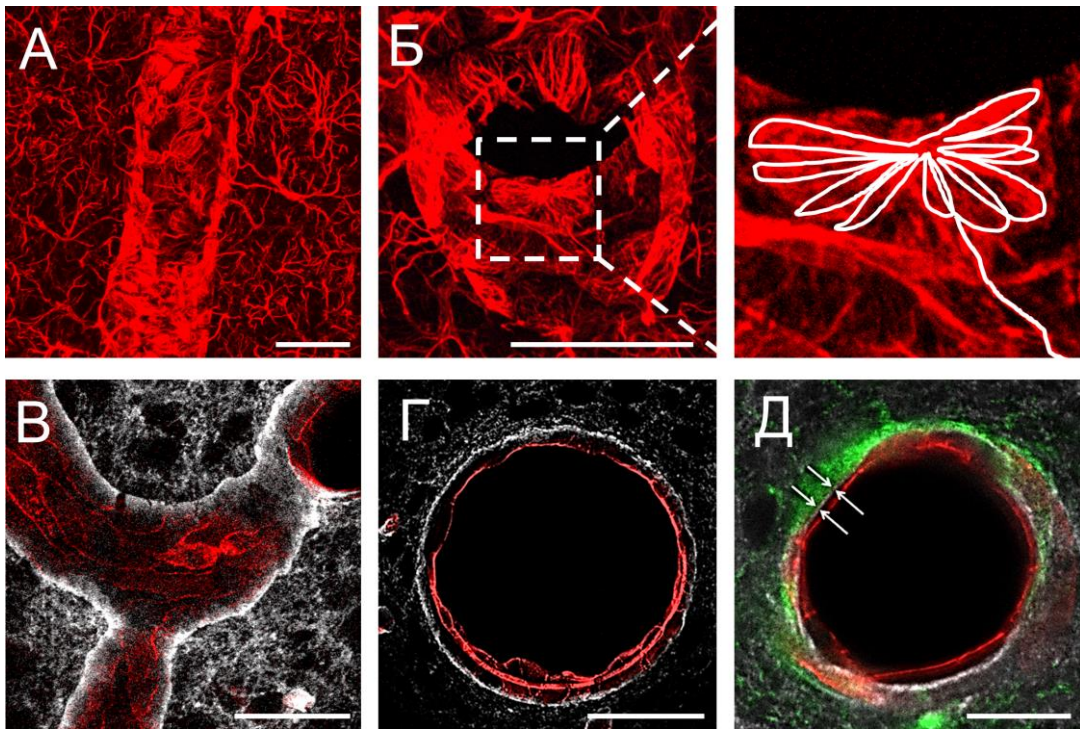
**Рис. 19.** GFP+ НПК контактують із судинами реципієнта. (А) Відростки десмін+ перицитів (білий колір) обгортають стінки RECA-1-позитивних судин (червоний). (Б) Зазор (позначено червоними стрілками) між FGF-2/GFP+ НПК (зелений) і RECA-1-позитивними ендотеліальними клітинами (червоний). Ядра клітин пофарбовані Hoechst 33342 (синій). (В-Д) GFP-позитивні клітини, що контактують з різними типами кровоносних судин: артеріола (В), капіляри (Г) та венула (Д). Шкала = 20 мкм.

Імуногістохімічний аналіз показав, що трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК не перебували в безпосередньому контакті з ендотеліальними клітинами. Ми систематично спостерігали зазор між GFP-позитивними трансплантованими НПК і RECA-1-позитивними ендотеліальними клітинами (**Рис. 19Б**).

Для виявлення потенційних структур між трансплантованими НПК і ендотеліальними клітинами був проведений імуногістохімічний аналіз на GFAP, аквапорин-4 (AQP-4 – трансмембранний білок родини водних каналів, що експресується в астроцитарних ніжках – маркер астроцитарних ніжок) і десмін (маркер перицитів).

Як і очікувалося, аналіз показав, що кровоносні судини в соматосенсорній корі були повністю вкриті GFAP-позитивними астроцитарними ніжками (**Рис. 20А-Д**). Було виявлено, що навколосудинні GFAP-позитивні астроцитарні ніжки мали характерні анатомічні утворення у вигляді розеткоподібних структур, які безпосередньо контактували з ендотеліальними клітинами (**Рис. 20Б**).

Аналіз зрізів мозку, пофарбованих на AQP-4, підтвердив, що кровоносні судини в соматосенсорній корі постнатальних щурів були повністю вкриті AQP-4-позитивними астроцитарними ніжками (**Рис. 20В,Г**). Крім того, FGF-2-трансформовані GFP-позитивні трансплантовані клітини контактували з кровоносними судинами через AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (**Рис. 20Д**).

