

УДК 576.5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА С ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК ГИППОКАМПА МЫШЕЙ 5XFAD ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. В. Чаплыгина^{а, *}, Д. Ю. Жданова^а, В. И. Ковалев^а,
Р. А. Полтавцева^б, Н. В. Бобкова^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

^бНациональный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России,
Москва, 117198 Россия

*e-mail: shadowhao@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 04.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

В работе изучен характер взаимного влияния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека, и первичной культуры клеток гиппокампа трансгенных 5XFAD мышей – модели наследственной формы болезни Альцгеймера (БА). Для идентификации ММСК в “химерной культуре” использовали антитела к ядерному человеческому антигену, принадлежность клеток к нейронам или астроцитам определяли по наличию позитивной иммунореактивности к маркерным белкам MAP2 и GFAP, соответственно. Показано, что результат взаимодействия зависит как от способа культивирования, так и от возраста культуры. При непрямом (бесконтактном) культивировании агрессивная среда трансгенной культуры влияла на выживаемость и ухудшала адгезивные свойства ММСК. Предварительная обработка этих клеток стресс-белками γ B-1 и HSP70, обладающими нейропротекторными свойствами, повышало резистентность ММСК. В молодой культуре при контактном культивировании ММСК играют роль специфических тяжей, способствующих группированию культуры клеток гиппокампа трансгенных мышей и образованию нейросфер. В старых трансгенных культурах вне зависимости от способа культивирования ММСК дифференцировались в астроциты, но при длительном прямом культивировании часть ММСК становилась иммунопозитивной к нейрональному маркеру MAP2. В работе показано, что взаимодействие ММСК с клетками культуры может осуществляться с участием щелевых контактов, а также благодаря формированию нанотрубок. Полученные результаты свидетельствуют о наличии сложных взаимоотношений донорских ММСК и клеток реципиента, что необходимо для внедрения клеточной терапии в практику лечения больных БА.

Ключевые слова: 5XFAD, мезенхимные стромальные клетки, первичная нейрональная культура, клеточная терапия

DOI: 10.31857/S0233475523030040, **EDN:** EWMQDL

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на широкое использования клеточной терапии в кардиологии, патологии периферической нервной системы и онкологии, ее применение для лечения нейродегенеративных заболеваний пока ограничено доклиническими испытаниями. Сложность проблемы обусловлена как свойствами самих клеток, выбираемых для трансплантации, так и спецификой нейродегенеративного процесса. В регенеративной медицине в качестве перспективного средства наиболее часто

рассматривают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) [1, 2], однако механизмы их терапевтического действия остаются не до конца выясненными.

Первоначально полагали, что эффективность ММСК связана со способностью к направленной миграции в патологический очаг и замене погибших и видоизмененных клеток. В последнее время их лечебный эффект также связывают с паракриной активностью, что проявляется в выделении целого ряда биологически активных соединений, таких как нейротрофический фактор глиального

происхождения (GDNF), NGF и BDNF, что способствует локальному подавлению патологического процесса [3–5]. Трансплантация ММСК животным с моделями БА оказывала положительное неврологическое воздействие [6, 7]. ММСК способны усиливать дифференцировку нейронов и индуцировать пролиферацию эндогенных нервных клеток-предшественников [7]. Недавние исследования показали наличие у ММСК системных эффектов, проявляющихся, в частности, в поддержании гомеостаза мозга [8, 9]. Также они могут способствовать эндогенному росту нейритов, вызывают синаптическое образование, снижают уровень свободных радикалов в локальном окружении, уменьшают апоптоз и регулируют воспаление [10–12]. В отношении ММСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека, известно, что они могут регулировать секрецию GDF-15, играющего ключевую роль в иммуносупрессии, нейропротекции и регуляции роста клеток, а также усиливать способность микроглиальных клеток к клиренсу A β [13]. ММСК выделяют в среду как свободные биологически активные соединения, так и экстрацеллюлярные везикулы, содержащие различные цитокины, ангиогенные факторы и даже митохондрии [2, 9], которые попадают в клетки реципиента через механизм эндоцитоза, благодаря образованию наноканалов от ММСК к клеткам реципиентной культуры [14], а также образуя щелевые и межклеточные контакты классического типа [15–17].

В наших ранних исследованиях также был обнаружен позитивный эффект трансплантации фетальных нейрональных прогениторов и ММСК, выделенных из костного мозга или Вартонова студня пупочного канатика, на память ольфакторно бульбэктомированных (ОБЭ) животных — модели спорадической формы БА [18, 19], что согласуется с исследованиями, в которых ММСК восстанавливают когнитивные способности и память [20]. На других животных моделях БА было показано, что позитивный эффект ММСК обусловлен активацией микроглии и очисткой мозговой ткани от патологических амилоидных бляшек, а также снижением амилоидогенного процессинга APP, снижением апоптоза нейронов и активацией нейрогенеза [21, 22]. При этом ММСК оказались относительно безопасными и эффективными нейропротекторами и иммуномодуляторами [23–26].

Таким образом, терапия на основе ММСК может иметь многообещающие перспективы. Однако во избежание неблагоприятных побочных эффектов трансплантации необходимо детально исследовать характер и последствия взаимного влияния донорских клеток и тканей реципиента. Характер влияния агрессивной среды мозга, пораженного нейродегенерацией, на выживаемость и пути дифференцировки трансплантированных

ММСК, а также подходы для повышения их резистентности изучали с использованием первичной культуры клеток гиппокампа трансгенных 5XFAD мышей и ММСК из Вартонова студня пупочного канатика человека в условиях прямого и непрямого культивирования. В наших экспериментах исследована возможность повышать выживаемость ММСК и модулировать их адгезию под влиянием стресс-белков γ B-1 и HSP70, обладающих выраженным нейропротекторным эффектом [27–30]. В нашем исследовании также проанализирована способность ММСК к дифференцировке в астроциты и нейроны в зависимости от условий культивирования с гиппокампальной культурой мышей 5XFAD, моделирующей нейродегенеративный процесс в мозге при БА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линия мышей 5XFAD. Работа выполнена на первичной культуре клеток гиппокампа новорожденных трансгенных мышей линии 5XFAD, которые коэкспрессируют шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации APP (695) человека, а также M146L и L286V мутации в пресенилине 1 с экспрессией обоих трансгенов под Thy1 промотором. Клетки трансгенной культуры постепенно накапливают бета-амилоид, и используются как модель, в которой бета-амилоид является причиной дальнейшей нейродегенерации.

Исследование проведено в строгом соответствии с “Правилами проведения исследований с экспериментальными животными” (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Все процедуры на мышах были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (Институт биофизики клетки — Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, разрешение № 3 от 12 июня 2020 г.) в соответствии с Директивой 2010/ 63/ЕС Европейского парламента.

Генотипирование мышей проводили с помощью ПЦР ДНК, выделенной из биоптатов уха. Наличие трансгенной кассеты выявлялось с помощью праймеров 5'-AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG-3' и 5'-CGG GGG TCT AGT TCT GCA T-3' с последующей электрофоретической визуализацией для выявления носителей трансгенной кассеты длиной 377 п.н. Трансгены вставлены в один локус Chr3:6297836, где они не влияют ни на какие известные гены.

ММСК. Получение ММСК из Вартонова студня пупочного канатика проводили имеющие специальное разрешение для подобного вида работ сотрудники ФГБУ “Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения РФ

(ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России) в рамках заключенного с этой организацией договора. Первичную культуру ММСК выделяли из Вартонова студня пупочного канатика, полученного после операции кесарева сечения от разных (не менее пяти) здоровых обследованных рожениц. Забор материала осуществляли с письменного информированного согласия доноров. Образцы тканей механически измельчали и помещали в 0.1% раствор коллагеназы типа I (Gibco) в течение 60 мин при 37°C. После инкубации суспензию осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 200 g. Осадок ресуспендировали в DMEM (Gibco) – F12 (ПанЭко, Россия) (1 : 1) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% Пенициллин-стрептомицин-глутамин (Gibco) и помещали в культуральные флаконы объемом 25 см² (Corning). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂. При плотности культуры в 80% клетки снимали 0.05% трипсином (ПанЭко).

Методом проточной цитофлуориметрии был охарактеризован фенотип выделенных ММСК с применением специфических маркеров. Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur и программного обеспечения BD CellQuest Pro (BD Biosciences, США). Клеточная популяция выделялась по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Оценивали экспрессию таких маркеров, как CD90, CD105, CD73, CD19, HLA-DR. Уровень экспрессии исследуемого маркера оценивали по гистограмме интенсивности флуоресценции. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили с использованием моноклональных антител, конъюгированных с фикоэритрином. Для анализа клетки снимали с поверхности флакона раствором трипсина, дважды промывали буфером для окрашивания (PBS, 1.0% эмбриональной сыворотки КРС и 0.1% азида натрия). К клеткам добавляли по 15 мкл меченых антител к одному из изучаемых поверхностных маркеров, доводя объем клеточной суспензии до 100 мкл. В образцы, служащие отрицательным контролем, добавляли соответствующие изотипические антитела. Клеточную суспензию инкубировали при температуре + 4°C в течение 1 ч. После инкубации клетки отмывали 2 раза в 1 мл буфера для окрашивания и фиксировали в 0.5 мл 2% раствора параформальдегида. Полученную клеточную суспензию фильтровали через фильтр с диаметром пор 30 мкм. Анализ интенсивности флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре-сортере FACSAria (Becton Dickinson Co.).

В дальнейших экспериментах использовали клетки, прошедшие не более 6 пассажей.

