Секция «Физиология человека и животных»

Внеклеточные везикулы мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток как новое направление в терапии нейродегенеративных заболеваний

Научный руководитель – Силачев Денис Николаевич

Головичева Виктория Вячеславовна
Студент (бакалавр)
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия
E-mail: Golovicheva2016@mail.ru

Введение. Эффективность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MSC) в терапии различных повреждений мозга показана во многих исследованиях [2]. Предполагается, что терапевтический эффект обусловлен паракринной сигнализацией через внеклеточные везикулы (MSC-EV), содержащие ряд биологически активных молекул, обладающих трофическими и нейропротекторными свойствами [1].

Материалы и методы. MSC-EV были получены из кондиционированной среды MSC послеродовой плаценты методом дифференциального центрифугироания. Оценку терапевтической способности MSC-EV in vivo проводили на моделях черепно-мозговой травмы (TBI) взрослых крыс и неонатальной гипоксии-ишемии (HI) семисуточных крысят. MSC-EV вводили интраназально (TBI+MSC-EV_I/N - 15 животных, HI+MSC-EV - 7 животных) и внутривенно (TBI+MSC-EV_I/V - 7 животных) в дозе 30 мкл на крысу (4,3 х 10^{10}частиц/мл), группам TBI (15 животных) и HI (17 животных) вводили PBS вместо MSC-EV. Неврологический дефицит оценивался в тестах «Цилиндр» и «Постановка конечности на опору». Объем повреждения оценивали по МР-изображениям. Для более детального изучения терапевтических механизмов MSC-EV использовали модель кислородно-глюкозной депривации (OGD) и модель NH_4Cl-токсичности (8 мМ) на нейроглиальной культуре клеток гиппокампа крысы, которые предварительно инкубировали с MSC-EV 24 часа. Уровень $[Ca^{2+}]_i$ клеток оценивали с помощью красителя Fura-2AM (1 мкг/мл). Число жизнеспособных и мертвых клеток определяли с использованием двойного окрашивания Hoechst 33342 (1 мкг/мл) и Propidiumiodide (1 мкг/мл).

Результаты. Курсовая и/н инстилляция MSC-EV достоверно снижает выраженность неврологического дефицита после TBI и HI (рисунок 1). MSC-EV значимо защищают клетки гиппокампа от гибели после OGD через снижение Ca^{2+} нагрузки во время глобального роста цитозольного кальция (рисунок 2). Инкубация с MSC-EV культуры гиппокампа приводит к снижению количества мертвых клеток после 48 часов гипераммонимии (рисунок 3). MSC-EV достоверно ускоряют рост нейритов в ходе развития нейроглиальной сети гиппокампа in vitro в течение первых 7 суток культивирования (рисунок 3).

Выводы. MSC-EV препятствуют глобальному повышению $[Ca^{2+}]$i, что, как мы предполагаем, обуславливает их нейропротекторные свойства. Вероятно, MSC-EV содержат ростовые факторы, модулирующие кальциевый ответ нейронов и астроцитов на повреждения и способствующие активному росту культуры.

Источники и литература

1) Li Y, Cheng Q, Hu G, Deng T and et al. Extracellular vesicles in mesenchymal stromal cells: A novel therapeutic strategy for stroke. Experimental and Therapeutic Medicine, 22 Mar 2018, 15(5):4067-4079

2) Paton MCB, McDonald CA, Allison BJ, Fahey MC and et al. Perinatal Brain Injury As a Consequence of Preterm Birth and Intrauterine Inflammation: Designing Targeted Stem Cell Therapies. Front Neurosci. 2017 Apr 10;11:200