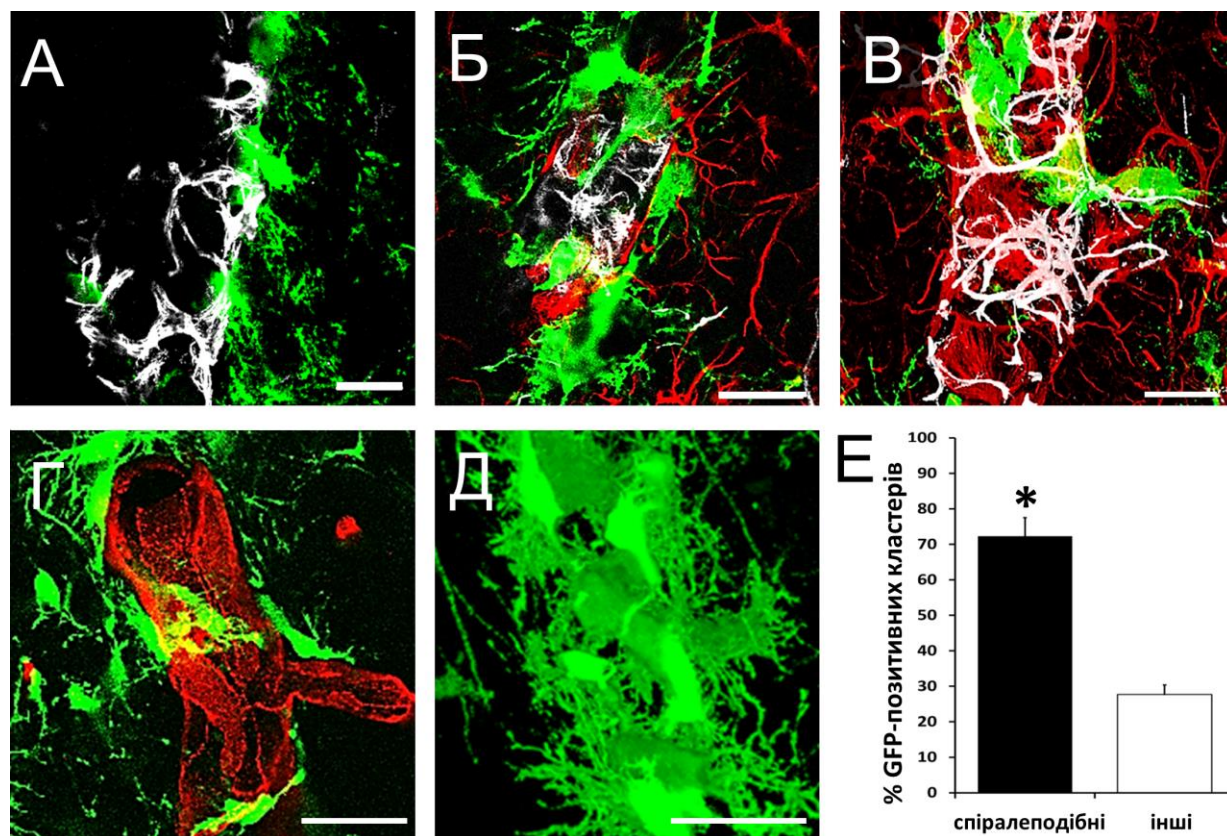


**Рис. 20.** FGF-2-трансформовані НПК контактують з кровоносними судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками. (А, Б) Конфокальні зображення кровоносної судини, вкритої GFAP-позитивними астроцитарними ніжками: поздовжній (А) і поперечний (Б) зрізи. (Б) Праве зображення: збільшений вигляд ділянки у штрихованому квадраті на (Б); білою кривою схематично показано розеткоподібну астроцитарну ніжку. (В, Г) AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (білий колір) повністю охоплюють RECA-1-позитивну кровоносну судину (червоний колір): поздовжний (В) і поперечний (Г) зрізи. (Д) GFP-позитивні клітини (зелений колір) контактують із RECA-1-позитивними кровоносними судинами (червоний колір) через AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (білий колір) (позначено стрілками). Шкала = 20 мкм.

Імуногістохімічне фарбування на десмін показало, що FGF-2-трансформовані GFP+ НПК в основному контактували з судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками між перицитами (Рис. 21А-В). Відомо, що перицити огортають судини спіралеподібним чином (Kunz et al., 1994). Тому FGF-2-трансформовані GFP+ НПК, які розташовувалися між перицитами, формували спіралеподібні навколосудинні кластери (Рис. 21Г,Д). Кількісний аналіз показав, що  $72,3 \% \pm 5,2 \%$  проаналізованих навколосудинних GFP+ кластерів мали спіралеподібну форму (Рис. 21Е).

Отже, надекспресія FGF-2 у НПК сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU+ спіралеподібних проліферативних кластерів. Трансплантовані FGF-2-трансформовані НПК переважно контактують з венулами на ділянках, вкритих астроцитними ніжками, та уникають контактів із перицитами. При цьому виявлено, що трансплантовані FGF-2+ НПК утворюють пул незрілих DCX+ нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

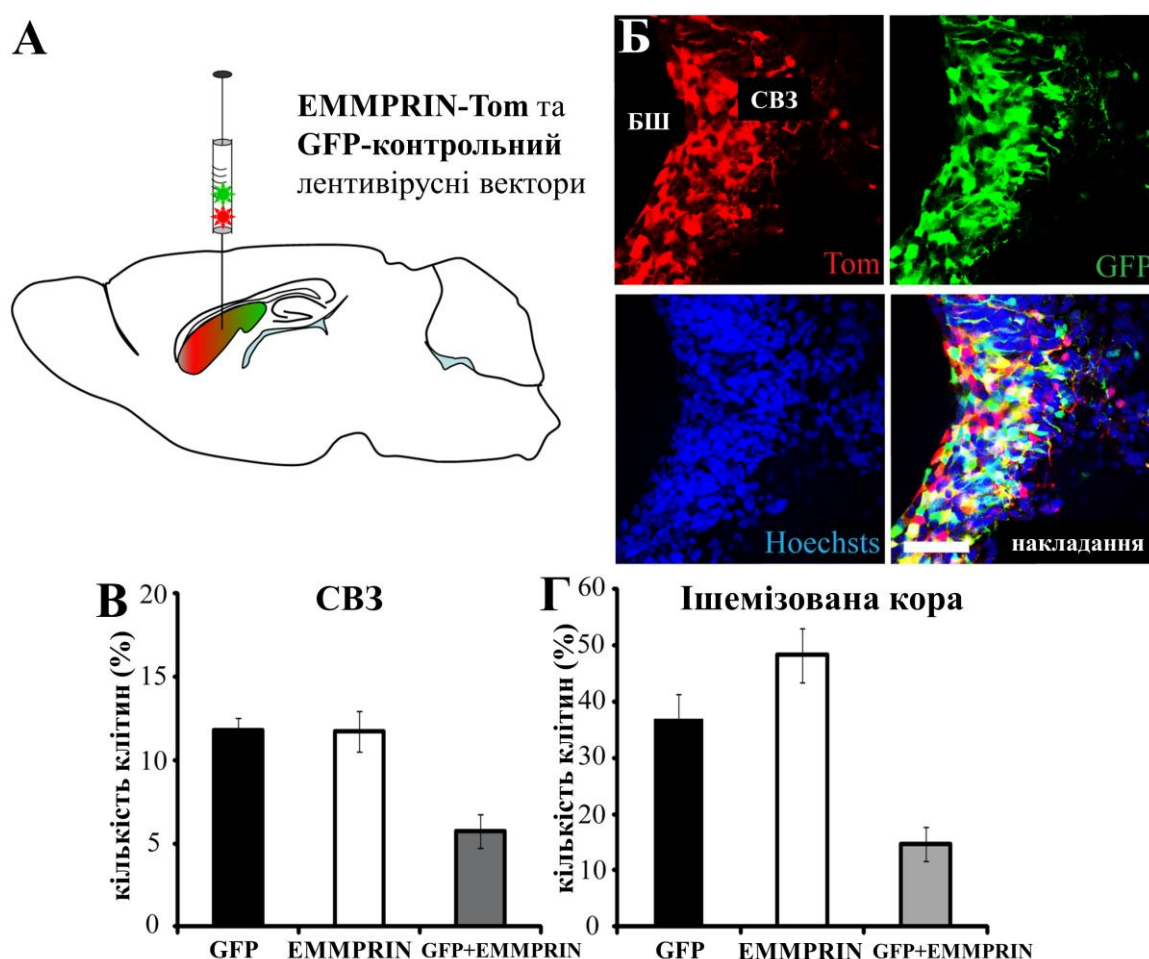




**Рис. 21.** FGF-2-трансформовані НПК контактують з кровоносними судинами на ділянках, вкритих астроцитарними ніжками. (А, Б) Конфокальні зображення кровоносної судини, вкритої GFAP-позитивними астроцитарними ніжками: поздовжній (А) і поперечний (Б) зрізи. (Б) Праве зображення: збільшений вигляд ділянки у штрихованому квадраті на (Б); білою кривою схематично показано розеткоподібну астроцитарну ніжку. (В, Г) AQP-4-позитивні астроцитарні ніжки (білий) повністю охоплюють RECA-1-позитивну кровоносну судину (червоний): поздовжний (В) і поперечний (Г) зрізи. (Д) GFP+ клітини (зелений) контактують із RECA-1-позитивними кровоносними судинами (червоний) через AQP-4+ астроцитарні ніжки (білий) (позначено стрілками). Шкала = 20 мкм.

