

7. Германенко, И. Г. Цитомегаловирусная инфекция: этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение / И. Г. Германенко, А. П. Кудин. — Минск: Зималлето, 2009. — С. 4–7, 11–12.

8. Montoya, J. G. Toxoplasma gondii / J. G. Montoya, J. S. Remington // Principles and Practice of Infectious Diseases / Ed. G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin. — Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. — P. 2858–2888.

9. Оптимизация подходов к наблюдению и лечению детей с ВИЧ/СПИДом (инструкция по применению): утв. Мин-вом здравоохранения Республики Беларусь 10.09.2008. — Минск, 2008. — 100 с.

10. Report of the technical consultation on clinical staging of HIV/AIDS and HIV/AIDS case definition for surveillance. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2005. — <http://www.euro.who.int/document/E87956.pdf>, accessed 19 December 2006).

Поступила 25.06.2014

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 616.1.9-055.5

### МЕТОДИКИ ТРЕКИНГА ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ РЕЦИПИЕНТА

А. Г. Скуратов, А. Н. Лызиков, Д. Р. Петренев

Гомельский государственный медицинский университет  
Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель

**Цель:** охарактеризовать и применить в эксперименте современные методики трекинга мезенхимальных стволовых клеток в организме реципиента после трансплантации.

**Материалы и методы.** Мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани (выделение, культивирование, окраска флуоресцентными красителями PKH67 и Dil); лабораторные крысы линии Вистар; экспериментальная модель СС14-индуцированного хронического гепатита; введение меченных мезенхимальных стволовых клеток в организм лабораторных животных; флуоресцентная микроскопия криосрезов органов; ПЦР-анализ копийности гена Sry.

**Результаты.** Апробированные методики трекинга мезенхимальных стволовых клеток показали информативность мечения клеток флуоресцентными красителями и последующего изучения миграции их в организме реципиента при анализе флуоресцентной микроскопии криосрезов органов. Были выявлены очаги яркой желто-зеленой (PKH 67) или красной (Dil) флуоресценции размером с клетку, колокализованные с клеточными ядрами. Для оценки приживания клеток в отдаленном периоде применена методика выявления гена Sry в организме реципиента женского пола после введения стволовых клеток, выделенных от мужской особи. Показано выживание мезенхимальных стволовых клеток через 45 дней после трансплантации.

**Заключение.** Исследование трекинга трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток в организме реципиента в ранние сроки (1–2 недели) информативно с помощью методики прижизненного мечения их липофильными флуоресцентными красителями. В отдаленный посттрансплантационный период о приживлении клеток можно судить по выявлению гена Sry при разнополой родственной трансплантации.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, флуоресцентные красители PKH67 и Dil, флуоресцентная микроскопия, Sry ген, ПЦР-анализ.

### TRACKING TECHNIQUES OF TRANSPLANTED MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE RECIPIENT'S ORGANISM

A. G. Skuratov, A. N. Lyzikov, D. R. Petrenyov

Gomel State Medical University  
Institute of Radiobiology NAS of Belarus, Gomel

**Objective:** to characterize and apply modern methods of tracking of mesenchymal stem cells in a recipient after transplantation in experiment.

**Material and methods.** Mesenchymal stem cells from adipose tissue (isolation, cultivation, labeling with fluorescent PKH67 and Dil dyes); laboratory Wistar rats; experimental model of CC14-induced chronic hepatitis; introduction of labeled mesenchymal stem cells in the organism of laboratory animals; fluorescence microscopy of organ cryosections; PCR analysis of the copy number of the Sry gene.

**Results.** The approved tracking techniques of mesenchymal stem cells have showed the informativity of the cell labeling with fluorescent dyes and further study of their migration in the recipient's organism during the analysis of fluorescence microscopy of the organ cryosections. It detected cell-size centers of bright yellow-green (PKH 67) or red (Dil) fluorescence colocalized with cell nuclei. To assess engraftment of the cells in the long term we applied the technique to identify Sry gene in female recipients after the transplantation of stem cells isolated from males. It showed the survival of mesenchymal stem cells after 45 days after the transplantation.

**Conclusion.** The study of the tracking of the transplanted mesenchymal stem cells in the recipient's organism in the early period (1–2 weeks) with the help of the techniques of their “in vivo” labeling with lipophilic fluorescent dyes becomes informative. It is possible to evaluate the engraftment of the cells in the remote post-transplantation period by identifying the Sry gene after related transplantation from donors of different sexes.