Иллюстрации

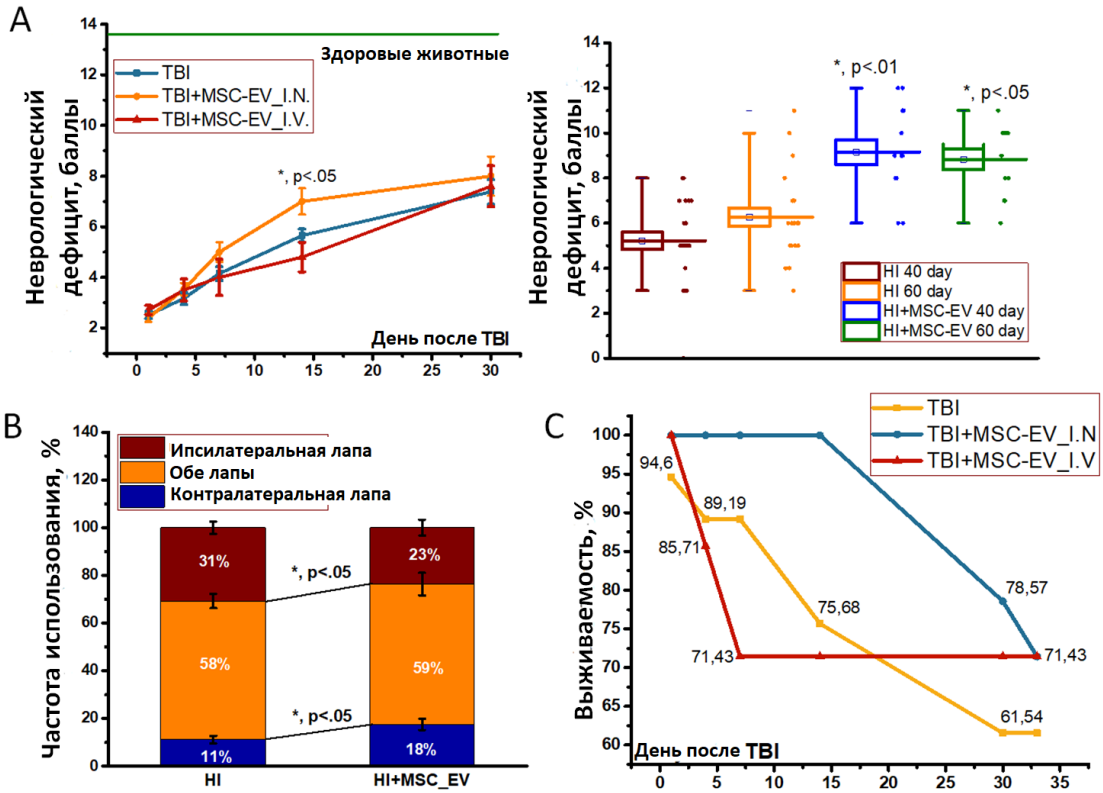

Рис. 1. MSC-EV восстанавливают сенсомоторные функции после TBI и HI. A - результаты теста «Постановка конечности на опору» на 1, 4, 7, 14 и 30-е сутки после TBI (слева) и на 40, 60-е сутки после HI (справа). Неврологический дефицит был значимо восстановлен в группах TBI+MSC-EV_I/N и HI+MSC-EV по сравнению с контрольной группой без лечения. B - результаты теста «Цилиндр» на 60 сутки после HI, частота использования контралатеральной поврежденному полушарию лапы увеличивалась для группы HI+MSC-EV по сравнению с группой HI. C- диаграмма выживаемости животных после TBI. Данные достоверны при *p<0,05, Mann Whitney test.

