



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 57.085.23:616.832-089-091.8

В.Б. Огай<sup>1</sup>, Ш.Е. Байдосова<sup>1</sup>, Е.А. Лу<sup>1</sup>, Т.Т. Керимбаев<sup>2</sup> (д.м.н.), В.Г. Алейников<sup>2</sup>,  
Н.Т. Алдиярова<sup>2</sup> (д.м.н.), С.К. Акишулаков<sup>2</sup> (д.м.н.)

<sup>1</sup> РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Астана, Казахстан

<sup>2</sup> АО «Национальный центр нейрохирургии» МЗ РК, Астана, Казахстан

### ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА BDNF И ХОНДРОИТИНАЗЫ ABC НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ КРЫС ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СПИННОГО МОЗГА

Целью исследования являлось изучение влияния нейротрофического фактора BDNF и хондроитиназы ABC на функциональную активность двигательных нейронов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) крыс. Функциональную активность двигательных нейронов и МСК крыс изучали с помощью пролиферативного, морфологического и иммуноцитохимического анализа. Результаты исследования показали, что BDNF повышает пролиферативную активность как МСК, так и двигательных нейронов. При этом, был обнаружен дозозависимый эффект BDNF на пролиферацию этих клеток. Более того, было показано, что BDNF способен индуцировать дифференцировку МСК в нейрональном направлении. В случае хондроитиназы ABC, то ее добавление к МСК не оказывало никакого эффекта на пролиферативную активность. Напротив, культивирование двигательных нейронов с хондроитиназой ABC приводило к повышению пролиферации этих клеток. При этом, эффект был дозозависимым, начиная от 2 до 10 Ед./мл.

Таким образом, полученные данные показали, что BDNF и хондроитиназа ABC оказывают стимулирующий эффект на функциональную активность двигательных нейронов спинного мозга и МСК.

**Ключевые слова:** BDNF, хондроитиназа ABC, мезенхимальные стволовые клетки, двигательные нейроны

#### Введение

Повреждение спинного мозга (ПСМ) является одной из самых разрушительных травм и может приводить к серьезному сенсорному и моторному дефициту со многими тяжелыми осложнениями [1]. В настоящее время лекарственная терапия, рекомендуемая для лечения травматических повреждений спинного мозга, используется с заметным, но, к сожалению, ограниченным успехом [2]. Одним из основных препятствий для восстановления функции спинного мозга является его низкая способность к регенерации. Кроме того, при острой травме взрослые аксоны не вырастают так же быстро, как молодые, хронически поврежденные аксоны еще более склонны к нарушению регенерации, им нужна дополнительная стимуляция с помощью экзогенных нейротрофических факторов, такой как BDNF (нейротрофический фактор головного мозга). Было доказано, что BDNF играет важную роль в развитии и функционировании центральной нервной системы (ЦНС) и имеет существенное значение в развитии ее различных патологических состояний. Ряд исследований показали, что BDNF обладает выраженными нейрозащитными свойствами, подавляет клеточный апоптоз, препятствует гибели нейронов и стимулирует рост нервных волокон при ишемических повреждениях и травмах ЦНС [3-7].

Еще одним препятствием для успешной регенерации является глиальный рубец, который образуется сразу вокруг поражения спинного мозга. Реактивные астроциты, фибробласты, стволовые клетки в пределах рубца быстро активируют секрецию ингибирующих молекул, в том числе нескольких хондроитин сульфат протеогликанов (CSPG), которые, возможно, играют ключевую роль в низкой регенеративной способности поврежденных нервных клеток. CSPG - бактериальный фермент хондроитиназы ABC, который расщепляет ингибирующий фрагмент сахара из сердцевины белка CSPG, приводил к улучшению повторного роста остро поврежденных аксонов в естественных условиях и вызывал некоторое функциональное восстановление [8]. Некоторые авторы показали, что, если дальний интерфейс периферического нерва обрабатывать хондроитиназой ABC, то значительно больше аксонов пересекают границу рубцовой ткани, чтобы повторно реиннервировать спинной мозг, что в результате может улучшить регенерацию при хронической травме спинного мозга.