Первичная культура клеток гиппокампа мышей линии 5XFAD. Культуры клеток гиппокампа получали из мозга новорожденных мышей. Гиппокамп механически измельчали, после чего обрабатывали раствором трипсина с EDTA (Trypsin-EDTA, Gibco). Далее суспензию клеток, вносили в лунки планшета, покрытые полилизинном (Poly-D-Lysine, Gibco), и добавляли нейробазальную среду Neurobasal Medium (Gibco), содержащую 2% биоактивной добавки B-27 Supplement (Gibco) и 1% пенициллин-стрептомицин-глутамин (Gibco). Смена среды проводилась на четвертый день. Планшеты с культурами помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂), при температуре 37°C. Полученные нами 2D культуры клеток гиппокампа этих животных остаются жизнеспособными в течение более 30 дней культивирования, что позволяет провести полноценное исследование по анализу взаимовлияния ММСК и культуры гиппокампа с признаками нейродегенерации. Нами были использованы как молодые (14 дней), так и стареющие (28 дней) трансгенные культуры.

Совместное культивирование первичной культуры клеток гиппокампа мышей линии 5XFAD и ММСК. ММСК, снятые с культурального флакона, окрашивали трипановым синим для оценки количества нежизнеспособных клеток и далее подсчитывали их количество в камере Горяева. Совместное культивирование клеток проводилось двумя способами.

В первом случае на покровные стекла, покрытые полилизинном, крупной каплей наносили ММСК так, чтобы клетки находились на значительном удалении друг от друга и не слипались в агрегаты (соотношение количества ММСК к количеству клеток нейрональной культуры составляло 1 : 3), стекла оставляли в CO₂-инкубаторе на 2 ч для плотного прикрепления клеток. После этого стекла с прикрепленными ММСК располагали в лунках с предварительно подготовленными первичными культурами (непрямое культивирование). В этом случае между ММСК и клетками гиппокампальной культуры исключены прямые контакты, стекло с ММСК оснащается специальными ножками-держателями из парафильма и находится над культурой. Во втором случае ММСК вносили непосредственно в нейрональную культуру (прямое культивирование) в соотношении 1 : 3. Совместное культивирование проводилось в течение пяти дней, двух недель и, в одном случае, месяца.

Обработка ММСК стресс-белками. Для повышения выживаемости ММСК в агрессивных условиях трансгенной культуры проводилась предварительная обработка ММСК стресс-белками HSP70 и YB-1. Для этого среда в культуральном флаконе с ММСК на 2 ч заменялась на среду, содержащую 30 нМ стресс-белков, после чего в течение суток

проводилось не прямое культивирование ММСК с 14-дневной культурой трансгенных мышей.

Выживаемость клеток. Для анализа выживаемости ММСК клеток в гиппокампальных культурах применили два независимых теста.

1). MTS-тест на основе оценки метаболической активности — колориметрический тест для оценки метаболической окислительно-восстановительной активности клеток. Реактив MTS под действием митохондриальных дегидрогеназ жизнеспособных клеток восстанавливается до не растворимого в воде формазана фиолетового цвета. В экспериментальные планшеты добавляли MTS (исходная концентрация 5 мг/мл) по 10 мкл на лунку; клетки инкубировали в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе. Затем извлекали стекла с ММСК, перенося их в отдельные планшеты, и добавляли ДМСО. Клетки встряхивали на шейкере для лучшего перемешивания и растворения кристаллов формазана в ДМСО и переносили в лунки 96-луночного планшета. Эксперименты проводились в отсутствие интенсивного света, поскольку MTS и формазан фоточувствительны. Образцы были проанализированы на микропланшетном фотометре (Thermo Fisher) для измерения оптической плотности на фильтре 570 нм.

2). Тест с использованием двух флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (Invitrogen) и йодида пропидия PI (Thermo Scientific), которые растворяли в культуральной среде в рабочей концентрации 10 и 30 мкМ соответственно. После 30-мин инкубации клеток в среде с Hoechst 33342 в CO₂-инкубаторе добавляли йодид пропидия и изучали клетки под микроскопом. Таким образом, проводилась оценка влияния непрямого культивирования с ММСК на жизнеспособность гиппокампальных трансгенных культур возрастом 14 и 28 дней, а также оценивалось влияние трансгенной культуры на жизнеспособность самих ММСК.

Клеточная адгезия. В специальном эксперименте для изучения адгезионных свойств ММСК (прикрепление ММСК к поверхности стекла, обработанного опорным субстратом), ММСК, снятые с культурального флакона, окрашивали трипановым синим для оценки количества нежизнеспособных клеток и далее подсчитывали их количество в камере Горяева. На покровные стекла, покрытые опорным субстратом Poly-D-Lysine, крупной каплей наносили ММСК так, чтобы клетки находились на значительном удалении друг от друга и не слипались в агрегаты (соотношение количества ММСК к количеству клеток нейрональной культуры составляло 1 : 3), стекла оставляли в CO₂-инкубаторе на 2 ч для плотного прикрепления клеток. После чего стекла с прикрепленными ММСК располагали в лунках с предварительно подготовленными первичными культурами напротив друг друга, разделенные только слоем культу-

ральной жидкости, в течение 5 дней. После этого стекла вынимали, в течение 10 мин фиксировали 4% параформальдегидом, после чего проводили съемку на микроскопе в светлом поле. В счетчике клеток в программе ImageJ подсчитывали количество оставшихся на стекле клеток. В качестве контроля клетки, посаженные аналогичным образом, находились в среде DMEM-F12.

Образование межклеточных контактов. Для оценки образования каналов между ММСК и клетками в трансгенной культуре гиппокампа мы предварительно в течение 30 мин при 37°C проводили окрашивание ММСК в бессывороточной среде, содержащей 10 мкМ кальцеина АМ (Sigma-Aldrich). В живых клетках не флуоресцентный кальцеин АМ после гидролиза ацетоксиметилового эфира внутриклеточными эстеразами превращается в кальцеин, флуоресцирующий в зеленой области спектра (возб./эмисс. 494/517 нм). Данный краситель может проходить через щелевые контакты и передаваться от клетки в клетку. После этого меченые клетки отмывали, снимали раствором трипсина с EDTA (Trypsin-EDTA) и осаждали центрифугированием (5 мин, 1000 об/мин). Осадок меченых кальцеином клеток суспендировали в полной ростовой среде, подсчитывали в камере Горяева и готовили суспензию с концентрацией 30000 клеток в 200 мкл для внесения в культуру клеток гиппокампа мыши. Совместное культивирование проводили в течение 3 ч. В качестве контрольных образцов служили ММСК, обработанные ингибитором щелевых каналов динатриевой солью карбенексолона (Sigma-Aldrich) в концентрации 100 мкМ. После совместного культивирования клетки фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали Hoechst 33342. Затем регистрировали области перераспределения зеленой флуоресценции от ММСК к клеткам культуры.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для каждого иммунофлуоресцентного анализа, культуры в течение 10 мин фиксировали 4% параформальдегидом. Затем увеличивали проницаемость мембран с помощью 0.2% раствора Triton X-100 и в течение часа при комнатной температуре блокировали неспецифическое связывание с антигенами в растворе PBST (PBS + 0.1% Tween 20) + 1% BSA с применением 10% ослиной сыворотки (Abscam, ab7475) и 5% козлиной сыворотки (Invitrogen, 31872). Культуры инкубировали с первичными антителами 3 ч при комнатной температуре, после чего окрашивали вторичными антителами в течение часа. После каждой процедуры клетки отмывали PBS 3 раза по 5 мин.

Оценка состояния ММСК проводилась через 5 суток их непрямого культивирования с первичной 14-дневной культурой гиппокампа трансгенных мышей. Способность к дифференцировке

ММСК в зрелые нейроны оценивалась по позитивной иммунореактивности к MAP2 (Thermo, pa110005, 1 : 200) с окраской вторичными антителами Alexa Fluor 633 (Invitrogen, A-21103, 1 : 1000), в астроциты – по реактивности к GFAP (Abcam, ab7260, 1 : 500) с окраской вторичными антителами DyLight 488 (GeneTex, GTX76757, 1 : 1000).

Также использовались первичные антитела Anti-MAP2 antibody – маркеры нейронов (Abcam, ab32454, 1 : 100), и Anti-GFAP antibody – маркеры астроцитов (Abcam, ab4674, 1 : 1000), MAB1281 Anti-Nuclei Antibody clone 235-1 для идентификации человеческих клеток (Chemicon, 1 : 100). Вторичная окраска производилась антителами с флуоресцентными метками: AlexaFluor 594 (Abcam, ab150076, 1 : 200), AlexaFluor 488 (Abcam, ab150169, 1 : 2000), AlexaFluor 555 (Abcam, ab206870, 1 : 100), Alexa Fluor 405 (Abcam, ab175660, 1 : 100), Alexa Fluor 405 (Abcam, ab175678, 1 : 200).

Статистический анализ. Результаты MTS-тестов воспроизводились в 10 повторах. Результаты окраски на выживаемость воспроизводились в 6 повторах, съемка производилась на микроскопе JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder на площади $2.95 \times 3.96 \text{ мм}^2$, состоящей из 121 снимка, из каждой серии анализировали не менее 15 изображений. Результаты тестов на адгезивные свойства клеток воспроизводились в 6 повторах, съемку проводили с использованием микроскопа Leica DM IL (объектив $20\times$, видимая площадь – 0.1 мм^2), в каждом повторе снимали по 10–15 изображений. Результаты иммуноцитохимических окрасок воспроизводились в 4 повторах. Съемка производилась на площади $2.95 \times 3.96 \text{ мм}^2$, состоящей из 121 снимка высокого разрешения (площадь снимка $0.268 \times 0.36 \text{ мм}^2$). Результаты тестов образования межклеточных контактов воспроизводились в 6 повторах, съемку проводили с использованием микроскопа Leica DM IL (объектив $20\times$, видимая площадь – 0.1 мм^2), в каждом повторе снимали по 10 изображений. Статистическая обработка проводилась с помощью программного обеспечения Sigma Plot 12.5 с оценкой достоверности по двухстороннему *t*-критерию Стьюдента, а также с использованием непараметрического критерия Стьюдента–Ньюмана–Келса и Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были получены и охарактеризованы мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), выделенные из Вартоновой студня пупочного канатика человека. Цитометрический анализ показал, что эти клетки экспрессируют CD73, CD90 и CD105, а также HLA-ABC, но не экспрессируют лимфоидные маркеры (рис. 1), что полностью от-

вечает требованиям к идентификации клеток как ММСК [31].

