

ТРЕКИНГ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

***Скуратов А.Г., Лызииков А.Н., Осипов Б.Б.,
Воропаев Е.В., Призенцов А.А.***

Гомельский государственный медицинский университет,
Гомель, Белоруссия

Актуальность. В последнее время активно развивается регенеративная медицина, использующая в своем арсенале технологии, направленные на восстановление или замещение утраченной функции или части органа. Внимание привлекает использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК), что объясняется относительной простотой выделения и культивирования *ex vivo*. Эти клетки имеют высокий потенциал к самообновлению и дифференцировке в разные виды соматических клеток [1, 2, 3].

Однако остаются нерешенные вопросы относительно того, как эффективно прошла трансплантация клеточного материала, какое количество клеток и их потомков представлено в организме реципиента, их локализация и жизнеспособность в тканях и органах [4, 5].

Для изучения процессов адгезии, миграции, хоуминга МСК в тканях реципиента необходимо отслеживание (англ. tracking) клеток после трансплантации [4, 5]. В условиях эксперимента могут быть использованы специальные флуоресцентные красители МСК (PKH 67, CM-Dil и др.), однако недостатком их является относительная токсичность для клеток и малая продолжительность флуоресценции после нескольких клеточных делений. Для трекинга МСК в отделанном посттрансплантационном периоде может быть использован альтернативный способ на основе естественных генетических различий между мужским и женским организмом при разнополой трансплантации.

Цель исследования: в условиях эксперимента с индуцированным хроническим гепатитом у лабораторных животных провести трекинг МСК после их трансплантации.

Материалы и методы. Объектом исследования стали лабораторные крысы линии Вистар с индуцированным хроническим гепатитом путем внутрибрюшинного введения 50% раствора CCl₄ (тетрахлорметан) на оливковом масле в дозе 1 мл на кг массы тела 2 раза в неделю. МСК выделяли из жировой ткани крыс и культивировали согласно протоколу [6]. Проводили типирование МСК по морфологии и экспрессии маркерных генов (CD 90, 29, 44, 45 и др.). В эксперимент брали МСК второго пассажа. Проводили прижизненное окрашивание МСК с помощью флуоресцентных красителей PKH 67 и CM-Dil.

Методом проточной цитометрии (прибор FC-500 “Beckman Coulter“, США) оценивали степень окрашивания МСК (97% позитивно окрашенных). Дополнительно окрашивали ядра клеток пропидий йодидом (PI), придающим свечение в красном спектре.

Далее окрашенные МСК ресуспендировали в D-PBS и вводили в количестве 2x10⁶ кл/мл; пути трансплантации – внутривенный системный (в хвостовую вену) и внутрипортальный. Через 5 суток животных выводили из эксперимента.

Флуоресцентную микроскопию проводили на высушенных криосрезях печени толщиной 8-10 мкм, на флуоресцентном микроскопе NIKON Eclipse E200.

Для трекинга в отдаленном периоде (45-е сутки) проводили разнополую трансплантацию МСК, выделенных от самцов, в хвостовую вену самок. Затем во фрагментах ткани (печень, миокард, селезенка, сальник, и легкое) выделяли ДНК для определения экспрессии гена Sry, характерного для ДНК самцов, методом ПЦР. Использовали праймеры, специфичные для гена Sry крысы.

Результаты. Через 2 месяца введения тетрахлорметана у крыс развился токсический хронический гепатит с переходом в цирроз с формированием мультилобулярных ложных долек, разделенными полями соединительной ткани, перипортальным и центрлобулярным фиброзом, жировой дистрофией гепатоцитов (METAVIR F3-4).