**Key words:** mesenchymal stem cells, fluorescent dyes PKH67 and Dil, fluorescence microscopy, Sry gene, PCR analysis.

### **Введение**

В последнее время огромное внимание привлекает перспектива использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в регенеративной хирургии. Это объясняется относительной простотой выделения, культивирования и манипулирования МСК *ex vivo*. МСК имеют высокий потенциал к самообновлению и дифференцировке в различные типы соматических клеток, а также способность к стимулированию процессов регенерации тканей [1, 2, 4].

Активное внедрение клеточных технологий в экспериментальную и практическую медицину сопряжено с появлением ряда вопросов: насколько эффективно прошла трансплантация клеток, в каком количестве представлены клетки трансплантата и их потомки в организме реципиента, какова локализация клеток в тканях, как прошла ассимиляция и дифференцировка. [5, 8, 10, 12].

Для оценки приживления МСК в организме реципиента необходимо проводить трекинг (от англ. tracking — отслеживание) клеток после их трансплантации [6, 7, 11]. В экспериментальных условиях могут быть применены методы, основанные на включении специальных красителей (РКН 26, 67 и др.) в мембраны МСК. Однако эти методики имеют определенный недостаток: относительная токсичность красителей для клеток, а также непродолжительность мечения и потеря специфического сигнала после нескольких клеточных делений. Также существуют методы генной модификации, которые преодолевают это ограничение и позволяют помимо приобретения клетками трансплантата новых функций (например, синтез инсулина, устойчивость к антибиотику, мультипотентность) получить устойчивый генетический маркер, сохраняющийся на протяжении жизни клеток трансплантата. Однако при этом происходит вмешательство в геном клетки и увеличивается риск неоттрансформации клеток.

Альтернативой может стать использование естественных генетических различий между мужским и женским организмом. Существует возможность отслеживать миграцию клеток мужского организма, пересаженных в женский, оценивая с помощью метода ПЦР наличие генов мужского организма в тканях женского. Особенно воспроизводим и эффективен этот подход в экспериментальных работах на ли-

нейных лабораторных животных, что связано с отсутствием проблемы отторжения тканей.

### **Цель**

Охарактеризовать и применить в эксперименте современные методики трекинга мезенхимальных стволовых клеток в организме реципиента после трансплантации их крысам с индуцированным хроническим гепатитом.

### **Материалы и методы исследования**

Использовались лабораторные крысы линии Вистар. Экспериментальная модель хронического токсического гепатита создавалась путем внутрибрюшинного введения 50 % раствора  $CCl_4$  (четырёххлористый углерод) на оливковом масле из расчета 1 мл на кг массы тела два раза в неделю. Выделение и культивирование МСК из жировой ткани крыс проводили по стандартной методике протокола [3, 9]. Для экспериментов использовали МСК второго пассажа. МСК типировали по характерной морфологии и по экспрессии маркерных генов (CD 90, 29, 44, 45 и др.).

МСК прижизненно окрашивали с помощью флуоресцентных красителей РКН 67 и CM-Dil.

Краситель РКН67, названный по имени его создателя (Paul Karl Horan), является флуоресцентным липофильным красителем с длинными алифотическими углеводородными «хвостами» и полярными флуоресцирующими головными группами, быстро и стабильно связывается с липидным бислоем клеточной мембраны в изоосмотических условиях за счет прочных нековалентных взаимодействий. РКН67 часто используется в оценке пролиферативной активности (стабилен для 6–8 клеточных делений), для изучения процессов адгезии, миграции, хоуминга.

**Методика окраски.** Клеточную суспензию однократно отмывали в D-PBS. Очень важно проводить отмывку буфером или средой без добавления сыворотки, так как сывороточные белки и липиды также связываются с красителем и могут снижать его эффективную концентрацию. Центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. Осторожно отбирали максимально супернатант, не затрагивая клеточного осадка, оставляя не более 20–30 мкл надосадочной жидкости. Для воспроизводимости результатов важно минимизировать количество остаточной жидкости над клеточным осадком. Клеточный осадок МСК осторожно ресуспензировали пипетированием в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл

в 1 мл коммерческого буфера (растворителя). Непосредственно перед процедурой окрашивания готовили рабочий раствор красителя согласно инструкции производителя в концентрации  $2 \times 10^{-6}$  М. Клетки окрашивали раствором РКН67 в общем объеме 2 мл и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Во время инкубирования клетки периодически осторожно перемешивали вращением. Процесс окрашивания останавливали путем добавления равного объема (2 мл) FBS (можно использовать другие растворы, содержащие белок, например, 1 % BSA или полную культуральную среду) с последующим инкубированием в течение 1 мин. Центрифугировали 5–7 мин при 300 g при 25 °С. Клетки дважды отмывали D-PBS и центрифугировали 5–7 мин при 300 g при 25 °С. Подсчитывали концентрацию в камере Горяева и готовили суспензию клеток для дальнейших манипуляций в необходимой концентрации.