В последнее время перспективной стратегией для лечения ПСМ является трансплантация стволовых клеток для замены погибших или поврежденных клеток, которые обеспечивают трофическую поддержку для восстановления поврежденных структур и утраченных функций спинного мозга [9, 10]. В частности, мезенхимальные стволовые клет-

ки (МСК), выделенные из костного мозга являются отличными кандидатами для клеточной терапии, поскольку они могут быть легко выделены и быстро размножены в условиях *in vitro*. Эти клетки мультипотентны и могут дифференцироваться в различные специализированные клетки, в том числе нейроны. Было показано, что МСК могут секретировать множество цитокинов и факторов роста, которые способствуют эндогенному росту нейронов, влиять на нейрогенез и ангиогенез, стимулировать синаптическую связь и ремиелинизацию поврежденных аксонов, ингибировать апоптоз, и регулировать воспаление через паракринные механизмы [11]. Ряд доклинических исследований показали, что трансплантация МСК экспериментальным животным с повреждением спинного мозга ускоряет восстановление аксонов и определенных функций [12]. Однако эта стратегия в настоящее время ограничивается плохой выживаемостью животных и неконтролируемостью дифференциации трансплантированных стволовых клеток.

Поэтому, в последние годы ученые все больше фокусируются на разработке комбинированных подходов лечения травм спинного мозга с использованием стволовых клеток, лекарственных препаратов, ферментов, нейротрофических факторов и различных биосовместимых гидрогелей. Так, например, в литературе существует ряд работ по разработке новых подходов с применением подсадки периферического нерва в хронический очаг ушиба спинного мозга с высокими концентрациями хондроитиназы ABC для удаления глиальных рубцов, и/или в комбинации с нейротрофическими факторами для стимулирования роста поврежденных аксонов [13-15]. Однако нет никаких данных о стратегиях регенеративного лечения травмы спинного мозга с использованием комбинированного применения хондроитиназы ABC, нейротрофического фактора BDNF и МСК.

В этой связи, для того чтобы проверить насколько будет эффективна данная комбинированная стратегия для восстановления травмы спинного мозга на модельных животных была поставлена первоначальная задача, заключающаяся в изучении эффектов нейротрофического фактора BDNF и хондроитиназы ABC на функциональную активность, как МСК, так и двигательных нейронов в условиях *in vitro*.

## Материалы и методы

### Животные

В данном исследовании использовали аутобредных крыс-самцов линии Вистар весом 250-300 гр., которые были приобретены из питомника лабораторных животных «Пушино» (Россия). Животные содержались в условиях вивария включающий 12 часовой цикл день/ночь, при температуре 22-23°C. Все эксперименты с животными проводились только после одобрения локального этического комитета.

### Выделение и культивирование МСК костного мозга крыс

Для выделения клеток костного мозга, животных выводили из эксперимента с помощью утаназии для эвтаназии, согласно инструкции производителя ООО «НПК Открытая Наука» (РФ). МСК выделяли из бедренных костей животных. Полученную клеточную суспензию профильтровали через 70 мкм клеточный фильтр (Beckton-Dickenson, USA), ресуспендировали в среде  $\alpha$ -MEM, подсчитывали в камере Нойбауэра количество клеток и культивировали в полной питательной среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Через 3 дня неприкрепленные к пластику клетки удаляли промыванием фосфатно-солевым буфером (ФСБ), а фракцию адгезивных клеток культивировали до покрытия клетками 80-90% площади культурального флакона. Пассирование клеток производили рекомбинантным трипсином TrypLE Express (Life Technologies, UK) с интервалом 6-7 дней.

### Выделение и культивирование двигательных нейронов спинного мозга крыс

Новорожденных однодневных крысят усыпляли методом эвтаназии с использованием CO<sub>2</sub>-камеры. Спинной мозг животных выделяли в стерильных условиях на льду под стереомикроскопом SZ61. Спинной позвонок от позвоночника отделяли с помощью пинцета. Ножницами полученный материал измельчали на мелкие кусочки 1 мм<sup>2</sup>. Затем кусочки спинного мозга были обработаны теплым 0,25% трипсином и инкубировались в течение 45 минут при 37°C, периодически перемешивая. На следующем этапе добавляли полную питательную среду DMEM/F12, содержащей 10% ЭТС, ростовую добавку B-27 и 2 mM L-глутамин, чтобы инактивировать действие трипсина. После этого супернатант с 6,7% метризамидом центрифугировали 3000 об/мин 15 минут. Осадок клеток ресуспендировали в среде для культивирования и осаждали при 1000 об/мин в течение 5 минут. В дальнейшем к осадку добавляли свежей полной питательной среды DMEM/F12 и инкубировали 30 минут для седиментации клеток. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре и разводили клетки до конечной концентрации 5×10<sup>4</sup> клеток/мл. Культуральный флакон для культивирования клеток предварительно обрабатывали поли-L-лизинном (0,1 мг/мл) отмывали дважды ФСБ и подсушивали. Культивирование клеток осуществляли при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. На второй день производили смену среды DMEM/F12 на нейробазальную среду (Life Technologies, USA) содержащей ростовую добавку B27, 2 mM L-глутамин, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг стрептомицина. Через 2 дня неприкрепленные к пластику клетки удаляли, а фракцию адгезивных клеток культивировали до покрытия клетками 80-90% площади культурального флакона. Пассирование клеток производи-