Анализ флуоресцентной микроскопии криосрезей печени крыс показал, что гепатоциты имели многогранную, кубическую и призматическую форму, местами разной величины и формы. Около 10% клеток имели более крупные ядра с маленькими ядрышками с хорошо развитой цитоплазмой, встречались двухъядерные клетки. Люминесценция цитоплазмы в зеленом спектре, ядер – в красном. Выявлены множественные флуоресцирующие очаги желто-зеленого цвета (МСК, меченные РКН 67), которые располагались перипортально, иногда диффузно инкорпорировались в дольки. МСК, окрашенные CM-Dil, светились в красном спектре, а ядра, меченные красителем Dapi, контрастировались синим цветом. Их локализация также характеризовалась перипортальными зонами. Стоит отметить, что специфической флуоресценции не было отмечено ни в каком другом органе. Таким образом трекинг МСК подтвердил теорию хоуминга.

Проанализированы более 100 образцов ДНК из фрагментов печени. Положительный результат ПЦР на последовательность гена Sry был выявлен у всех крыс-реципиентов в образцах полной ДНК, верифицированной по температуре плавления продукта ПЦР.

При анализе результатов было установлено, что копияность гена Sry по отношению к гену *cyt p450c* в образцах ДНК тканей крыс мужского пола составила $397,6 \pm 36,96\%$ ($M \pm SE$, $N=14$). Для этого параметра в образцах тканей крыс женского пола с положительным результатом ПЦР было выявлено непараметрическое распределение признака (тест Шапиро-Уилкоксона, $P \leq 0,0001$), и медианное значение составило $0,00049$; $0,00024-0,00106$ (Me; 25%-75%) при среднем значении $0,0012 \pm 0,0003\%$ ($M \pm SE$, $N=54$). При сравнении медианных значений копияности гена sry в этих группах были выявлены достоверные отличия $P=0,001$ (тест Манна-Уитни, $U=12$). Медианное значение копияности гена Sry в неверифицированной группе соответствовало количеству трансплантированных клеток $1,07 \cdot 10^{-6}$, в верифицированной – $9,93 \cdot 10^{-6}$ или одна и десять донорских клеток на миллион клеток реципиента соответственно.

Таким образом, в эксперименте подтверждено, что МСК донора выживают в тканях реципиента в течение 45 суток после трансплантации МСК.

Выводы:

1) Внедренные в эксперименте методики трекинга МСК после трансплантации в тканях реципиента показали свою эффективность.

2) Окрашивание МСК липофильными флуоресцентными красителями (PKH67, CM-Dil) наглядно продемонстрировало инкорпорацию МСК преимущественно в перипортальных зонах печени реципиента. Эти методы информативны в раннем посттрансплантационном периоде (1-2 недели).

3) В отдаленном периоде после трансплантации о приживлении МСК свидетельствовали положительные результаты детекции гена Sry при разнополой родственной пересадке.

4) Было установлено, что при проведении метода определения генетического материала донорских клеток в тканях реципиента методом ПЦР положительный результат может быть получен для единичных клеток донора, однако для получения надежного верифицированного результата необходимо, чтобы донорские клетки присутствовали в тканях в концентрации не менее 10^{-5} (одна клетка донора на 100000 клеток реципиента).

Список литературы

1. Яргин, С.В. Стволовые клетки и клеточная терапия: на подступах к научному подходу / С.В. Яргин // Цитология . – 2010, том 52 (№ 11). – С. 918-920.
2. Dan, Y.Y. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. / Y.Y. Dan, G.C. Yeoh // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2008; 23. – P. 687-698.
3. Volarevic, V. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis / V.Volarevic [et al.] // Stem Cells. – 2014 Aug 22. doi: 10. – P.1002; 1818.
4. Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking/P.K. Horan [et. al.]// Methods in Cell Biology. – 1990. – 33. – P. 469.
5. Wang, Y. In vivo MRI tracking and therapeutic efficacy of transplanted mesenchymal stem cells labeled with ferrimagnetic vortex iron oxide nanorings for liver fibrosis repair / Y.Wang [et al.] // Nanoscale. – 2022 Mar 31;14(13). – P. 5227-5238.
6. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / H. Zhu [et. al.] // Nat Protoc. – 2010. – 5(3). – P. 550-560.