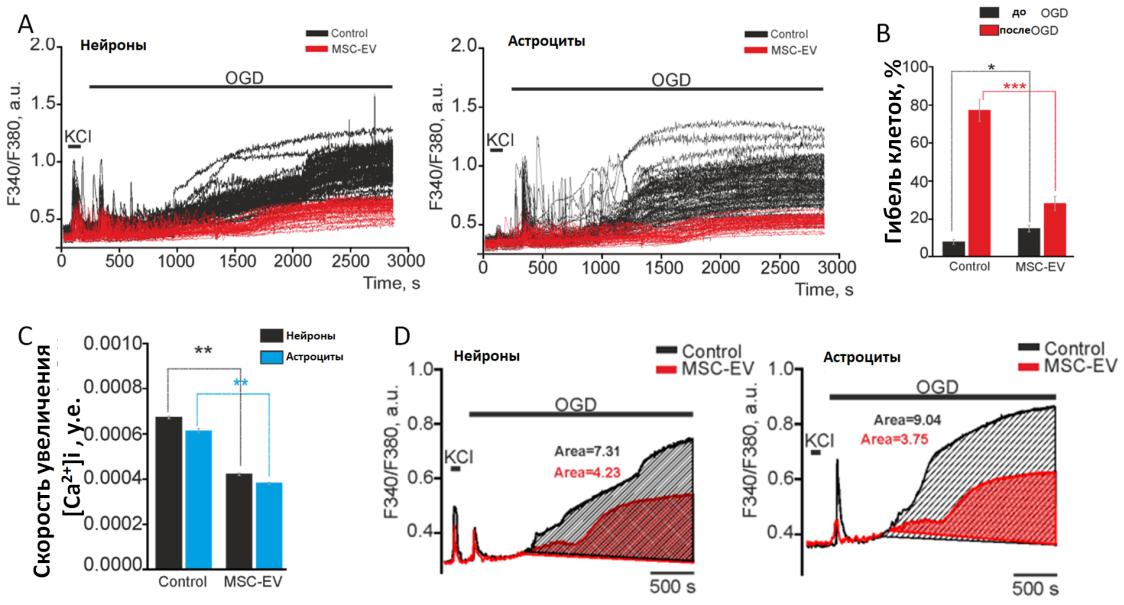

Рис. 2. Нейропротекторное действие 24-часовой инкубации клеток гиппокампа с 50 мкл (2,15 x 10^9 частиц) MSC-EV в модели кислородно-глюкозной депривации (OGD). A - Ca2+-сигналы нейронов и астроцитов во время 40-минутной OGD в контроле (черные кривые) и после 24-часовой инкубации с MSC-EV (красные кривые). B - Усредненное количество окрашенных PI клеток, погибших вследствие OGD-индуцированного некроза в контроле (Control) и после 24-часовой инкубации с MSC-EV (MSC-EV) (% ± SE). C - Влияние MSC-EV на скорость увеличения [Ca2+]i во второй фазе ишемического кальциевого ответа. D - Площадь под кривой во второй фазе ишемического ответа нейронов и астроцитов в контроле (Control) и после инкубации с MSC-EV (MSC-EV), отражающая кальциевую нагрузку на клетки. * – различия статистически значимы при p<0.05; ** – при p<0,01 и *** при p ≤ 0.001, Mann Whitney test.

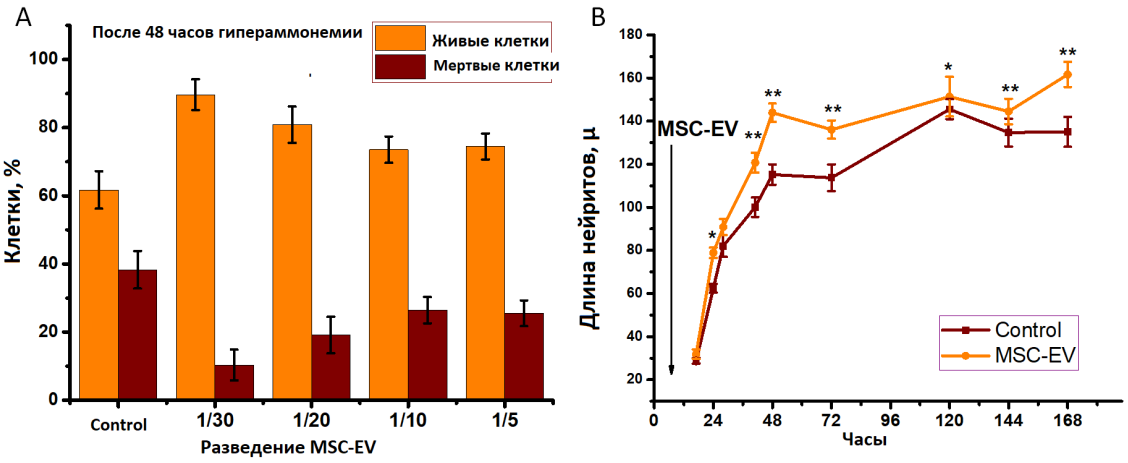

Рис. 3. A - Защитное действие различных концентраций MSC-EV в модели гипераммонемии. B - Изменение средней длины нейритов в контроле и в присутствии 50 мкл (2,15 x 10^9 частиц) MSC-EV в процессе культивирования (MSC-EV добавлены через 4 часа после прикрепления клеток). Данные достоверны при *p<0,05 и **p<0,01, Mann Whitney test.