ли рекомбинатным трипсином (TrypLe Express, Life Technologies, USA) с интервалом 6-7 дней.

Тест на образование фибробластных колониеобразующих единиц

Клетки выделенные из костного мозга крыс рассеивали в культуральные флаконы T25 с расчетом 10 клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в полной питательной среде в течение 14 дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. По окончании срока культивирования, клетки промывали ФСБ и окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового в течение 5 мин при комнатной температуре. После двукратной отмывки ФСБ проводили подсчет образовавшихся колоний с использованием стереомикроскопа SZ61 (Olympus, Germany). Снимки получали с помощью CCD-камеры SC-100 (Olympus, Germany).

### Иммуноцитохимический анализ

Клетки рассеивали на 4-луночный слайд по 1 × 10<sup>5</sup> клеток на лунку и инкубировали в течение ночи в CO<sub>2</sub>-инкубаторе для образования монослоя. Затем, монослой клеток фиксировали свежеприготовленным раствором 4% параформальдегида в ФСБ (pH 7,2) в течение 20 мин. После пятиминутной обработки тритоном X-100 клетки отмывали три раза ФСБ и добавляли 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 30 мин. Далее клетки инкубировали с антителами против CD90, CD105, CD73, NeuN и MAP2. Для приготовления необходимой концентрации, антитела разводили в растворе, содержащем 1% БСА и 0,2% Tween 20 в фосфатном буфере. Первичные антитела разводили в следующем соотношении: мышинные моноклональные антитела против CD90 (1:200), CD105 (1:100), NeuN (1:100) и MAP2 (1:100) (Abcam, UK), кроличьи антитела против CD73 (1:200), (Abcam, UK). Инкубирование препаратов клеток в растворе антител проводили при 37°C в течение 1 часа. После трех пятиминутных отмывок в растворе 0,2% Tween 20 в фосфатном буфере к препаратам клеток наносили раствор козьих анти-кроличьих и анти-мышинных антител (1:500), конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, UK) и инкубировали 45 мин при 37°C в темноте. Клетки отмывали от раствора антител три раза по 5 мин. 0,2% раствором Tween 20. После высушивания, на слайд наносили по 20 мкл антивыгорающего раствора с красителем DAPI (Life Technologies, UK). Препараты анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Germany) и программного обеспечения Zen 2011.

### Дифференцировка в хондроциты, остеобласты и адипоциты

Для дифференцировки в хондроциты, клетки были ресуспендированы в дифференцировочной среде состоящей из среды ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы, 1% раствора инсулина-трансферина-селенита, 100 μМ аскорбат-2-фосфата, 10-7

М дексаметазона и 10 нг/мл TGF-β1 в концентрации 1,25 × 10<sup>6</sup> клеток/мл. Чтобы создать хондрогенные микрошарики, в каждую V-образную лунку 96 луночного полипропиленового планшета (Phenix, Hayward, CA), наносили по 2,5 × 10<sup>5</sup> клеток затем центрифугировали при 500 g, и переносили в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37°C, и 5% CO<sub>2</sub>. Смену среды проводили 3 раза в неделю. На 21-й день дифференцировки, образовавшиеся микрошарики были собраны и зафиксированы в 4% растворе параформальдегида (pH 7,2). Образцы были помещены в парафин, нарезаны на микротоме и обработаны для окрашивания гематоксилин-эозином или тоюдиновым синим.

Для остеогенной дифференцировки клеток использовали индукционную среду, содержащую 10-7 М дексаметазона, 10 мМ β-глицерол-фосфата и 50 мкМ аскорбат-2-фосфата. Культивирование проводили в течение 3 недель после чего, клетки окрашивали ализариновым красным S.