Мы изучили клеточное взаимодействие между донорскими ММСК и клетками культуры трансгенных мышей 5XFAD в условиях прямого и непрямого культивирования, что позволяет оценить роль непосредственного межклеточного контакта в исследуемых взаимодействиях между клетками. Данный протокол культивирования удобен для оценки выживаемости клеток без необходимости маркерного разделения двух культур.

Непрямое культивирование. Анализ влияния ММСК на трансгенную культуру при непрямом культивировании показал, что процент погибших клеток в 14-дневной нативной трансгенной культуре составил $3.7 \pm 0.29\%$, а при ее культивировании с ММСК – $4.15 \pm 0.51\%$. На 4-й неделе культивирования в трансгенной культуре происходило резкое увеличение числа погибших клеток до $39.46 \pm 6.98\%$, что в целом характерно для стареющей трансгенной культуры, испытывающей дефицит нейрональной функции с одновременным перепроизводством астроглии. При ее культивировании с ММСК наблюдалась тенденция к снижению гибели клеток до $27.91 \pm 6.5\%$.

Сходные данные были получены при использовании MTS-теста (рис. 2). Трансгенная культура до и после культивирования с ММСК человека практически не изменяла параметры своей метаболической активности (0.18 ± 0.006 отн. опт. ед. в контроле и 0.17 ± 0.004 отн. опт. ед. после культивирования). Однако пребывание ММСК в агрессивной среде трансгенной культуры не только вызывало снижение метаболической активности ММСК с 0.11 ± 0.01 до 0.07 ± 0.004 отн. опт. ед. (рис. 2б), но и одновременно сопровождалось снижением жизнеспособности ММСК. Так, при непрямом культивировании ММСК с трансгенной культурой процент мертвых клеток среди ММСК составил $7.8 \pm 0.26\%$, при их выращивании в нейробазальной среде гибель ММСК составила всего $2.2 \pm 0.13\%$, что совпадает с процентом их выживаемости в естественной для них DMEM-F12 среде.

Иммуноцитохимическое окрашивание культуры ММСК после недельного непрямого культивирования с трансгенными клетками молодой 14-дневной культуры не выявило иммунопозитивности к маркерам MAP2, GFAP, что свидетельствует об отсутствии конечной дифференцировки ММСК в трансгенной культуре в указанные сроки.

В нашей работе была предпринята попытка повысить выживаемость ММСК в агрессивной среде трансгенной культуры применением двух стресс-белков YB-1 и HSP70. Установлено, что предварительная обработка указанными стресс-белками снижала гибель ММСК при их непря-

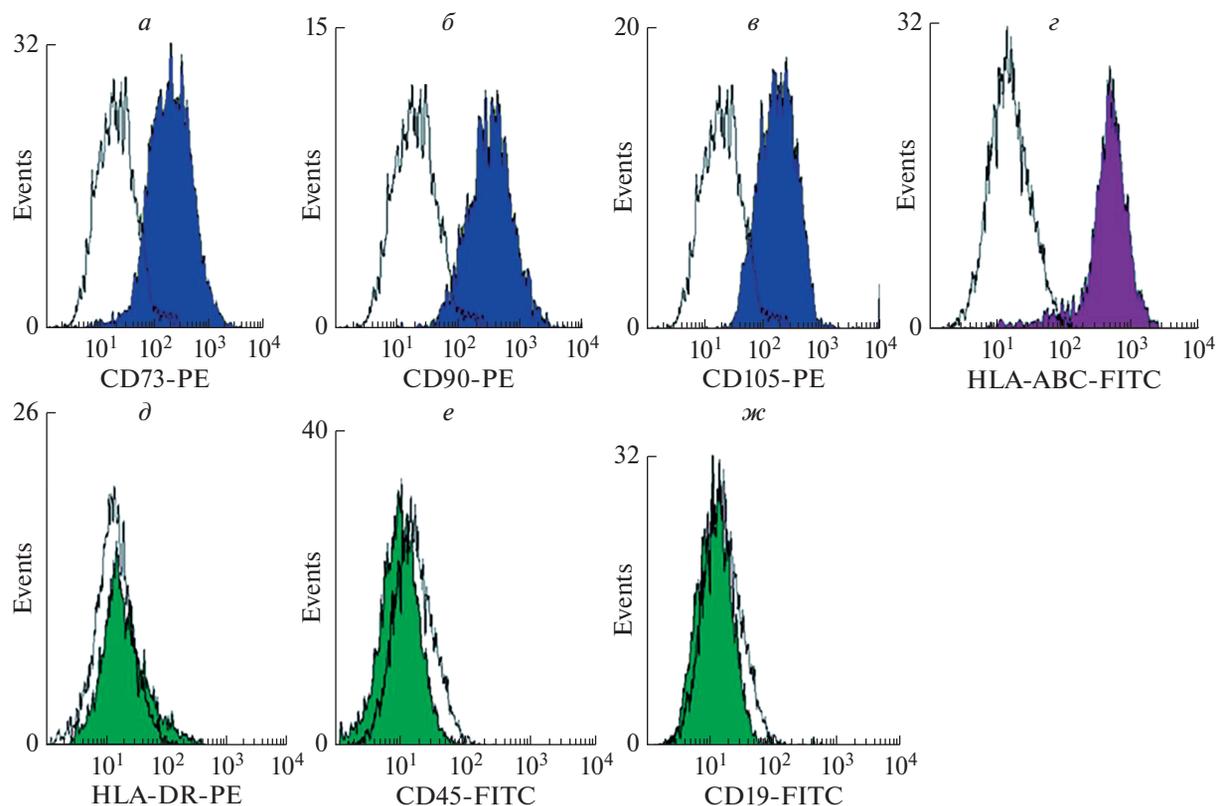


Рис. 1. Экспрессия специфических маркеров CD73 (*а*), CD90 (*б*), CD105 (*в*), HLA-ABC (*г*) и отсутствие экспрессии маркеров лимфоидных клеток HLA-DR (*д*), CD45 (*е*) и CD19 (*ж*) ММСК из Вартонова студня пупочного канатика человека.

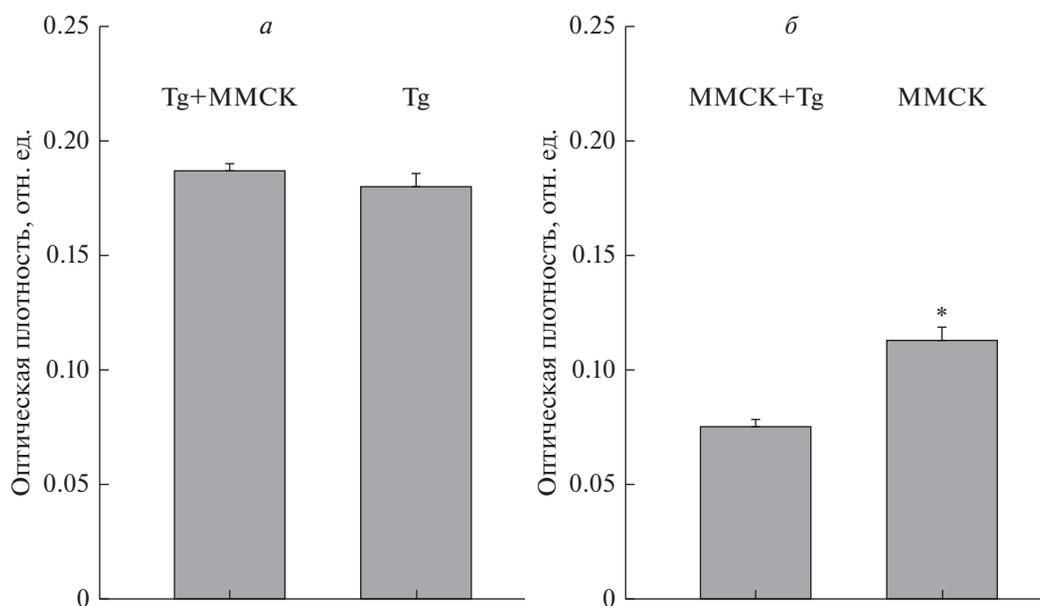


Рис. 2. Метаболическая активность клеток по результатам MTS-теста. *а* – Метаболическая активность клеток трансгенной культуры до и после культивирования с ММСК. *б* – Метаболическая активность ММСК, культивируемых с трансгенной культурой, и в DMEM-F12 – их естественной среде. * Различие между группами достоверно при $p = 0.003$ (t -тест).

мом культивирования с трансгенной культурой (рис. 3). Так, количество мертвых ММСК в трансгенной культуре при их раздельном культивировании после обработки γ -В-1 или HSP70 не отличалось от количества мертвых ММСК в естественной среде. Выбор этих белков был обусловлен их положительными эффектами, выявленными нами ранее на животных моделях спорадической и наследственной форм БА [27, 28], где также было установлено, что эти стресс-белки способны проникать внутрь клеток и повышать резистентность к токсическому действию бета-амилоида. Возможно, в отношении ММСК они оказывают такое же действие, повышая устойчивость ММСК к бета-амилоиду в трансгенной культуре.

Наблюдения над морфологическими изменениями ММСК в процессе их культивирования в разных условиях показали, что ММСК, обычно имеющие правильную полигональную форму с небольшим количеством боковых отростков (рис. 4а), в случае непрямого культивирования с трансгенной культурой демонстрируют разнообразие форм – от длинных “пикообразных” клеток до круглых и небольших клеток с маленькими отростками (рис. 4б).