**Трансформація НСК у напрямку надекспресії EMMPRIN для покращення їх міграції з СВЗ у пошкоджені ділянки мозку.** Ми показали, що трансплантація FGF-2-трансформованих НПК у мозок ішемізованих тварин може бути корисною стратегією для покращення інтеграції трансплантованих НПК з судинами реципієнта, утворюючи тим самим проліферативні навколосудинні кластери з нейрогенним потенціалом для відновлення нервової тканини після ішемічного ушкодження мозку. Альтернативою трансплантації НПК може бути стимуляція ендogenous нейрогенезу та залучення власних НПК із СВЗ до зони ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі. Відомо, що міграція НПК залежить від активності матриксних металопротеїназ (ММП), які деградують білки екстрацелюлярного матриксу. Тому ми вирішили перевірити гіпотезу, що надекспресія індуктора екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ (EMMPRIN) у ендogenous НПК може посилити міграцію клітин із СВЗ до зони ішемічного ушкодження у соматосенсорній корі.

З цією метою новонародженим щурам (P0) стереотаксично вводили у боковий шлуночок суміш EMMPRIN-Tom та CTRL-GFP лентивірусні вектори (**Рис. 22А,Б**). На сьому добу постнатального розвитку (P7) у щурів моделювали гіпоксично-ішемічне ушкодження головного мозку. Для дослідження міграційного потенціалу НПК із СВЗ у зону ішемічного ушкодження, головний мозок експериментальних тварин фіксували на 3-ю добу після гіпоксично-ішемічного пошкодження. Імуногістохімічне фарбування з використанням антитіл проти Tom та GFP виявило три популяції клітин у СВЗ: контрольні клітини (тільки GFP) та дві популяції з надекспресією EMMPRIN – лише Tom або Tom/GFP подвійно позитивні клітини (**Рис. 22Б-Г**).

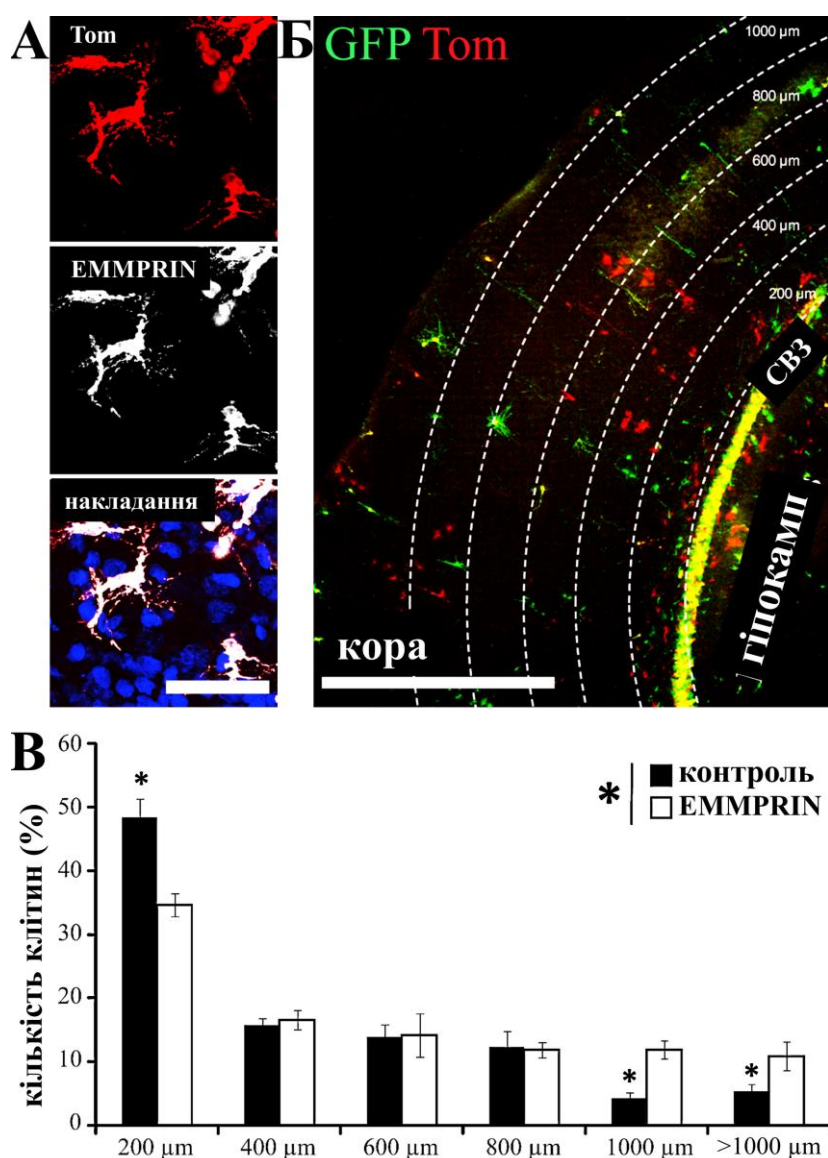


**Рис. 22.** Ін'єкція EMMPRIN-Tom та GFP-контрольного лентивірусних векторів у боковий шлуночок. (А) Схема експерименту. Суміш лентивірусних векторів вводили стереотаксично в боковий шлуночок. Трансдуковані СВЗ клітини експресували GFP, EMMPRIN-Tom або GFP та EMMPRIN-Tom. (Б) Конфокальні зображення СВЗ через 10 днів після ін'єкції. Ядра клітин контрастовані Hoechst 33342 (синій колір). (В) Графік демонструє кількісне визначення клітин, трансдукованих GFP-контрольним, EMMPRIN-Tom або обома лентивірусними векторами (GFP+EMMPRIN) у СВЗ. (Г) Графік демонструє відсоток контрольних GFP-позитивних, EMMPRIN-Tom-позитивних або GFP+EMMPRIN-Tom-позитивних клітин, які мігрували в ішемізовану кору. Скорочення: БШ – боковий шлуночок; СВЗ – субвентрикулярна зона. Шкала = 50 мкм.



Імуногістохімічне фарбування зрізів мозку щура із використанням антитіл проти EMMPRIN людини підтвердило, що лише Том-позитивні клітини експресували EMMPRIN людини (Рис. 23А).