Дифференцировку в адипоциты проводили путем их культивирования в индукционной среде, содержащей 10-6 М дексаметазона 0,5 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина и 10 нг/мл инсулина в течение 3 недель. По окончании культивирования, клетки окрашивали красителем Oil Red O.

### Тест на пролиферацию

МСК и двигательные нейроны крысы рассеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning Costar, США) по 5×10<sup>3</sup> клеток на лунку и инкубировали 16 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для двигательных нейронов спинного мозга крысы лунки 96-луночного планшета предварительно были обработаны поли-L-лизинном. Затем удаляли среду из лунок с помощью аспиратора и заменяли ее на полную питательную среду с добавлением различных концентраций рекомбинантного BDNF и хондроитиназы ABC. В контрольные лунки добавляли просто полную питательную среду. После добавления к клеткам различных концентраций BDNF и хондроитиназы ABC, проводили инкубирование в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Пролиферацию клеток определяли окрашиванием при добавлении 10 мкл красителя Alamar Blue (Invitrogen, США) в течение 4 часов. Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм на спектрофотометре для планшетов (Biorad 670, Франция). Уровень пролиферации рассчитывали по формуле:

$$\text{ип (\%)} = \frac{\text{Оптическая плотность в экспериментальных лунках}}{\text{Оптическая плотность в контрольных лунках}} \times 100$$

### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в виде графиков с указанием величины среднего квадратичного отклонения.

## Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования были получены и охарактеризованы первичные культуры МСК костного мозга крыс, которые обладали высокой адгезивностью, способностью формировать фибробластоподобные колонии и мультилинейной дифференцировкой в адипоциты, хондроциты и остеобласты (рис. 1).

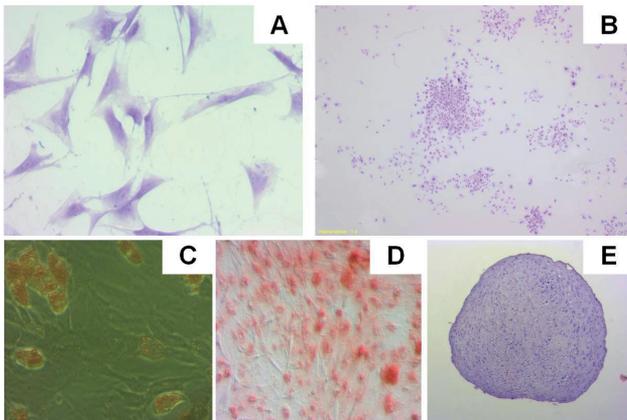


Рисунок 1 - Характеристики МСК костного мозга крысы. А – Морфология МСК крысы. Окрашивание кристаллическим фиолетовым. В - МСК способны быстро пролиферировать и образовывать колонии. С - Дифференцировка МСК в адипоциты. Видны крупные вакуоли окрашенные красителем Oil Red. D - Дифференцировка МСК в остеобласты. Видны отложения кальция в клетках в результате окрашивания ализариновым красным. Е - Дифференцировка МСК в хондроциты. МСК формируют хондрогенный микрошарик. Окрашивание гематоксилин-эозином

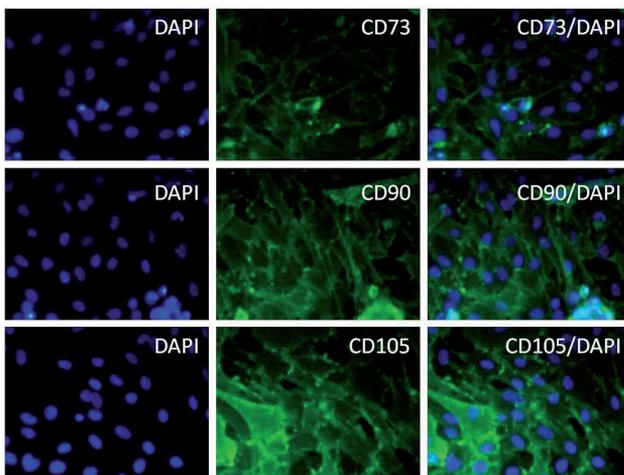


Рисунок 2 – Иммунофенотипирование МСК крысы

Более того, они экспрессировали характерные для этого типа клеток маркеры CD73, CD90 и CD105, что указывает на их мультипотентные свойства (рис. 2). Параллельно с получением МСК костного мозга

была получена первичная культура двигательных нейронов, которые были выделены из спинного мозга новорожденных крысят. Неонатальные нейроны спинного мозга обладают высоким пролиферативным потенциалом, и тем самым, служат в качестве клеток-мишеней при изучении действия определенных факторов биологической или химической природы.