При непрямом культивировании ММСК с нейрональной культурой трансгенных мышей мы наблюдали, что часть клеток открепляется от обработанного опорным субстратом стекла, что может происходить из-за открепления от субстрата как живых, так и мертвых клеток. Тогда оставшиеся клетки характеризуются способностью более прочно удерживаться на подложке благодаря адгезии, что можно определить количественно и статистически оценить по усредненному по 20 полям зрения на разных стеклах количеству оставшихся в одном поле зрения клеток. Сравнивая полученные данные, мы показали, что после культивирования ММСК с трансгенной культурой достоверно снижается количество клеток, оставшихся на стекле (рис. 4д). В наших экспериментах было показано, что предварительная обработка ММСК γ -В-1 и HSP70 увеличивает количество ММСК, оставшихся на стекле после культивирования (рис. 4в, 4е), т.е. улучшает адгезивные свойства ММСК.

Наши результаты согласуются с данными других авторов, что многофункциональный белок γ -В-1 способен влиять на клеточную адгезию путем модулирования экспрессии соответствующих генов. Показано, что сверхэкспрессия γ -В-1 может увеличивать адгезию клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы к фибронектину [29]. Нокдаун γ -В-1 влияет на молекулы клеточной адгезии (САМ) путем регуляции экспрессии гена ITGB8, связанного с САМ, значительно ингибирует клеточную адгезию клеток почечно-

клеточной карциномы *in vitro* [32]. Важно отметить, что ММСК тоже экспрессируют САМ [33], в частности ICAM-1, который необходим им для хоуминга в область повреждения, его сверхэкспрессия повышает эффективность целевой доставки и, соответственно, клеточной терапии [34]. Подобные данные получены и в отношении белка HSP70, способного модулировать клеточную адгезию. Так, было показано, что экзогенный HSP70 вызывает избыточную экспрессию молекул адгезии в мононуклеарных клетках периферической крови [30]. Можно предположить, что в наших условиях оба белка увеличивали адгезионные свойства ММСК. На метаболическую активность ММСК, их морфологию и гибель влияли изменение культуральной среды и паракринные факторы, выделяемые трансгенной культурой клеток. Эти результаты могут расширить стандартные подходы тканевой инженерии для решения проблем восстановления и регенерации тканей и могут быть применены для усиления адгезии ММСК при работе с композитными матрицами и в трансплантологии.

Прямое культивирование. В этом случае ММСК вносились непосредственно в первичную нейрональную культуру. Использование многопозиционной динамической съемки культур как в светлом поле, так и с использованием флуоресцентных каналов прибора JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder дало возможность проводить анализ состояния культур, находящихся в CO_2 -инкубаторе, в процессе их роста. Длительное наблюдение позволило детально оценить характер взаимодействия ММСК с клетками первичной культуры гиппокампа в зависимости от возраста клеточной культуры. Через 2 недели культивирования с трансгенной культурой ММСК начинают дифференцировку в астроциты, иммунопозитивные к GFAP и к ядерному человеческому антигену. Мы наблюдали появление, наряду с астроцитами, промежуточных астронейрональных форм, одновременно иммунопозитивных и к MAP2, что происходит на фоне прогрессирующей гибели 28-дневной культуры клеток гиппокампа трансгенных мышей (рис. 5а). Ранее нами было показано, что на этом сроке культивирования культура, в отличие от молодой, характеризуется значительным снижением клеточной плотности на фоне повышения астроцитарного индекса за счет уменьшения количества нейронов и возрастания числа астроцитов [35]. Такое состояние культуры соответствует фазе астроглиоза и гибели нейронов под влиянием бета-амилоида, который на этом сроке активно продуцируется клетками гиппокампа в культуральную среду. По-видимому, на этом этапе развития нейродегенеративного процесса в культуре также продуцируются факторы, способствующие дифференцировке ММСК в астроциты. При этом стоит отметить, что анализ

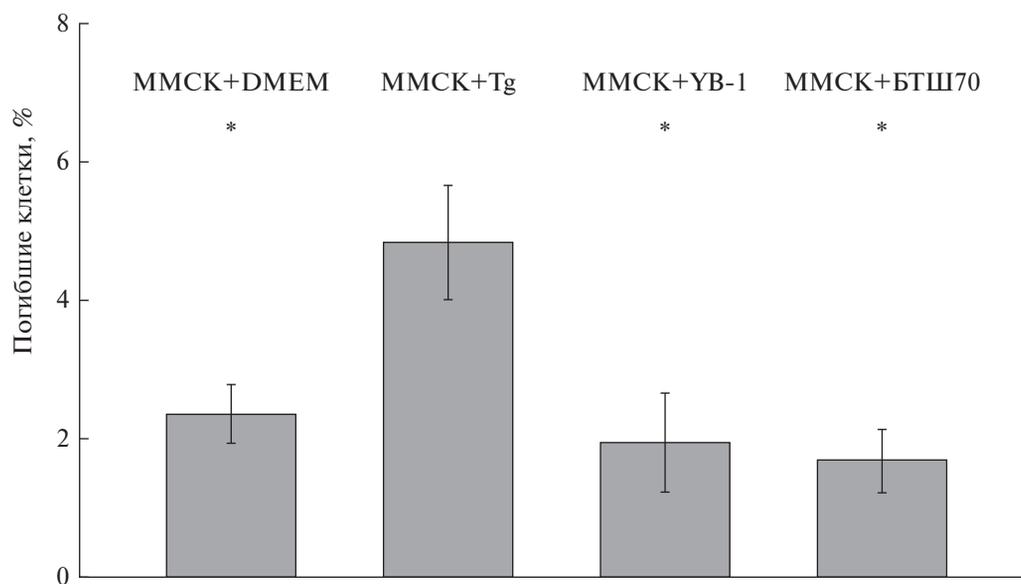
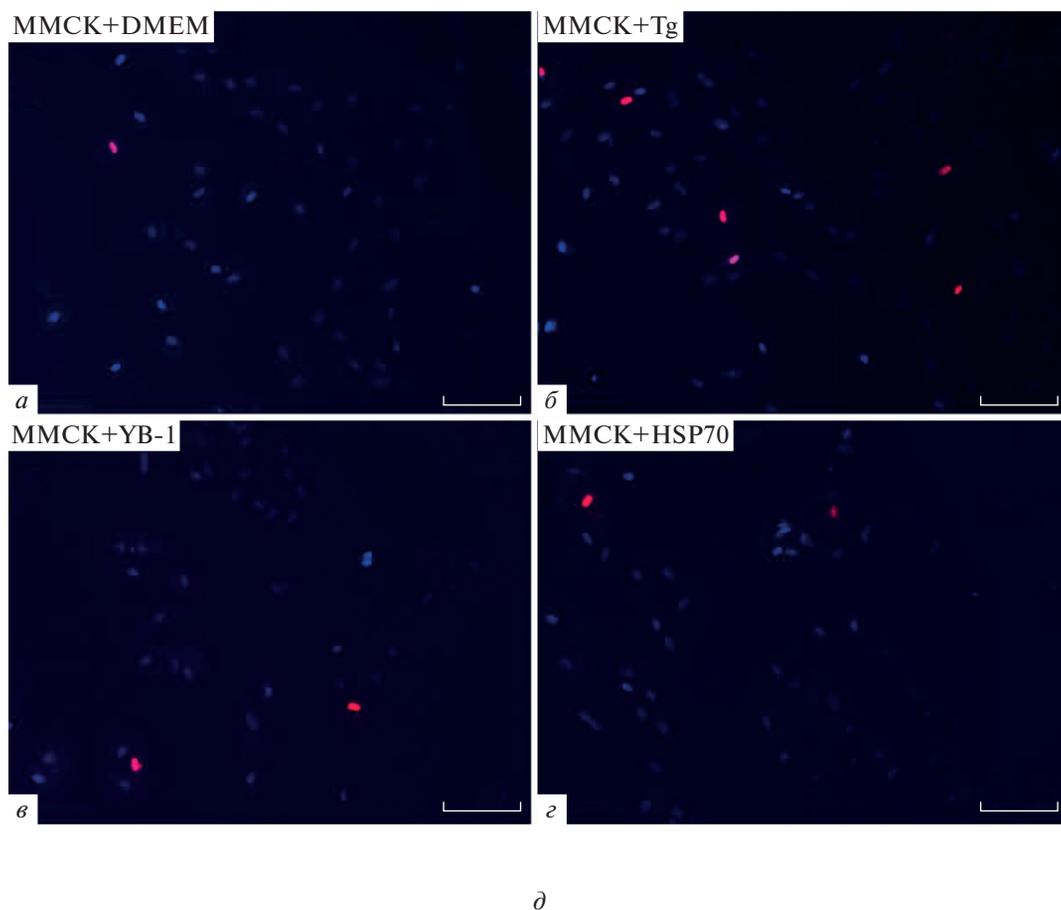


Рис. 3. Предварительная обработка MMCK стресс-белками HSP70 и YB-1 снижает интенсивность их гибели при не-прямом культивировании с трансгенной культурой.

a–г – Репрезентативные изображения с окрашиванием Hoechst 33342/PI. Шкала 60 мкм.