Слід зазначити, що EMMPRIN-трансформовані НПК мігрували із СВЗ значно далі у зону ішемізованої кори порівняно з контрольними (трансдукованими лише GFP) (Рис. 23Б, В). На відстані до 200 мкм від СВЗ було виявлено більше GFP-позитивних контрольних клітин у порівнянні з EMMPRIN-позитивними клітинами (Рис. 23Б, В). З іншого боку, більше EMMPRIN-позитивних клітин порівняно із контрольними було візуалізовано в пошкодженій корі на відстані 1000 мкм та більше від СВЗ (Рис. 23Б, В).

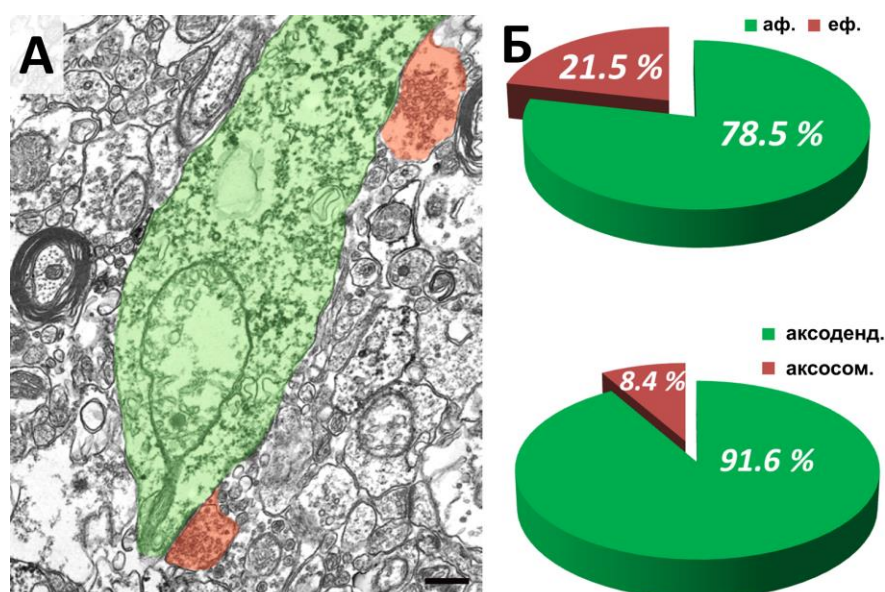


Таким чином, наші результати свідчать про те, що НПК, які надекспресують EMMPRIN, мігрують далі у пошкоджену соматосенсорну кору порівняно із контрольними НПК та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

**Інтеграція трансплантованих НПК, утворених з іПСК людини, у мозок щура після ішемічного ушкодження мозку.** У попередніх експериментах для введення донорських клітин у мозок реципієнта після ішемічного ушкодження ми використовували ксено-, ало- та сингенну трансплантації. Але найбільш привабливою й перспективною серед різних видів трансплантації є аутологічна завдяки доступності застосування аутологічних клітин пацієнта, мінімальному ризику відторгнення трансплантату та безпеці її застосування.

Перспективним джерелом донорського матеріалу при аутологічній трансплантації є індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК). іПСК мають майже всі властивості ембріональних стовбурових клітин, але походять не з ембріона, а із соматичних клітин дорослої людини. Це означає, що іПСК можуть бути повернуті пацієнтові без ризику імунного відторгнення. Також, практичне застосування іПСК не породжує етичних проблем, які зазвичай пов'язані з використанням ембріональних стовбурових клітин. Тому в наступній серії експериментів ми використовували фібробласти шкіри людини для отримання з них іПСК з подальшим диференціюванням цих клітин у нейральному напрямку та досліджували можливість використання НПК, отриманих із іПСК людини, для стереотаксичної трансплантації у мозок щура після ішемічного ушкодження головного мозку.

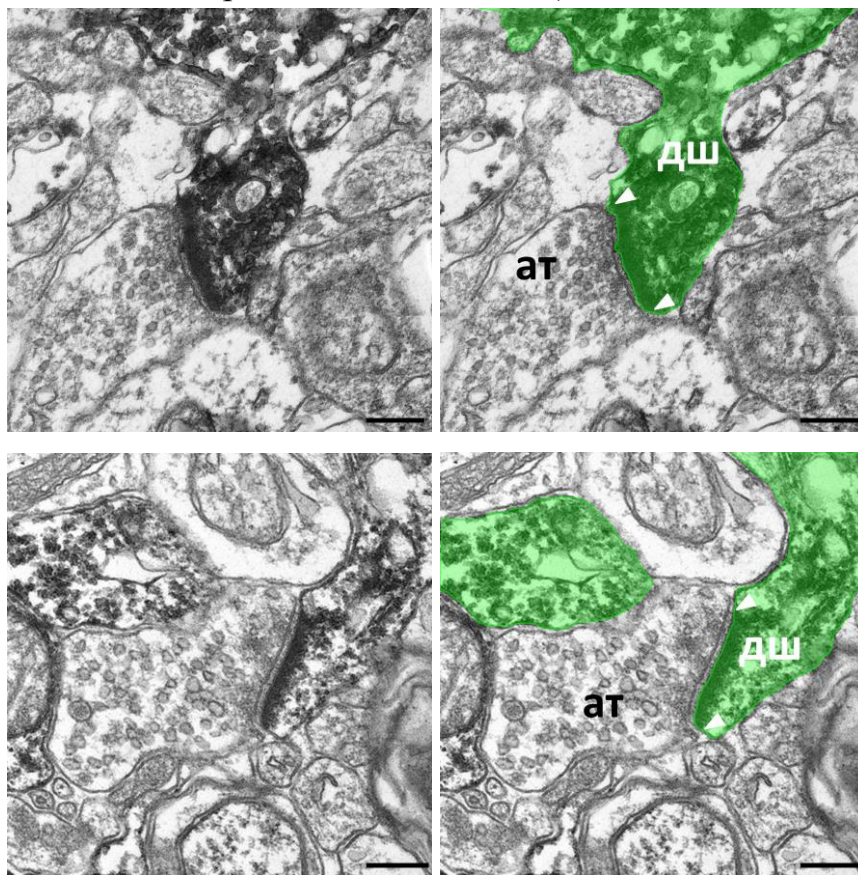
Через 6 місяців після трансплантації виконували імуно-електронно-мікроскопічний аналіз фронтальних зрізів соматосенсорної кори з використанням антитіл проти GFP для ідентифікації трансплантованих клітин. Імуно-електронно-мікроскопічний аналіз показав, що GFP-негативні аксонні термінали утворювали синаптичні контакти на більшості GFP-позитивних донорських нейронах. Такі контакти мали всі ультраструктурні критерії хімічного синапсу: кластеризацію синаптичних везикул, розташованих близько до пресинаптичної мембрани, синаптичну щілину та постсинаптичну мембрану з постсинаптичною щільністю (**Рис. 24**).