В связи с этим, было проведено изучение влияния нейротрофического фактора головного мозга BDNF и хондроитиназы ABC на пролиферативную активность двигательных нейронов и МСК костного мозга крыс. В этом эксперименте использовались следующие концентрации BDNF (40, 80, 100 нг/мл) и хондроитиназы ABC (2, 5, 10, 50 Ед./мл). После добавления к клеткам различных концентраций BDNF и хондроитиназы ABC, проводили инкубирование в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В результате было обнаружено, что добавление рекомбинантного BDNF к МСК оказывало дозозависимый эффект на пролиферацию этих клеток (рис. 3).

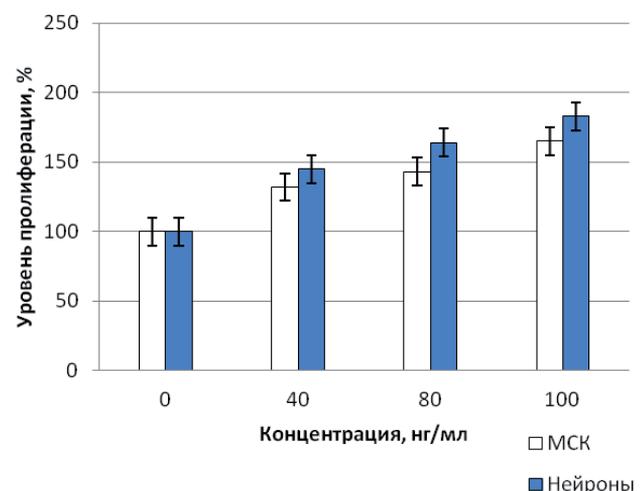


Рисунок 3 – Влияние рекомбинантного BDNF на пролиферацию МСК и двигательных нейронов крысы

Наибольшая пролиферативная активность наблюдалась при концентрации 100 нг/мл. Аналогичные результаты были получены и с двигательными нейронами спинного мозга крысы. Как видно на рисунке 3, культивирование двигательных нейронов с BDNF также приводило к повышению роста этих клеток. Наибольший эффект был обнаружен при добавлении 100 нг/мл рекомбинантного BDNF. Это также хорошо видно по высокой плотности культивируемых нейронов как это показано на рисунке 4.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что BDNF может использоваться для стимуляции роста поврежденных нейронов спинного мозга и ускорения регенерации за счет активации МСК, которые в свою очередь сами могут продуцировать данный нейротрофический фактор.

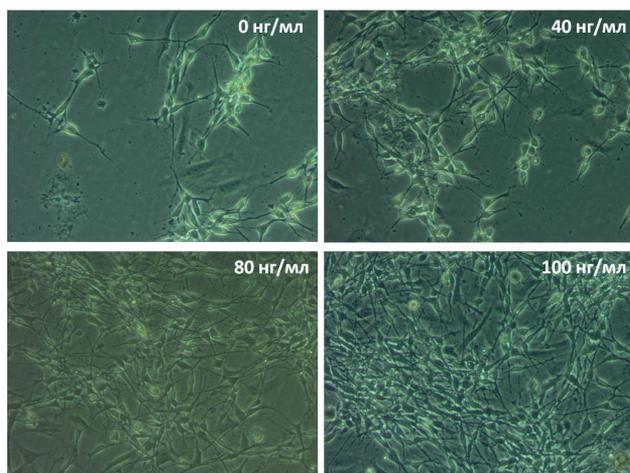


Рисунок 4 – Рост двигательных нейронов крысы после добавления различных концентраций рекомбинантного BDNF

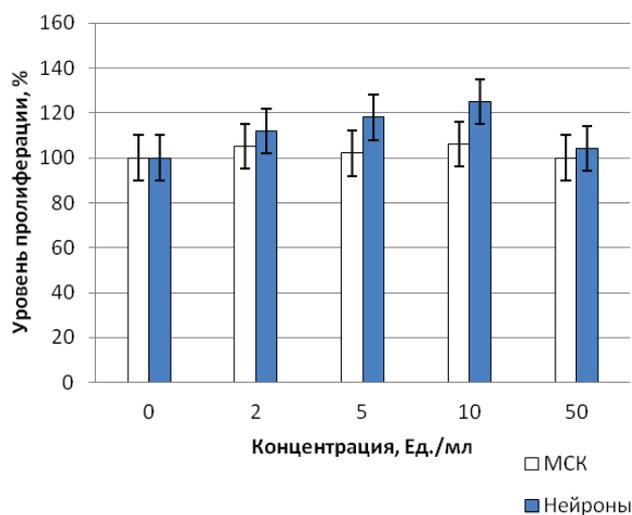


Рисунок 5 – Влияние хондроитиназы ABC на пролиферацию МСК и двигательных нейронов крысы