д – Отличие от группы MMCK + Tg достоверно при $p < 0.05$ (тест Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

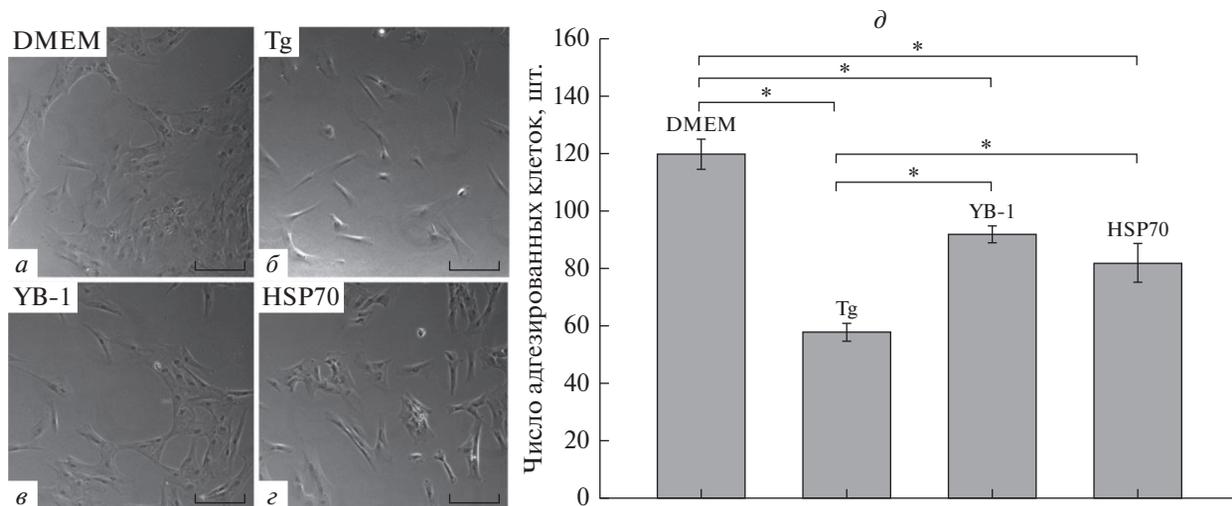


Рис. 4. Морфология и адгезированные ММСК. *a–г* – Репрезентативные изображения морфологии и клеточной плотности ММСК на стекле при непрямом культивировании в разных условиях. Шкала 60 мкм. *д* – Средняя плотность ММСК в поле зрения при культивировании в среде DMEM-F12, при непрямом культивировании с трансгенной культурой и при обработке ММСК YB-1 и HSP70 с последующим культивированием с трансгенной культурой. * Различия между указанными группами достоверны при $p < 0.05$.

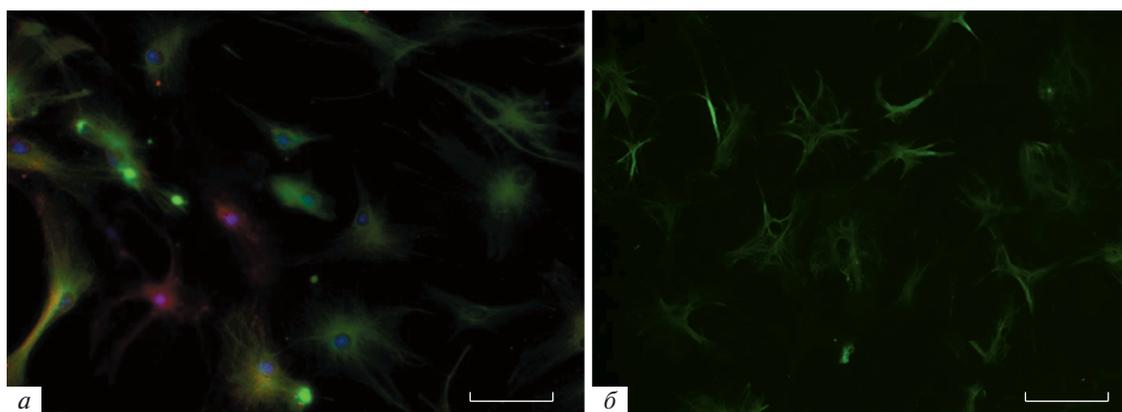


Рис. 5. Дифференцировка ММСК в астроциты в старой трансгенной культуре. *a* – Прямое культивирование со старой трансгенной культурой (микроскоп JuLI Stage Real-Time Cell History Recorder). *б* – Непрямое культивирование со старой трансгенной культурой (микроскоп Leica DMIL LED Fluo). Зеленый цвет соответствует иммунопозитивности к маркеру астроцитов GFAP, красным цветом обозначена иммунопозитивность к MAP2, синим цветом – иммунопозитивность к маркеру на ядерный человеческий антиген Anti-Human Nuclear. Шкала 60 мкм.

продолжительного непрямого культивирования ММСК со старой нейрональной культурой также показал дифференцировку ММСК в астроциты (рис. 5б). Таким образом, в старых культурах трансгенных мышей ММСК становятся астроцитами даже без прямого клеточного контакта, что, как мы полагаем, связано, в первую очередь, с изменением состава культуральной среды под действием жизнедеятельности клеток гиппокампа трансгенных мышей.

Дополнительно мы провели длительный эксперимент, при котором ММСК более месяца находились в культуре клеток гиппокампа. Было

показано, что ММСК используют мышиную нейроглиальную культуру как своеобразную подложку для своей дальнейшей жизнедеятельности и через месяц почти все ММСК становятся иммунопозитивными к MAP2, в отдельных случаях они имеют форму классических нейронов (рис. 6). Возможно, более продолжительное культивирование приведет к появлению в культуральной планшете новых нейронов и образованию нейрональной сети.

Интересно отметить, что в молодой трансгенной культуре ММСК оставались недифференцированными (рис. 7а–7в) и способствовали обра-

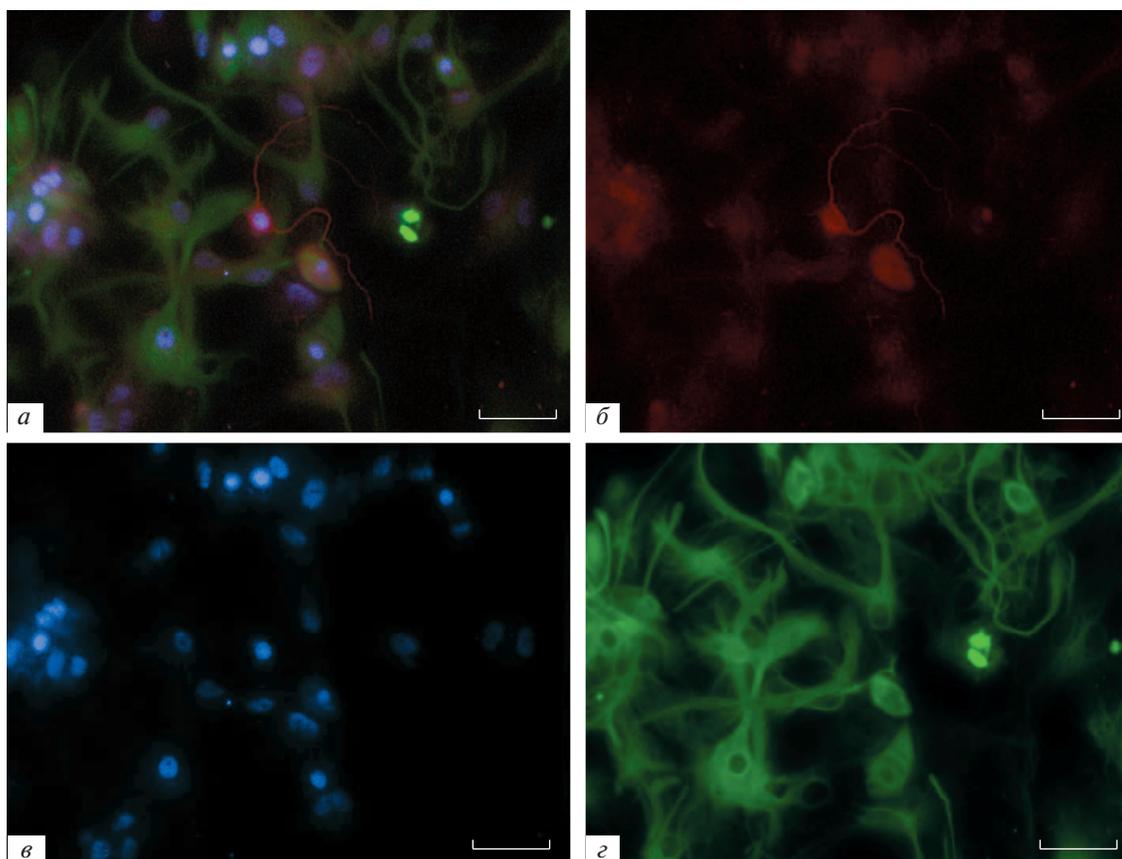


Рис. 6. Дифференцировка ММСК в нейроны в старой трансгенной культуре при длительном, более месяца прямом культивировании. Шкала 60 мкм.

a – Изображение с трех флуоресцентных каналов, *б* – иммунопозитивность к маркеру нейронов MAP2, *в* – иммунопозитивность к маркеру на ядерный человеческий антиген Anti-Human Nuclear, *г* – иммунопозитивность к маркеру астроцитов GFAP.

зованию нейросфер из клеток гиппокампальной культуры (рис. 7*a–7в*, 8*a*). Стоит отметить, что в культуральном планшете практически не остается свободной мозаичной культуры, и все клетки первичной культуры гиппокампа оказываются собранными в плотные нейросферы. На рис. 8 более подробно представлена морфология такой нейросферы.

Обработка ММСК белком УВ-1 также препятствует дифференцировке ММСК в астроциты в старой трансгенной культуре (рис. 7*г–7е*) и приводит к тому, что они сохраняют способность формировать небольшие нейросферы из клеток культуры (рис. 9*и–9м*). Обработка ММСК белком УВ-1 путем добавления его в среду культивирования ММСК усиливает их эффект на формирование нейросфер как в молодой, так и старой культурах трансгенных мышей (рис. 9*д–9з*, рис. 9*и–9м*). В случае предварительной обработки ММСК белком УВ-1 наблюдалось формирование более крупных нейросфер, которые мы склонны рассматривать как зрелые нейросферы. Полученные результаты в целом соответствуют представлению

о УВ-1 как о факторе, усиливающем пролиферацию и способствующем активному развитию культуры.