**Рис. 24.** (А) Аксонні термінали реципієнта (червоний колір) встановлювали аферентні синаптичні контакти з донорськими GFP/DAB+ нейронами (зелений). (Б) Гістограми співвідношення GFP/DAB+ синаптичних контактів: аферентні (аф.) проти еферентних (еф.) та аксодендритні (аксоденд.) проти аксосомальних (аксосом.) контактів. Шкала = 0,2 мкм.



Ультраструктурні характеристики цих синаптичних контактів не відрізнялися від синапсів соматосенсорної кори реципієнта. Аферентні входи від нейронів реципієнта переважали (78,5 %) над еферентними виходами (21,5 %) (**Рис. 24Б**). Абсолютна більшість (91,6 %) аферентних контактів були аксодендритними і лише 8,4 % були аксосоматичними (**Рис. 24А,Б**). Серед аксодендритних синаптичних контактів 84,7 % аксонних терміналей контактували з GFP+ дендритними шипиками (**Рис. 25**).



**Рис. 25.** Асиметричні синаптичні контакти з безперервною постсинаптичною щільністю (білі трикутники) між донорськими GFP/DAB-позитивними дендритними шипиками (дш) (зелений колір) і аксонною терміналлю реципієнта (ат). Шкала = 0,2 мкм.

Цей тип синаптичних контактів переважає в корі головного мозку ссавців (Harris et al., 1994). Решта аксонних терміналей контактувала з дендритними стовбурами (11,1 %) або з іншими структурами (4,2 %). Усі аксодендритні контакти були асиметричні з ультраструктурними характеристиками збуджувальних глутаматергічних синапсів: виразна постсинаптична щільність, широка синаптична щілина і сферичні синаптичні везикули (**Рис. 25**). Більшість (94,3 %) постсинаптичної щільності була неперфорованою (простою) і тільки 5,7 % була перфорованою. Аксонні термінали реципієнта мали значну кількість синаптичних везикул у безпосередній близькості до пресинаптичної мембрани (**Рис. 25**), що вказує на наявність пулу синаптичних везикул, готових до викиду нейротрансмітера. Ці ультраструктурні ознаки вказують на функціональну активність синапсів (Schneeggenburger et al., 2002).

Таким чином, результати ультраструктурного аналізу свідчать про те, що трансплантовані НПК отримували аферентні входи від нейронів реципієнта після ішемічного ушкодження головного мозку, утворюючи збуджувальні аксодендритні синаптичні контакти, аналогічні тим, які спостерігаються в інших ділянках соматосенсорної кори.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено детальний аналіз впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження як у новонароджених, так і у дорослих тварин. За матеріалами дисертаційної роботи зроблено такі висновки:

1. Стереотаксична трансплантація суспензії фетальної нервової тканини в СА1 зону гіпокампа щурів через 30 діб після ішемії сприяє відновленню цитоархітектоніки гіпокампа навіть у тривалі строки після трансплантації (до 6 міс) шляхом зростання лінійної щільності нейронів (до 150 (128–168) кл/мм порівняно із групою ішемії – 134 (117–154) кл/мм,  $U = 1414$ ,  $U_p = 1920$ ,  $P = 0,012$ ) у пірамідному шарі та ширини променистого шару (до  $582 \pm 130$  мкм порівняно із групою ішемії –  $432 \pm 108$  мкм,  $t = -7,88$ ,  $t_{crit} = 1,65$ ,  $P < 1 \times 10^{-9}$ ), а також зменшення реактивного астрогліозу.

2. На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей показано, що субокципітально трансплантовані фетальні GFP-позитивні нейральні прогеніторні клітини здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони СА1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони та виживати у мозку ішемізованих тварин як мінімум 90 діб після трансплантації. Нейрони, утворені з GFP-позитивних трансплантованих нейральних прогеніторів, здатні формувати як пост-, так і пресинаптичні структури з GFP-негативними нейронами реципієнта.

3. Нейральні прогеніторні клітини, трансплантовані в гіпокамп ішемізованих мишей, здатні стимулювати ендогенний нейрогенез (збільшувати кількість BrdU-позитивних вдвічі та DCX-позитивних клітин у 1,6 рази порівняно із ішемізованими тваринами) у субгранулярній зоні зубчастої звивини.

4. Стереотаксична трансплантація нейральних прогеніторних клітин сприяє покращенню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку (час пошуку платформи у лабіринті Морріса зменшувався з  $36 \pm 2,3$  с у ішемізованих тварин до  $28,8 \pm 1,4$  с ( $P < 0,05$ ) – у групі тварин з ішемією плюс трансплантація нейральних прогеніторів, але не сягав контрольних значень –  $24,3 \pm 2,7$  с ( $P < 0,05$ )).

5. На *in vivo* моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярній лейкомаляції – показано, що сингенна стереотаксична трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) сприяє відновленню кортикоспинальної функції у тварин після перивентрикулярної лейкомаляції, зменшує деградацію основного білка мієліну і гальмує розвиток астро- та мікрогліозу.

6. З використанням розробленої нами *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші показано, що ММСК гальмують розвиток реактивного гліозу та збільшують кількість олігодендроцитів (інтегральна щільність флюоресценції Rir-позитивного сигналу –  $4,0 \pm 1,1$  у.о. у порівнянні з групою ПВЛ ( $1,9 \pm 0,4$  у.о.,  $P < 0,05$ ) шляхом безконтактної взаємодії зі зрізами головного мозку.

7. Надекспресія FGF-2 у нейральних прогеніторних клітинах сприяє їх тісному контакту з судинною мережею та формуванню навколосудинних BrdU-позитивних спіралеподібних проліферативних кластерів. Трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогенітори переважно контактують з венулами на ділянках, вкритих астроцитними ніжками, та уникають контактів із перицитами. При цьому виявлено, що трансплантовані FGF-2-трансформовані нейральні прогенітори утворюють пул незрілих DCX-позитивних нейронів у відповідь на ішемічне ушкодження мозку.

8. Ендогенні нейральні прогеніторні клітини, трансформовані в напрямку надекспресії EMMPRIN, мігрують із субвентрикулярної зони у пошкоджену соматосенсорну кору далі порівняно із контрольними клітинами та утворюють популяцію нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори.