Параллельно, с изучением эффектов BDNF были проведены эксперименты по влиянию хондроитиназы ABC на пролиферацию МСК костного мозга и двигательные нейроны крысы. Результаты, представленные на рисунке 5 показывают, что хондроитиназа ABC не оказывает существенного эффекта на пролиферативную активность МСК костного мозга. Однако культивирование двигательных нейронов с хондроитиназой ABC приводило к повышению пролиферации этих клеток. При этом следует отметить, что эффект был дозозависимым, начиная от 2 до 10 Ед./мл. Напротив, обработка клеток более высокими дозами (50 Ед./мл) хондроитиназой ABC не вызывала существенных изменений в росте двигательных нейронов, по сравнению с контролем. Эти результаты согласуются с данными полученными ранее Gu и коллегами, которые показали, что обработка нейрональных прогениторных клеток различными дозами хондроитиназой ABC (0,05 до 5 Ед./мл) приводит к повышению пролиферации клеток [13]. При использовании высокой дозы хондроитиназы ABC (50 Ед./мл), достоверных

изменений в пролиферации нейрональных клеток обнаружено не было.

Следующей задачей нашей работы было изучить влияние рекомбинантного BDNF на нейрональную дифференцировку МСК крысы. Для изучения данного исследования МСК крысы рассеяли в 6-луночный культуральный планшет (1×10<sup>5</sup> на лунку) и культивировали в среде α-MEM с 15% ЭТС в течение 2 суток. За 24 часа до индукции поменяли среду на преддифференцировочную, состоящую из среды α-MEM, 15% ЭТС и 1мМ β-меркаптоэтанола. Через сутки клетки культивировали в среде DMEM/F12 содержащей 5мМ β-меркаптоэтанола и 100 нг/мл рекомбинантного BDNF. Через 3 суток после индукции клетки анализировались с помощью микроскопии и иммуноцитохимии. Результаты анализа представлены на рисунках 6 и 7. Было обнаружено, что добавление 100 нг/мл BDNF вызывает дифференцировку в нейрональном направлении. Это хорошо видно по изменению морфологии МСК, которые приобрели нейроно-подобную морфологию с характерными длинными отростками, как видно на рисунке 6.

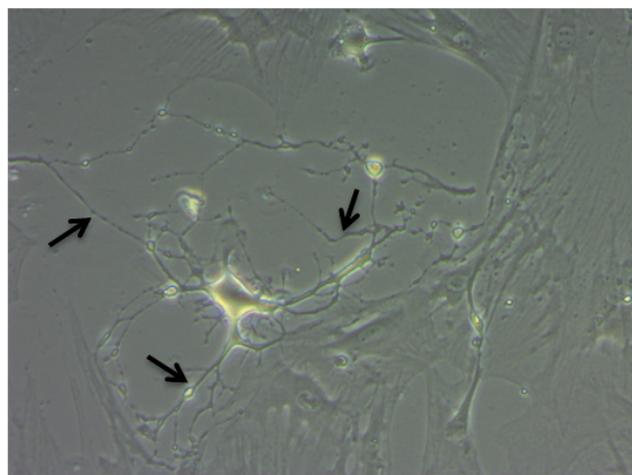


Рисунок 6 – Влияние BDNF на нейрональную дифференцировку МСК костного мозга крысы. Стрелки указывают на отростки нейроно-подобных клеток

Более того, иммуноцитохимический анализ показал, что клетки после обработки нейротрофическим фактором BDNF экспрессировали маркер нейрональных клеток Nestin и (маркер нейрональных клеток) и MAP2 (маркер зрелых нейронов), что характерно для нейрональных прогениторных клеток (рис. 7).