По-видимому, в определенных условиях ММСК могут вести себя подобно нервным прогениторным клеткам – клеточным штаммам мультипотентных клеток, генерирующим все типы клеток, необходимые для центральной нервной системы, за исключением микроглии. У млекопитающих поддержание пула взрослых нервных прогениторных клеток происходит в субвентрикулярной зоне, граничащей с боковыми желудочками, откуда клетки в основном мигрируют в обонятельную луковицу, а также в субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа. Клетки, выделенные из этих нейрогенных зон и помещенные в культуральные флаконы, образуют подобные нейросферы, что указывает на их нейрогенный потенциал. Нейросферы представляются многими исследователями как *in vitro*-модель эмбрионального нейрогенеза. При этом в нейросферах происходят сложные процессы, обусловленные как зрелостью сфероформирующих клеток, так и меж-

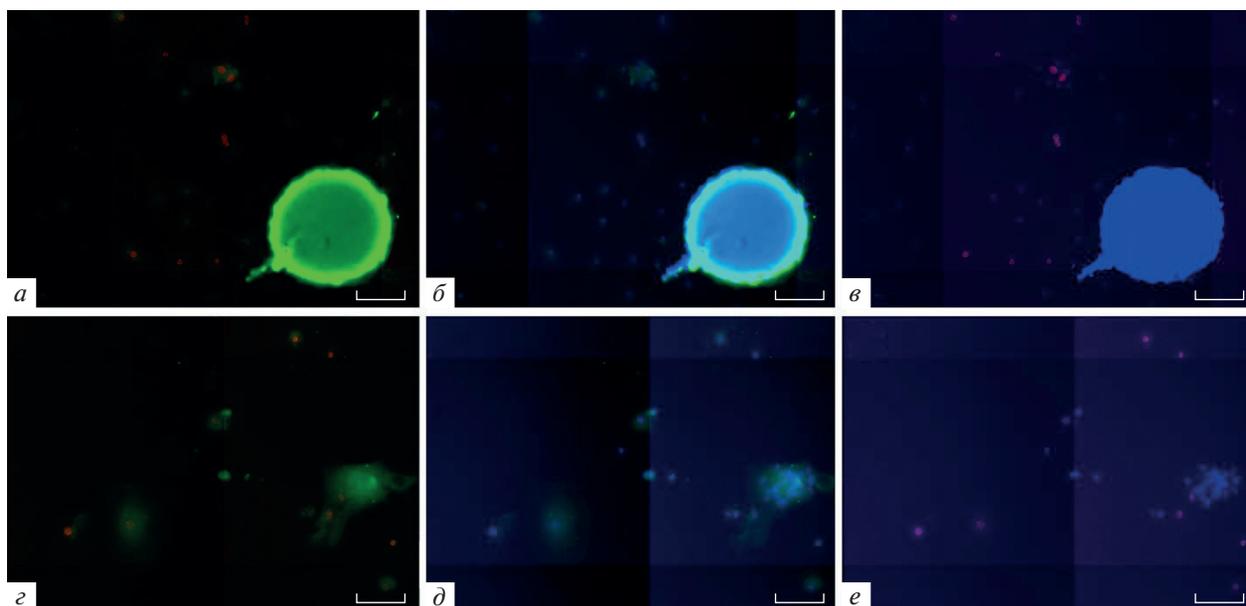


Рис. 7. ММСК остаются недифференцированными в молодой трансгенной культуре, а также в старой трансгенной культуре под действием УВ-1. *a–в* – ММСК не дифференцируются в астроциты в молодой трансгенной культуре, *г–е* – ММСК не дифференцируются в астроциты в старой трансгенной культуре под влиянием УВ-1. Зеленый цвет соответствует иммунопозитивности к маркеру астроцитов GFAP, красным цветом обозначена иммунопозитивность к маркеру на ядерный человеческий антиген Anti-Human Nuclear, синим цветом отмечены ядра, окрашенные Hoechst 33342. Шкала 60 мкм.

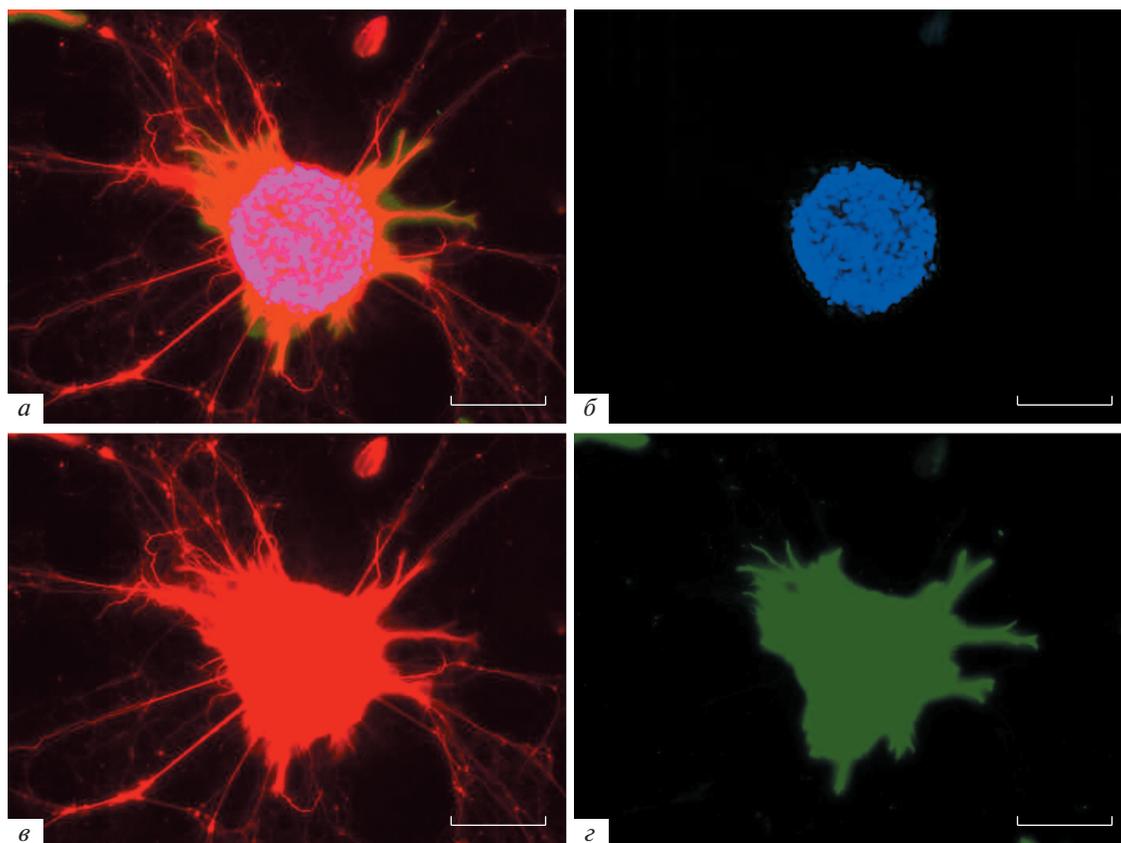


Рис. 8. Организация нейросфер в молодой трансгенной культуре под влиянием ММСК + УВ-1. Шкала 60 мкм. *a* – Суммарное изображение с трех флуоресцентных каналов, *б* – клеточные ядра, окрашенные Hoechst 33342, *в* – иммунопозитивность к маркеру нейронов MAP2, *г* – иммунопозитивность к маркеру астроцитов GFAP.

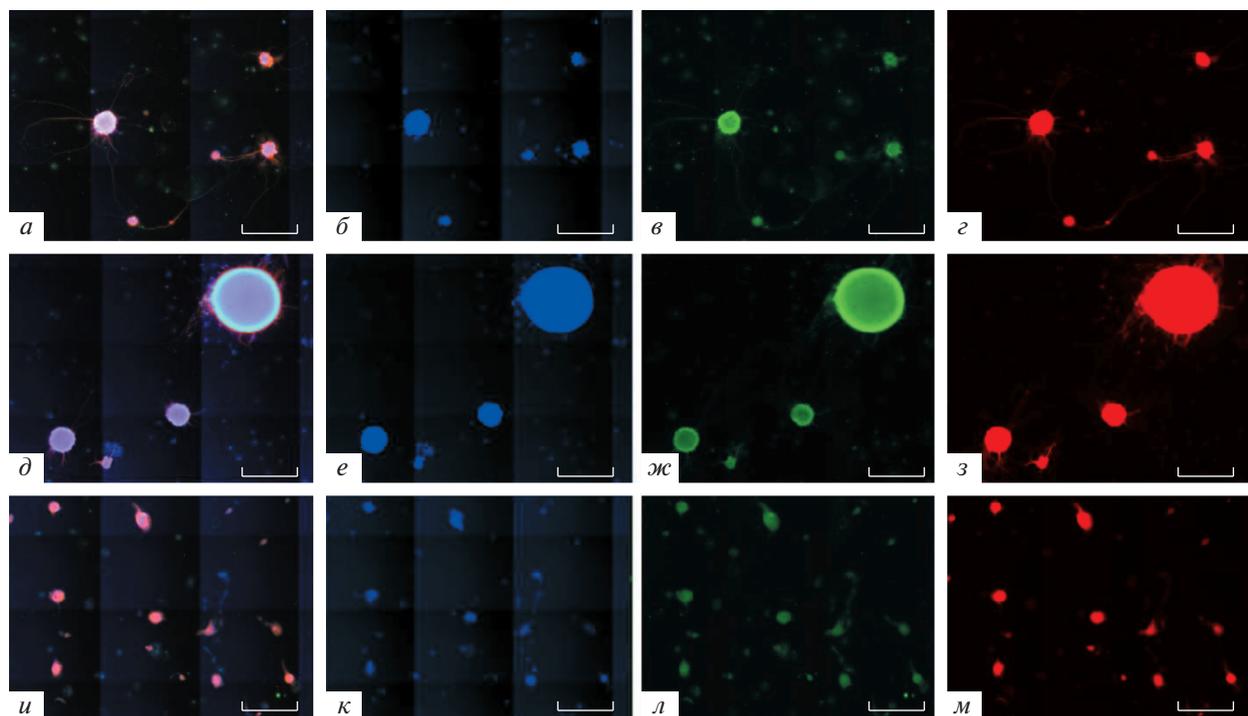


Рис. 9. Организация нейросфер в молодой трансгенной культуре под влиянием ММСК и ММСК + YB-1 (суммарное изображение с трех флуоресцентных каналов). *a–г* – Образование нейросфер в молодой трансгенной культуре под действием ММСК. *д–з* – Образование нейросфер в молодой трансгенной культуре под действием ММСК + YB-1. *и–м* – Образование нейросфер в старой трансгенной культуре под действием ММСК + YB-1. Зеленый цвет соответствует иммунопозитивности к маркеру астроцитов GFAP, красным цветом обозначена иммунопозитивность к MAP2, синим цветом отмечены ядра, окрашенные Hoechst 33342. Шкала – 250 мкм.