9. З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу показано, що GFP-негативні аксони реципієнта формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з іПСК людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджувальних глутаматергічних синапсів.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ СТАТТІ:

1. Поддубна А.О. Реакція гліальних клітин гіпокампа на нейротрансплантацію при експериментальній ішемії мозку / А.О. Поддубна, О.М. Цупиков, О.Ю. Петренко, О.В. Оченашко, Т.А. Півнева, Г.Г. Скібо // Здоб. клін. експ. мед. – 2007. – № 2. – С. 121-124. (*Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів*).
2. Jenny B. FGF-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential / B. Jenny, M. Kanemitsu, O. Tsupikov, G. Potter, P. Salmon, E. Zraggen, E. Gascon, G. Skibo, A. Dayer, J. Kiss // Stem cells. – 2009. – 27(6). – P. 1309-1317. (*Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті*).
3. Tsupikov O.M. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals / O.M. Tsupikov, T.A. Pivneva, A.O. Poddubna, V.M. Kyryk, O.V. Kuchuk, G.M. Butenko, G.G. Skibo // Int. J. Phys. Pathophysiol. – 2010. – V.1. – N. 1. – P. 25-35. (*Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті*).

4. Кучук О.В. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы / О.В. Кучук, О.М. Цупиков, В.М. Кирик // Проблемы остеологии. – 2010. – т.13. – №4. – С. 36-41. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
5. Garashchuk O.V. Impact of late transplantation of fetal neural tissue on hippocampal cytoarchitectonics in remote period after transient global cerebral ischemia in rats / O.V. Garashchuk, O.M. Tsupykov, V.I. Tsymbaliuk // Int. J. Phys. Pathophysiol. – 2012. – V.3. – I. 1. – P. 39-52. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
6. Tsupykov O.M. Integration of grafted neural progenitor cells in host hippocampal circuitry after ischemic injury / O.M. Tsupykov, A.O. Poddubnaya, K.G. Smozhanyk, V.M. Kyryk, O.V. Kuchuk, G.M. Butenko, E.A. Semenova, T.A. Pivneva, G.G. Skibo // Нейрофізіол. – 2011. – Т. 43. – № 4. – С. 372-375. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
7. Tsupykov O. Long-term fate of grafted hippocampal neural progenitor cells following ischemic injury / O. Tsupykov, V. Kyryk, E. Smozhanik, O. Rybachuk, G. Butenko, T. Pivneva, G. Skibo // J. Neurosci. Res. – 2014. – V.92. – N. 8. – P. 964-74. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
8. Tsupykov O.M. A protocol for isolation of fetal neural progenitor cells from mouse hippocampus / O.M. Tsupykov // Cell Organ Transplant. – 2014. – v.2. – №2. – P. 155-157. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
9. Tsupykov O.M. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia / O.M. Tsupykov, V.M. Kyryk, A.M. Ustylenko, K.V. Yatsenko, G.M. Butenko, G.G. Skybo // Cell Organ Transplant. – 2015. – V.3, №1. – P. 68-73. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
10. Tsupykov O. Neural stem cell niches in the adult mammalian brain / O. Tsupykov // Cell Organ Transplant. – 2015. – V.3, №2. – P. 190-194. *(Особисто дисертантом проведені дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
11. Tsupykov O. Ultrastructural analysis of murine hippocampal neural progenitor cells in culture / O. Tsupykov // Microsc. Res. Tech. – 2015. – V.78. – N. 2. – P. 128-133. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні*

дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

12. Tsupikov O. Relationship of grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitor cells with the vasculature in the cerebral cortex / O. Tsupikov, M. Kanemitsu, E. Smozhanik, G. Skibo, A. Dayer, J.Z. Kiss // Cell Transplant. – 2016. – V.25. – N.7. – P.1359-1369. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
13. Tsupikov O. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction / O. Tsupikov, A. Ustymenko, V. Kyryk, E. Smozhanik, K. Yatsenko, G. Butenko, G. Skibo // Microsc. Res. Tech. – 2016. – V. 79. – N6. – P. 557-564. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
14. Tsupikov O.M. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture / O.M. Tsupikov, I.V. Lushnikova, Y.A. Nikandrova, K.V. Yatsenko, A.M. Ustymenko, V.M. Kyryk, G.M. Butenko, G.G. Skibo // Cell Organ Transplant. – 2016. – V.4, №2. – P.188-193. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
15. Tornero D. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli / D. Tornero, O. Tsupikov, M. Granmo, C. Rodriguez, M. Grønning-Hansen, J. Thelin, E. Smozhanik, C. Laterza, S. Wattananit, R. Ge, J. Tatarishvili, S. Grealish, O. Brüstle, G. Skibo, M. Parmar, J. Schouenborg, O. Lindvall, Z. Kokaia // Brain. – 2017. – V. 140. – N. 3. – P. 692-706. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
16. Tsupikov O.M. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro / O.M. Tsupikov, I.V. Lushnikova, A.M. Ustymenko, V.M. Kyryk, Y.A. Nikandrova, M.A. Patseva, K.V. Yatsenko, G.M. Butenko, G.G. Skibo // Cell Organ Transplant. – 2017. – V.5. – №1. – P.28-32. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
17. Цупиков О. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку / О. Цупиков, В. Кирик, К. Яценко, Г. Бутенко, Г. Скибо // ScienceRise. Medical Science. – 2017. – Т. 14. – № 6. – С. 32-36. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
18. Kanemitsu M. EMMPRIN overexpression in SVZ neural progenitor cells increases their migration towards ischemic cortex / M. Kanemitsu, O. Tsupikov, G. Potter, M. Boitard, P. Salmon, E. Zraggen, E. Gascon, G. Skibo, A.G. Dayer, J.Z. Kiss // Exp. Neurol. – 2017. – V.297. – P. 14-24. *(Особисто дисертантом*

*проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

19. Цупиков О. Стимуляция эндогенного нейрогенеза в гиппокампе после ишемического повреждения мозга с помощью экзогенных нейральных прогениторов / О. Цупиков, В. Кирик, Г. Бутенко, Г. Скибо // Неврол. Нейрохирург. Вост. Европа. – 2017. – Т.7. – №. 3 – С. 457-463. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
20. Цупиков О. Ефективність використання зеленого флюоресцентного білка як маркера для ідентифікації трансплантованих нейральных прогеніторних клітин у нервовій тканині мишей / О. Цупиков, В. Кирик, К. Яценко, Г. Бутенко, Г. Скибо // Укр. неврол. жур. – 2017. – Т. 44. – №. 3 – С. 51-57. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
21. Tsupykov O. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an in vitro model of periventricular leukomalacia / O. Tsupykov, I. Lushnikova, A. Ustymenko, V. Kyryk, Y. Nikandrova, M. Patseva, K. Yatsenko, G. Butenko, G. Skibo // Фізіол. журн. - 2017.- т. 63. – № 5. – С. 3-12. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*