Рисунок 7 – Иммуноцитохимический анализ нейроно-подобных клеток образовавшиеся после дифференцировки МСК в присутствии BDNF. Двойное иммуноокрашивание: использовали кроличьи антикрысинные антитела к NeuN (1:100) и мышиные антикрысинные антитела к MAP2 (1:100)

## Выводы

По результатам проведенного исследования было установлено, что добавление рекомбинантного BDNF к МСК и двигательным нейронам оказывало дозозависимый стимулирующий эффект на пролиферацию этих клеток. Кроме этого, было обнаружено, что BDNF способен индуцировать МСК в нейроно-подобные клетки экспрессирующие нестин (маркер нейрональных прогениторных клеток)

и MAP2 (маркер зрелых нейронов). Результаты пролиферативного теста показали, что хондроитиназа ABC вызывала повышение роста двигательных нейронов, но не МСК крыс.

Таким образом, мы считаем, что полученные данные, могут быть основой для разработки новых комбинированных подходов для более эффективной регенерации и восстановления функций поврежденного спинного мозга.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schwab M.E., Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord // *Physiol Rev.* - 1996 Apr. - Vol. 76(2). - P. 319-70.
- Tator H. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury // *Injury Prevention.* - 2002. - № 8 - P. iv33-iv36.
- Ikeda O., Murakami M., Ino H., et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on compression-induced spinal cord injury: BDNF attenuates downregulation of superoxide dismutase expression and promotes up-regulation of myelin basic protein expression // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 2002. - Vol. 61. — P. 142-153.
- Jakeman L.B., Wei P., Guan Z., Stokes B.T. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury // *Exp. Neurol.* — 1998. — Vol. 154. - P. 170-184.
- Koda M., Murakami M., Ino H., et al. Brain-derived neurotrophic factor suppresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats // *J. Neurotrauma.* - 2002. - Vol. 19. - P. 777-785.
- Ma Y.T., Hsieh T., Forbes M.E., et al. BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death // *J. Neurosci.* - 1998. - Vol. 18. - P. 2097-2107.
- Tom V.J., Sandrow-Feinberg H.R., Miller K., Domitrovich C., Bouyer J., Zhukareva V., Klaw M.C., Lemay M.A., Houlé J.D. Exogenous BDNF enhances the integration of chronically injured axons that regenerate through a peripheral nerve grafted into a chondroitinase-treated spinal cord injury site // *Exp Neurol.* - 2013. - № 239 - P. 91-100.
- Gu W.L., Fu S.L., Wang Y.X., Li Y., Lü H.Z., Xu X.M., Lu P.H. Chondroitin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway // *BMC Neurosci.* - 2009. - Vol. 10. - P. 128.
- Parr A.M., Tator C.H., Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. // *Bone Marrow Transplant.* - 2007. - №40(7) - P. 609-19.
- Seo J.H., Cho S.R. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials // *Yonsei Med J.* - 2012. - №53(6) - P. 1059-67.
- Vawda R., Fehlings M.G. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives // *Curr Stem Cell Res Ther.* - 2013. - № 8(1) - P. 25-38.
- Fehlings M.G., Vawda R. Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials // *Neurotherapeutics.* - 2011. - №8(4) - P. 704-20.
- Tom V.J., Sandrow-Feinberg H.R., Miller K., Domitrovich C., Bouyer J., Zhukareva V., Klaw M.C., Lemay M.A., Houlé J.D. Exogenous BDNF enhances the integration of chronically injured axons that regenerate through a peripheral nerve grafted into a chondroitinase-treated spinal cord injury site // *Exp Neurol.* - 2013. - №239 - P. 91-100.
- Tom V.J., Sandrow-Feinberg H.R., Miller K., Santi L., Connors T., Lemay M.A., Houlé J.D. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord // *J Neurosci.* - 2009. - №29(47) - P. 14881-90.
- Cheng C.H., Lin C.T., Lee M.J., Tsai M.J., Huang W.H., Huang M.C., Lin Y.L., Chen C.J., Huang W.C., Cheng H. Local Delivery of High-Dose Chondroitinase ABC in the Sub-Acute Stage Promotes Axonal Outgrowth and Functional Recovery after Complete Spinal Cord Transection // *PLoS One.* - 2015. - №10(9) - P. e0138705.