клеточными взаимодействиями и влиянием микроокружения, что приводит к обновлению пула прогениторных клеток, продуцируемых нейросферами, их коммитированию и дальнейшей пролиферации [36].

В условиях среды DMEM-F12 ММСК не свойственно образование нейросфер. Стоит отметить, что в наших условиях ММСК также не входили в состав нейросфер, однако с помощью специфических тонких отростков (тяжей), стягивающих разрозненные клетки мозаичной трансгенной культуры, они способствовали формированию нейросфер. Полученные при реализации протокола нейросферы представляют интерес в качестве потенциальной модели для исследования созревания, коммитирования, пролиферации и дифференцировки клеточных колоний.

Известно, что ММСК может реализовать несколько способов связи с клетками. В ходе экспериментов мы наблюдали, что уже через 3 ч ММСК формируют “тяжи”, контактирующие с клетками гиппокампа трансгенных мышей (рис. 10*в*). Это могут быть туннелеобразующие трубки, способные обеспечивать передачу частей цитоплазматической мембраны, компонентов цитоплазмы, а также везикул и органелл, включая целые мито-

хондрии [37]. Другим способом прямой коммуникации клеток могут быть щелевые контакты. Мы наблюдали, что вокруг ММСК, предварительно насыщенных кальцеином, присутствуют клетки культуры со слабым флуоресцентным сигналом (рис. 10*б*). Статистическая оценка интенсивности зеленой флуоресценции от ММСК и мест в культуре на разном удалении от ММСК показала достоверное увеличение интенсивности флуоресценции вокруг клеток, контактирующих с ММСК (рис. 10*г*). В лунках планшета, в которые вместе с ММСК в культуру добавляли блокатор щелевых контактов карбенексолон, перераспределение интенсивности флуоресценции кальцеина не наблюдали, что подтверждает участие щелевых контактов во взаимодействии ММСК с клетками культуры гиппокампа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ММСК являются перспективными агентами для лечения нейродегенеративных заболеваний, хотя механизм действия трансплантированных в мозг клеток остается не до конца выясненным. В данном исследовании проведен детальный анализ состояния человеческих ММСК, введенных в

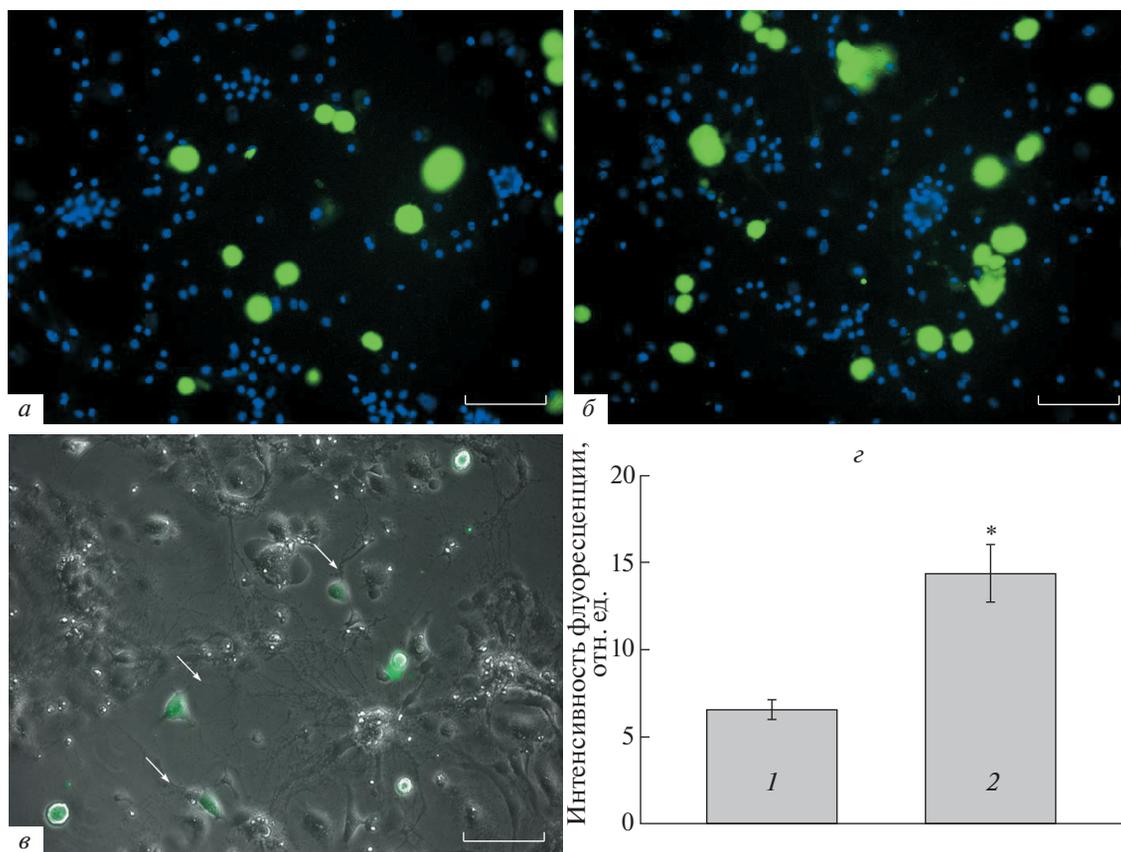


Рис. 10. Щелевые каналы и туннельные нанотрубки, образуемые ММСК. Шкала 60 мкм.
a – Отсутствие перераспределения зеленой флуоресценции от ММСК к клеткам культуры гиппокампа мыши (синяя флуоресценция принадлежит ядрам, окрашенным Hoechst 33342) в присутствии блокатора щелевых каналов.
б – Заметное перераспределение зеленого красителя от ММСК к клеткам культуры.
в – Формирование туннельных нанотрубок (показаны стрелочками) клетками ММСК (зеленая флуоресценция).
г – Интенсивность зеленой флуоресценции кальцеина вокруг клеток культуры, контактирующих с ММСК: 1 – культивирование при добавленном блокаторе щелевых каналов; 2 – культивирование без блокатора. * Различие между группами 1 и 2 достоверно при $p < 0.001$.

культуру клеток гиппокампа трансгенных животных, характеризующихся развитием нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа. Такая химерная клеточная модель позволила в эксперименте близко воспроизвести условия клинического использования этих клеток, а также исследовать особенности клеточных взаимодействий при прямом и непрямом клеточном контакте. Наши эксперименты показывали, что способы культивирования влияют как на интенсивность и направленность дифференцировки самих ММСК (дифференцировка их в астроциты и нейроны в старых трансгенных культурах и отсутствие дифференцировки в молодых культурах), так и на морфофункциональные характеристики и выживаемость культуры клеток реципиента (образование нейросфер из клеток молодой культуры трансгенных животных под действием организующей роли ММСК). Полученные результаты расширили понимание взаимодействий ММСК в химерной культуре, что в дальнейшем

позволит усовершенствовать подбор условий для клеточной терапии патологических процессов в мозге больных БА и других нейродегенеративных заболеваний.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФ (Проект № 18-15-00392).

Соответствие принципам этики. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей, выполненных кем-либо из авторов. Получение ММСК проводили имеющие специальное разрешение для подобного вида работ сотрудники ФГБУ “Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения РФ в рамках заключенного с этой организацией Договора. Исследование проведено в строгом соответствии с