#### **ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ:**

1. Poddubnaya A. Neurotransplantation ameliorates hippocampal cells structure after ischemic injury / A. Poddubnaya, O. Tsupykov, T. Pivneva // The 44th International Conference of the Slovak Anatomical Society «Morphology 2007». – Bratislava. – Acta histochem. – 2009. – V.111. – P. 456.
2. Цупиков О.М. Вплив нейротрансплантації на стан гліальних клітин гіпокампа після ішемії-реперфузії мозку / О.М. Цупиков, А.О. Поддубна, Т.А. Півнева, Г.Г. Скибо // Наук.-практ. конф. з міжн. участю «Високогірна гіпоксія і геном». – Терскол. – Фізіол. жур. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 93.
3. Tsupykov O. The fate of neural progenitor cells after transplantation into ischemic brain / O. Tsupykov, A. Poddubna, V. Kyryk, O. Kuchuk, G. Butenko, G. Skibo, T. Pivneva // 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease Glia. – Paris. – Glia. – 2009. – V.57. – Issue S13. – P. 74.
4. Tsupykov O. Grafting of fetal neural progenitor cells into the adult ischemic brain / O. Tsupykov, A. Poddubna, O. Ochenashko, A. Petrenko, V. Kyryk, O. Kuchuk, G. Butenko, G. Skibo, T. Pivneva // 7th FENS Forum. – Amsterdam. – 2010. – FENS Abstr. book. – V.5, 016.31.
5. Лабунець І.Ф. Вплив нейротрансплантації на функціональну активність епіфіза та тимуса при ішемічному пошкодженні головного мозку / І.Ф. Лабунець, О.М. Цупиков, В.М. Кирик, О.В. Кучук, Т.А. Півнева, Г.Г. Скибо, Г.М. Бутенко // Наук.-практ. конф. з міжн. участю «Генетична і



- регенеративна медицина: проблеми та перспективи». – Київ. – Журн. Акад. мед. наук України. – 2010. – Т.16, додаток. – С.100-101.
6. Васильєв Р.Г. Перспективи застосування в регенеративній медицині тривимірних трансплантатів, заселених мультипотентними стромальними клітинами кісткового мозку / Р.Г. Васильєв, О.В. Кучук, О.М. Цупиков, В.М. Кирик // Матеріали конференції «Актуальні питання геронтології та гериатрії» (Київ, 26 січня 2011 р.) – С. 8-9.
  7. Tsupykov O. Hippocampal-derived neural progenitor cells establish synaptic junctions after grafting into the adult ischemic brain / O. Tsupykov, T. Pivneva, A. Poddubna, V. Kyryk, O. Kuchuk, G. Skibo // 8th IBRO World Congress of Neuroscience. – Florence. – 2011. – D141.
  8. Скибо Г.Г. Синаптическая пластичность мозга / Г.Г. Скибо, И.Р. Никоненко, Т.Н. Коваленко, И.А. Осадченко, И.В. Лушникова, Т.А. Пивнева, О.М. Цупиков, М.А. Пацева, Е.Г. Сможаник, А.Г. Никоненко // Научные труды III съезда физиологов СНГ. – Ялта. – 2011. – С. 50-51.
  9. Tsupykov O. The grafted fetal neural progenitor cells can integrate in the adult hippocampal tissue after ischemic injury / O. Tsupykov, A. Poddubna, E. Smozhanyk, V. Kyryk, O. Kuchuk, T. Pivneva, G. Skibo, G. Butenko // Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine. – Leipzig. – 2011. – P. 163.
  10. Tsupykov O. Ectopic niche formation by grafted FGF-2 overexpressing neural stem/progenitors in the cerebral cortex / O. Tsupykov, M. Kanemitsu, T. Pivneva, G. Skibo, A.G. Dayer, J.Z. Kiss // Abstracts of the SFN. – Washington. – 2011. – 129.05/A18. – P.20.
  11. Tsupykov O. Synapse formation between the grafted neural progenitor cells and host hippocampal neurons after ischemic injury / O. Tsupykov, E. Smozhanik, O. Rybachuk, V. Kyryk, O. Kuchuk, M. Patseva, G. Butenko, G. Skibo, T. Pivneva // 8 th FENS meeting 14-18 July 2012, Barselona, Spain, FENS Forum Programme Book. – P. 300
  12. Цупиков О.М. Экспериментальные подходы к изучению терапевтического потенциала стволовых клеток при перинатальной патологии ЦНС / О.М. Цупиков // Наук.-практ. конф. з міжн. участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неонатології та дитячій неврології». – Київ. – 2013. – С. 29.
  13. Цупиков О.М. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини при перинатальній патології ЦНС / О.М. Цупиков, В.М. Кирик, А.А. Мамчур, А.М. Устименко, К.В. Яценко, Г.М. Бутенко, Г.Г. Скибо // Наук.-практ. конф. з міжн. участю «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє». – Київ. – 2014. – С.37.
  14. Tsupykov O. Neural stem cells transplantation promote the spatial learning recovery after ischemic brain injury / O. Tsupykov, V. Kyryk, T. Pivneva, G. Butenko, G. Skibo // 1st International Symposium on Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning. Abstract book. – Montpellier. – 2015. – P. 29.

## АНОТАЦІЯ

**Цупиков О. М. Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини після ішемічного ушкодження головного мозку. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.14 – патологічна фізіологія – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.

У дисертаційній роботі представлені результати морфофункціональних досліджень впливу трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени на різних моделях ішемічного ушкодження головного мозку як у дорослих, так і у новонароджених тварин. Продemonстровано, що трансплантовані фетальні GFP-позитивні нейральні прогеніторні клітини (НПК) здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони CA1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони, які утворюють синаптичні контакти з нейронами реципієнта. Показано, що ішемічне ушкодження гіпокампа викликає порушення когнітивних функцій (просторової пам'яті), а стереотаксична трансплантація НПК сприяє відновленню просторової пам'яті у тварин після ішемічного ушкодження мозку. На створеній *in vitro* моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції – продемонстровано, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізми головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість олігодендроцитів. Досліджено вплив трансформації НПК у напрямку надекспресії FGF-2 на поведінку цих клітин після їх трансплантації у соматосенсорну кору щурів з ішемічним ушкодженням мозку та показано можливість утворення ними локальних навколосудинних проліферативних кластерів із нейрогенним потенціалом. Уперше показано вплив трансформації ендогенних НПК у напрямку надекспресії EMMPRIN на міграційні здібності цих клітин та можливість утворення ними популяції нейральних прогеніторів у пошкодженій ділянці кори. Уперше показано формування нейронами ішемізованого мозку прямих синаптичних входів на інтракортикально трансплантованих клітинах, утворених з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) людини.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, трансплантація, ішемія, регенерація, FGF-2, EMMPRIN, електронна мікроскопія, поведінкові розлади

## АННОТАЦИЯ

**Цупиков О. М. Влияние трансплантации стволовых клеток на процессы регенерации нервной ткани после ишемического повреждения головного мозга. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2018.