## ТҮЙІНДЕМЕ

В.Б. Огай<sup>1</sup>, Ш.Е. Байдосова<sup>1</sup>, Е.А. Ли<sup>1</sup>, Т.Т. Керимбаев (м.ф.д.)<sup>2</sup>, В.Г. Алейников<sup>2</sup>,  
Н.Т. Алдиярова (м.ф.д.)<sup>2</sup>, С.К. Акшулаков (м.ф.д.)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> «Ұлттық биотехнология орталығы» ҚР БҒМ ҒК РМК, Астана, Қазақстан

<sup>2</sup> «Ұлттық нейрохирургия орталығы» АҚ ҚР ДСМ, Астана, Қазақстан

## МЕЗЕНХИМАЛДЫ БАҒАНАЛЫ ЖАСУШАЛАРДЫҢ ҚЫЗМЕТТІК БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ЖӘНЕ ЕГЕУҚҰЙРЫҚТАРДЫҢ ҚОЗҒАУЫШ НЕЙРОНДАРЫНА BDNF НЕЙРОТРОФТЫ ФАКТОРЫНЫҢ ЖӘНЕ ABC ХОНДРОИТИНАЗАНЫҢ ӘСЕРІ

Зерттеу жұмыстың мақсаты мезенхималды бағаналы жасушалардың (МБЖ) қызметтік белсенділігіне және егеуқұйрықтардың қозғауыш нейрондарына BDNF нейротрофты факторы және ABC хондроитиназаның әсерін зерттеу болып табылады. Қозғауыш нейрондарының және егеуқұйрықтардың МБЖ-ның қызметтік белсенділігін пролиферативті, морфологиялық және иммунохимиялық талдаулар арқылы өткізген. Зерттеу нәтижесінде BDNF МБЖ-ның сонымен қатар қозғауыш нейрондарының пролиферативті белсенділігін арттыратыны анықталды. Сонымен бірге, BDNF жасушалардың пролиферациясына мөлшер байланысты әсері бар екені анықталды. Сонымен қатар BDNF МБЖ-ның нейро-

налды бағытында өзгеруге ықпал ететіні көрсетілді. ABC хондроитиназаны МБЖ-ға қосқанда керісінше пролиферативті белсенділігіне әсер етпейтіні анықталды. Қозғауыш нейрондарымен ABC хондроитиназаны бірге қосып өсіргенде жасушалардың пролиферациясы арттырылатыны көрсетілді. Сонымен бірге, әсері 2-ден бастап 10-ға дейін Бірл./мл мөлшерінде байланысты болды.

Сонымен, алынған нәтижелер бойынша BDNF пен ABC хондроитиназа МБЖ-ға және жұлын қозғауыш нейрондарының қызметтік белсенділігіне ынтыландырушы әсері бар екені көрсетілді.

**Негізгі сөздер:** BDNF, ABC хондроитиназа, мезенхималды бағаналы жасушалар, қозғауыш нейрондар.

## SUMMARY

V.B. Ogay<sup>1</sup>, Sh.E. Baidosova<sup>1</sup>, Y.A. Li<sup>1</sup>, T.T. Kerimbaev (D.Med.Sci.)<sup>2</sup>, V.G. Aleynikov<sup>2</sup>,  
N.T. Aldiyarova (D.Med.Sci.)<sup>2</sup>, S.K. Akshulakov (D.Med.Sci.)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> RSE «National Center for Biotechnology», Astana, Republic of Kazakhstan

<sup>2</sup> JSC «National Centre for Neurosurgery», Astana, Republic of Kazakhstan

## EFFECT OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND CHONDROITINASE ABC ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT MESENCHYMAL STEM CELLS AND MOTOR NEURONS

The aim of this study was to investigate the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and chondroitinase ABC on the functional activity of motor neurons and rat mesenchymal stem cells (MSCs). Functional activity of motor neurons and MSCs has been examined using the proliferative, morphological, and immunocytochemical analysis. Results of this study showed that BDNF increased both proliferative activity of MSCs and motor neurons. In this case, dose-dependent effect of BDNF on the proliferation of these cells was found. Moreover, it was observed that BDNF is able to induce MSC differentiation into

neuronal direction. The addition of chondroitinase ABC to MSC culture had no effect on proliferative activity. In contrast, cultivation of motor neurons together with chondroitinase ABC resulted in increasing of cell proliferation. In this case the effect was dose-dependent ranging from 2 to 10 U/ml.

Thus, these data showed that BDNF and chondroitinase ABC have stimulating effect on the functional activity of spinal cord motor neurons and MSCs.

**Keywords:** BDNF, chondroitinase ABC, mesenchymal stem cells, motor neurons.