

Середовище, кондиційоване мезенхімальними стовбуровими клітинами, як джерело нейропротекторних факторів

Е. Шекіова¹, Л. Словінська¹, Ю. Блашко¹, Д. Чижкова^{2,3}

¹Інститут нейробиології, Словацька академія наук, Кошице, Словаччина

²Інститут нейроімунології, Словацька академія наук, Братислава, Словаччина

³Університет ветеринарної медицини та фармації у Кошице, Словаччина

Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium as a Source of Neuroprotective Factors

B.E. Szekiova¹, L. Slovinška¹, J. Blasko¹, D. Čížkova^{2,3}

¹Institute of Neurobiology, Slovak Academy of Sciences, Kosice, Slovakia

²Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

³University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovakia

Ефективність лікування захворювань стовбуровими клітинами, найвірогідніше, пов'язана з їх паракриною активністю, ніж зі здатністю диференціюватися в різні типи клітин. У цьому дослідженні вперше було *in vitro* піддано нервові клітини впливу середовища, кондиційованого клітинами травмованого спинного мозку (ТСМ-КС), що моделювало місцеве запальне мікросередовище. На кортикальних нейронах та астроцитах оцінено при запаленні нейропротекторний ефект середовища, кондиційованого замороженими-відтаяними мезенхімальними стовбуровими клітинами, отриманими з жирової тканини (ЖТМСК-КС).

Первинні культури клітин, виділені з кори головного мозку 6-денних щурів лінії Wistar, культивували протягом 48 годин у ТСМ-КС, потім замінювали середовище на DMEM (нелікована група) або на ЖТМСК-КС (лікована група) і культивували подальші 72 години. Вплив ТМСК-КС на життєздатність нейронів і астроцитів оцінювали за допомогою тестів для проліферації клітин CyQUANT[®] та імуноцитохімічного аналізу. Аналогічні процедури виконували з первинними культурами кори головного мозку, що піддавалися впливу середовища, кондиційованого тканиною неушкодженого спинного мозку (контроль).

Імуноцитохімічний аналіз показав суттєве зменшення числа MAP2-позитивних нейронів після культивування у ТСМ-КС відносно контролю. Захисний ефект ЖТМСК-КС був пов'язаний зі збільшенням виживання нейронів у порівнянні з первинною культурою, культивованою лише в середовищах DMEM. Вплив ЖТМСК-КС на астроцити не мав значущого впливу.

Встановлено, що ТСМ-КС через 48 годин зменшує кількість нейронів, але не астроцитів. Дія ЖТМСК-КС підвищувала виживання MAP2-позитивних нейронів. Популяція GFAP-позитивних астроцитів, присутня у первинній клітинній культурі, не змінювалася після впливу ТСМ-КС, проте після інкубування з ЖТМСК-КС незначно зменшувалася кількість астроцитів. Загальна відповідь астроцитів показала високу варіативність без значних змін. Можливо, що ЖТМСК-КС має нейропротекторний ефект за рахунок паракринних трофічних факторів, але наявна варіабельність впливу вимагає подальшого вивчення.

Таким чином, моделювання запалення за допомогою ТСМ-КС може призвести до зменшення виживання кортикальних нейронів, а наступний вплив ЖТМСК-КС сприяє стабілізації популяції нейронів, вірогідно, через вивільнення нейропротекторних та трофічних факторів. Крім того, ЖТМСК-КС не впливала на астрогліоз.

Робота була підтримана в рамках проекту VEGA 2/0145/16.

The importance of mesenchymal stem cells in the treatment of CNS diseases, described in recent studies, is attributed to their paracrine activity rather than their ability to differentiate into different cell types. In this study we demonstrate a new approach with an *in vitro* model in which neural cells were exposed to conditioned media from the injured spinal cord (SCI-CM) mimicking a local inflammatory microenvironment. Subsequently, the neuroprotective effect of frozen rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-conditioned media (ATMSC-CM) was investigated through a cell-free based therapy, which was used to treat cortical neurons and astrocytes under inflammation.

Primary cell cultures isolated from postnatal day (P6) Wistar rat brain cortex were exposed to SCI-CM derived from rat injured spinal cord. After 48h incubation the SCI-CM was replaced and primary cultures were cultivated either in DMEM media alone (untreated group) or in ATMSC-CM (treated group) for 72 h. The impact of ATMSC-CM on the viability of neurons and astrocytes was assessed using a CyQUANT[®] Direct Cell Proliferation Assay Kit as well as immunocytochemistry analysis. The same procedure was performed with cortex primary cell culture exposed to conditioned media derived from uninjured spinal cord (control).

Immunocytochemical analysis revealed significant decrease in the number of MAP2 positive neurons exposed to SCI-CM compared to control. Protection by ATMSC-CM was associated with increased survival of neurons compared to untreated primary culture cultivated in DMEM media alone. The ATMSC-CM effect on astrocytes was more variable and without any significant impact.

Our results indicate that SCI-CM diminished the number of neurons but not astrocytes after 48h exposure. Treatment with ATMSC-CM enhanced survival of MAP2 positive neurons. Furthermore, our findings indicate that the population of GFAP positive astrocytes present in primary cell culture did not change after exposure to SCI-CM, but incubation with ATMSC-CM caused mild reduction of astrocytes. However, the overall response of the astrocytes showed high variability with no significant changes. Based on our results we can suggest that ATMSC can exert a neuroprotective effect through their paracrine production of trophic factors included in CM, but with some variability which requires further study.

Our results confirm that SCI-CM mimicking inflammation can reduce cortical neuron survival, and subsequent exposure to ATMSC-CM can stabilize the neuronal population most likely via released neuroprotective and trophic factors. In addition, astrogliosis was not affected by ATMSC-CM.

This work was supported by VEGA 2/0145/16.