В диссертационной работе представлены результаты морфофункциональных исследований влияния трансплантации стволовых клеток различного генеза на процессы регенерации нервной ткани головного мозга и поведенческие феномены на различных моделях ишемического повреждения головного мозга как у взрослых, так и у новорожденных животных. На модели глобальной кратковременной ишемии головного мозга мышей показано, что трансплантированные фетальные GFP-положительные нейральные прогениторные клетки (НПК) способны мигрировать в поврежденные участки зоны CA1 гиппокампа, дифференцироваться как в астроциты, так и в зрелые нейроны, которые образуют синаптические контакты с нейронами реципиента. Также показано, что ишемическое повреждение гиппокампа вызывает нарушение когнитивных функций (пространственную память), а стереотаксическая трансплантация НПК способствует восстановлению пространственной памяти у животных после ишемического повреждения мозга. На *in vivo* модели перивентрикулярной лейкомаляции (ПВЛ) показано, что трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) способствует восстановлению кортикоспинальной функции у животных после ПВЛ, уменьшает деградацию основного белка миелина и тормозит развитие астро- и микроглиоза. Впервые на созданной нами *in vitro* модели ПВЛ показано, что ММСК в условиях их бесконтактного кокультивирования со срезами головного мозга имеют нейропротекторный эффект на нервную ткань, уменьшая реактивный астро- и микроглиоз и увеличивая количество Rip-иммунопозитивных олигодендроцитов. Впервые показано, что сверхэкспрессия FGF-2 в НПК способствует их тесному контакту с сосудистой сетью, формированию околососудистых BrdU-положительных спиралевидных пролиферативных кластеров и образованию пула незрелых DCX-положительных нейронов в ответ на ишемическое повреждение мозга. Впервые исследовано влияние трансформации эндогенных НПК в направлении сверхэкспрессии индуктора экстрацеллюлярных матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN) на их миграционные способности из субвентрикулярной зоны в зону ишемического повреждения в соматосенсорной коре. Показано, что НПК, которые сверхэкспрессируют EMMPRIN, мигрируют в поврежденную соматосенсорную кору дальше в сравнении с контрольными НПК и образуют популяцию нейральных прогениторов в поврежденном участке коры. Впервые показано, что трансплантированные нейроны, образованные из iPСК человека, которые были локализованы в соматосенсорной коре рядом с зоной ишемического повреждения, получают прямые синаптические входы от нейронов реципиента. Полученные данные расширяют существующие представления о клеточных механизмах нейропротекторного действия трансплантированных стволовых клеток при ишемических повреждениях головного мозга.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, трансплантация, ишемия, регенерация, FGF-2, EMMPRIN, электронная микроскопия, поведенческие расстройства.

## SUMMARY

**Tsupykov O.M. Effect of stem cell transplantation on the processes of nervous tissue regeneration after ischemic brain injury. – Manuscript.**

Dissertation for the degree of Doctor of medical sciences, specialty 14.03.04 – pathological physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

We investigated the effect of stem cells transplantation on the regeneration of nervous tissue and behavioral phenomena on different models of cerebral ischemic injury in both adults and newborns. It has been shown that transplanted fetal GFP-positive neural progenitor cells (NPCs) able to migrate to damaged region of the CA1 hippocampal area, to differentiate both in astrocytes and in mature neurons that form synaptic contacts with host neurons. We demonstrated that global short-term cerebral ischemia resulted into cognitive impairments in mice. Stereotaxic transplantation of NPCs promoted the cognitive function recovery in experimental animals after ischemic brain injury. On the developed *in vitro* model of periventricular leukomalacia (PVLmiv) we showed that the presence of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) in the non-contact co-culture of brain slices diminished PVLmiv effects improving cell viability, preventing degradation of oligodendocytes and extensive astro- and microgliosis in brain slices. Our data suggest that protective capacity of MMSCs can be executed distantly most likely via released biomodulatory compounds. We showed that FGF-2-transduced progenitors grafted in the early postnatal rat cortex have the distinct tendency to associate with the vasculature and establish multiple proliferative clusters in the perivascular environment. Our data provide evidence that engineering neural progenitors to overexpress FGF-2 may be a suitable strategy to improve the integration of grafted neural progenitor cells with the host vasculature thereby generating neurovascular clusters with a neurogenic potential for brain repair. For the first time, we showed that extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) overexpressing SVZ cells invade the injured cortical tissue more efficiently than controls. Our results suggest that EMMPRIN overexpression could be suitable approach to improve capacities of endogenous or transplanted progenitors to invade the injured cortex. For the first time, we demonstrated that transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons can become incorporated into injured cortical circuitry. Our findings support the idea that these neurons could contribute to functional recovery in stroke and other conditions causing neuronal loss in cerebral cortex.

**Keywords:** stem cells, transplantation, ischemia, regeneration, FGF-2, EMMPRIN, electron microscopy, behavioral disorders

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

AQP-4 – аквапорин-4  
 BDNF – нейротропний фактор  
 BrdU – 5-бромдезоксіуридин  
 CD – кластер диференціювання  
 DAB - 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлорид  
 DCX – даблкортин  
 EMMPRIN – Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer – індуктор екстрацелюлярних матриксних металопротеїназ  
 FGF-2 – фібрилярний фактор росту  
 GDNF – нейротропний фактор, що продукується лінією гліальних клітин  
 Iba-1 - іонізована кальцій-зв'язуюча молекула-1  
 GFP – зелений флюоресцентний білок  
 IL – інтерлейкін  
 NeuN - нейрональні ядра  
 VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту  
 БМ – базальна мембрана  
 ВЛМ – водний лабіринт Морріса  
 ДЦП – дитячий церебральний параліч  
 ЕМ – екстрацелюлярний матрикс  
 іПСК – індуковані плюрипотентні стовбурові клітини людини  
 ІЩ – сумарна кількість мічених клітин, яка підраховується в кожному шарі зони CA1 гіпокампа на 100 мкм<sup>2</sup> площини зрізу  
 КГД – киснево-глюкозна депривація  
 ЛДГ – лактатдегідрогенеза  
 ЛПС – ліпополісахариди  
 ЛЩ – лінійна щільність клітин  
 MAP-2 – білок-супутник мікротрубочок-2  
 ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини  
 МНС – основний комплекс гістосумісності  
 НПК – нейральні прогеніторні клітини  
 НСК – нейральні стовбурові клітини  
 ПВЛ – перивентрикулярна лейкомаляція  
 СВЗ (SVZ) – субвентрикулярна зона бокових шлуночків  
 СГЗ (SGZ) – субгранулярна зона зубчастої звивини  
 СК – стовбурові клітини  
 ССК – соматосенсорна кора  
 ТО – трансдукуюча одиниця  
 ФА – формальдегід  
 ФБС – фетальна бичача сироватка  
 ФНТ – фетальна нервова тканина  
 ШПШ – ширина променистого шару