“Правилами проведения исследований с экспериментальными животными” (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Все процедуры на мышах были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (Институт биофизических исследований РАН, разрешение № 3 от 12 июня 2020 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sivandzade F., Cucullo L. 2021. Regenerative stem cell therapy for neurodegenerative diseases: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (4), e2153.
- Carp D.M., Liang Y. 2022. Universal or personalized mesenchymal stem cell therapies: Impact of age, sex, and biological source. *Cells.* **11** (13), e2077.
- Goncalves K., Przyborski S. 2018. The utility of stem cells for neural regeneration. *Brain Neurosci. Adv.* **2** (2), e239821281881807
- Behrstock S., Ebert A.D., Klein S., Schmitt M., Moore J.M., Svendsen C.N. 2008. Lesion-induced increase in survival and migration of human neural progenitor cells releasing GDNF. *Cell Transplant.* **17** (7), 753–762.
- Blurton-Jones M., Kitazawa M., Martinez-Coria H., Castello N.A., Müller F.J., Loring J.F., Yamasaki T.R., Poon W.W., Green K.N., LaFerla F.M. 2009. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106** (32), 13594–13599.
- Chaplygina A.V., Zhdanova D.Y., Kovalev V.I., Poltavtseva R.A., Medvinskaya N.I., Bobkova N.V. 2022. Cell therapy as a way to correct impaired neurogenesis in the adult brain in a model of Alzheimer’s disease. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **58** (1), 117–137.
- Kim S., Chang K.A., Kim J.A., Park H.G., Ra J.C., Kim H.S., Suh Y.H. 2012. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived stem cells in Alzheimer’s disease mice. *PLoS One.* **7** (9), e45757.
- Bruno S., Kholia S., Deregibus M.C., Camussi G. 2019. The role of extracellular vesicles as paracrine effectors in stem cell-based therapies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1201**, 175–193.
- Yin K., Wang S., Zhao R.C. 2019. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: A new therapeutic paradigm. *Biomark. Res.* **7**, 8.
- Joyce N., Annett G., Wirthlin L., Olson S., Bauer G., Nolte J.A. 2010. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med.* **5** (6), 933–946.
- Xin D., Li T., Chu X., Ke H., Liu D., Wang Z. 2021. MSCs-extracellular vesicles attenuated neuroinflammation, synapse damage and microglial phagocytosis after hypoxia-ischemia injury by preventing osteopontin expression. *Pharmacol. Res.* **164**, e105322.
- Nair S., Rocha-Ferreira E., Fleiss B., Nijboer C.H., Gressens P, Mallard C, Hagberg H. 2021. Neuroprotection offered by mesenchymal stem cells in perinatal brain injury: Role of mitochondria, inflammation, and reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **158** (1), 59–73.
- Kim D.H., Lee D., Lim H., Choi S.J., Oh W., Yang Y.S., Chang J.H., Jeon H.B. 2018. Effect of growth differentiation factor-15 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on amyloid beta levels in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer’s disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **504** (4), 933–940.
- Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. 2016. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* **7** (1), 125.
- Ramkisoensing A.A., Pijnappels D.A., Swildens J., Goumans M.J., Fibbe W.E., Schalij M.J., de Vries A.A.F., Atsma D.E. 2012. Gap junctional coupling with cardiomyocytes is necessary but not sufficient for cardiomyogenic differentiation of cocultured human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* **30** (6), 1236–1245.
- Matuskova M., Hlubinova K., Pastorakova A., Hunakova L., Altanerova V., Altaner C., Kucerova L. 2010. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* **290** (1), 58–67.
- Kikuchi-Taura A., Okinaka Y., Saino O., Takeuchi Y., Ogawa Y., Kimura T., Gul S., Claussen C., Boltze J., Taguchi A. 2021. Gap junction-mediated cell-cell interaction between transplanted mesenchymal stem cells and vascular endothelium in stroke. *Stem Cells.* **39** (7), 904–912.
- Bobkova N.V., Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Sukhikh G.T. 2013. Therapeutic effect of mesenchymal multipotent stromal cells on memory in animals with Alzheimer-type neurodegeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* **156** (1), 119–121.
- Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Bobkova N.V., Alexandrova M.A., Sukhikh G.T. 2020. Effect of transplantation of neural stem and progenitor cells on memory in animals with Alzheimer’s type neurodegeneration. *Bull. Exp. Biol. Med.* **168** (4), 589–596.
- Skok M. 2021. Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool to cure cognitive impairment caused by neuroinflammation. *World J. Stem Cells.* **13** (8), 1072–1083.
- Yun H.M., Kim H.S., Park K.R., Shin J.M., Kang A.R., il Lee K., Song S., Kim Y.B., Han S.B., Chung H.M., Hong J.T. 2013. Placenta-derived mesenchymal stem cells improve memory dysfunction in an A β 1–42-infused mouse model of Alzheimer’s disease. *Cell Death Dis.* **4** (12), e958.
- Bagheri-Mohammadi S. 2021. Microglia in Alzheimer’s disease: The role of stem cell-microglia interaction in brain homeostasis. *Neurochem. Res.* **46** (2), 141–148.
- Qin C., Lu Y., Wang K., Bai L., Shi G., Huang Y., Li Y. 2020. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells improves cognitive deficits and alleviates

- neuropathology in animal models of Alzheimer's disease: A meta-analytic review on potential mechanisms. *Transl. Neurodegener.* **9** (1), 20.
24. Yang H., Xie Z., Wei L., Yang H., Yang S., Zhu Z., Wang P., Zhao C., Bi J. 2013. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an A β PP/PS1 transgenic mouse model. *Stem Cell Res. Ther.* **4** (4), 76.
 25. Hernández A.E., García E. 2021. Mesenchymal stem cell therapy for Alzheimer's disease. *Stem Cells Int.* **2021**, e7834421.
 26. de Godoy M.A., Saraiva L.M., de Carvalho L.R.P., Vasconcelos-Dos-Santos A., Beiral H.J.V., Ramos A.B., Silva L.R.P., Leal R.B., Monteiro V.H.S., Braga C.V., de Araujo-Silva C.A., Sinis L.C., Bodart-Santos V., Kasai-Brunswick T.H., Alcantara C.L., Lima A.P.C.A., da Cunha-E Silva N.L., Galina A., Vieyra A., De Felice F.G., Mendez-Otero R., Ferreira S.T. 2018. Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *J. Biol. Chem.* **293** (6), 1957–1975.
 27. Bobkova N.V., Lyabin D.N., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N., Nekrasov P.V., Nesterova I.V., Aleksandrova I.Y., Tatarnikova O.G., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Kukharsky M.S., Ustyugov A.A., Polyakov D.N., Eliseeva I.A., Kretov D.A., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P. 2015. The Y-box binding protein 1 suppresses Alzheimer's disease progression in two animal models. *PLoS One.* **10** (9), e0138867.
 28. Evgenov M., Bobkova N., Krasnov G., Garbuz D., Funikov S., Kudryavtseva A., Kulikov A., Samokhin A., Maltsev A., Nesterova I. 2019. The effect of human HSP70 administration on a mouse model of Alzheimer's disease strongly depends on transgenicity and Age. *J. Alzheimer's Dis.* **67**, 1391–1404.
 29. Miao X., Wu Y., Wang Y., Zhu X., Yin H., He Y., Li C., Liu Y., Lu X., Chen Y., Shen R., Xu X., He S. 2016. Y-box-binding protein-1 (YB-1) promotes cell proliferation, adhesion and drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Exp. Cell Res.* **346** (2), 157–166.
 30. Xie F., Zhan R., Yan L.-C., Gong J.-B., Zhao Y., Ma J., Qian L.-J. 2016. Diet-induced elevation of circulating HSP70 may trigger cell adhesion and promote the development of atherosclerosis in rats. *Cell Stress Chaperones.* **21** (5), 907–914.
 31. Galipeau J., Krampera M., Barrett J., Dazzi F., Deans R.J., DeBrujin J., Dominici M., Fibbe W.E., Gee A.P., Gimble J.M., Hematti P., Koh M.B., LeBlanc K., Martin I., McNiece I.K., Mendicino M., Oh S., Ortiz L., Phinney D.G., Planat V., Shi Y., Stroncek D.F., Viswanathan S., Weiss D.J., Sensebe L. 2016. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy.* **18** (2), 151–159.
 32. Wang Y., Su J., Fu D., Wang Y., Chen Y., Chen R., Qin G., Zuo J., Yue D. 2018. The role of YB1 in renal cell carcinoma cell adhesion. *Int. J. Med. Sci.* **15**, 1304–1311.
 33. Kollar K., Cook M.M., Atkinson K., Brooke G. 2009. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. *Int. J. Cell Biol.* **2009**, e904682.
 34. Tang B., Li X., Liu Y., Chen X., Li X., Chu Y., Zhu H., Liu W., Xu F., Zhou F., Zhang Y. 2018. The therapeutic effect of ICAM-1-overexpressing mesenchymal stem cells on acute Graft-Versus-Host disease. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **46** (6), 2624–2635.
 35. Tatarnikova O.G., Orlov M.A., Bobkova N.V. 2015. Beta-amyloid and tau-protein: structure, interaction, and prion-like properties. *Biochemistry. (Mosc).* **80** (13), 1800–1819.
 36. Sukach A.N., Ivanov E.N. 2007. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Cell tissue biol.* **1** (6), 476–481.
 37. Onfelt B., Nedvetzki S., Benninger R.K., Purbhoo M.A., Sowinski S., Hume A.N., Seabra M.C., Neil M.A., French P.M., Davis D.M. 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J. Immunol.* **177** (12), 8476–8483.

Interaction of Mesenchymal Stromal Cells with Primary 5XFAD Mice Hippocampus Culture Depending on Cocultivation Method

A. V. Chaplygina^{1,*}, D. Y. Zhdanova¹, V. I. Kovalev¹, R. A. Poltavtseva², N. V. Bobkova¹

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

²National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117198 Russia

*e-mail: shadowhao@yandex.ru

In this work we studied the mutual influence of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) isolated from Wharton's jelly of human umbilical cord and primary culture of hippocampal cells obtained from transgenic mice 5XFAD, used as an animal model of inherited form of Alzheimer's disease (AD). Experimental protocols included both direct and indirect co-cultivation of MMSCs with hippocampal cells from transgenic animals. It was shown that in the conditions of indirect co-culture, the aggressive environment of cultured transgenic cells significantly decreases the survival rate and adhesiveness of MMSCs. However,

preliminary priming of MMSCs with proteins YB-1 and HSP70 improved the survival and adhesive properties of MMSCs. It was also found that the interactions of MMSCs with cultured hippocampal cells depend on cell culture age. Old cultures of transgenic cells induced differentiation of MMSC into astrocytes, both during direct and indirect co-cultivation. In contrast, in young cultures of transgenic cells, during contact co-cultivation, MMSCs played the role of specific strands that promoted clustering of hippocampal cells in the culture and the formation of neurospheres. The interaction between MMSCs and neural cells occurred through gap junctions and nanotubes. Our findings expand the understanding of interactions between MMSCs and recipient cells, which allows us to revise the conditions of cellular transplantation therapy for pathological processes in the brain of AD patients.

Keywords: transgenic mice 5XFAD, mesenchymal stromal cells, primary neuronal culture, hippocampal cell culture, cell therapy