CM-Dil (Chloromethylbenzamido Dil) — это производное от Dil (Vibrant, Invitrogen, США), обладает лучшей растворимостью в воде и лучше захватывается клетками. Мечение производили посредством инкубации суспензии клеток с CM-Dil в концентрации 2 мкг/мл в течение 15 мин при 37 °С и еще 15 — при 4 °С. Далее клетки отмывали полной средой, ресуспензировали в 1 мл полной среды (DMEM/F12 10 % FBS) и использовали для трансплантации и последующего анализа.

Степень окрашивания МСК оценивали методом проточной цитометрии (прибор FC-500 «Beckman Coulter», США). Доля позитивно окрашенных клеток составила 97 %. Для контраста дополнительно производили окраску ядер клеток пропидий йодидом (PI), дающим красное свечение. Для трансплантации лабораторным животным окрашенные МСК ресуспензировали в D-PBS и вводили в концентрации  $1-3 \times 10^6$  клеток/мл на сайт введения на животное. Путь введения

клеток: внутривенный системный (в хвостовую вену) и внутрипортальный. Животных выводили из эксперимента через 5 суток. Из печени крыс изготавливали криосрезы толщиной 8–10 мкм, высушивали и изучали на флуоресцентном микроскопе NIKON Eclipse E200.

Для определения гена Sry у самок после трансплантации МСК, выделенных от самцов, через 45 суток животных выводили из эксперимента и выделяли внутренние органы. Отбирали фрагменты тканей печени, миокарда, селезенки, сальника и легкого, помещали в полипропиленовые 1,5 мл пробирки и хранили при -70 °С до выделения ДНК. Геномную ДНК выделяли в соответствии с рекомендациями производителя набора # K0512 («Fermentas», Литва).

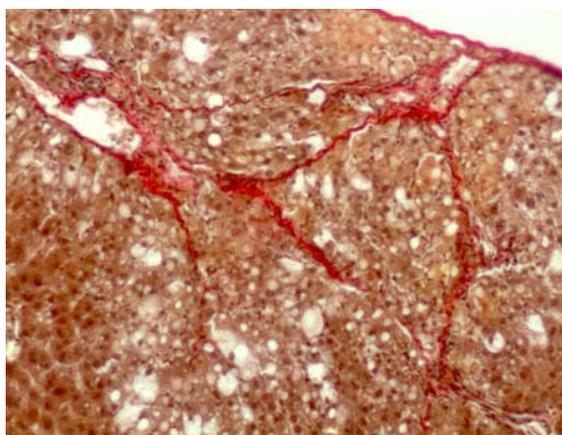
Анализ ПЦР проводили при стандартных условиях на оборудовании Rotor Gene 3000 (Corbet). Использовали праймеры, специфичные для гена Sry крысы. Для нормализации копийности гена применяли праймеры, специфичные для гена Cyt p450c. Копийность гена Sry рассчитывали в процентах относительно представленности гена Cyt p450c в проанализированных образцах ДНК. Для определения относительного уровня экспрессии гена значение эффективности амплификации возводили в степень  $-\Delta Ct$  для анализируемого гена и гена сравнения (для расчетов использовали значение эффективности ПЦР для гена сравнения 1,92). Эффективность ПЦР для выбранных пар праймеров составила 92–97 %, что соответствует требованиям к постановке количественной ПЦР.

#### **Результаты и обсуждение**

Через 2 месяца назначения тетрахлорметана у крыс развилась картина хронического токсического гепатита с переходом в цирроз (рисунок 1).

#### **Флуоресцентная микроскопия криосрепаратов**

При анализе изображений флуоресцентной микроскопии криосрезов печени крыс наблюдалась следующая картина (рисунок 2).



**Рисунок 1** — Ткань печени крысы при постнекротическом циррозе: формирование мультилобулярных ложных долек, разделенными полями соединительной ткани, перипортальный и центролобулярный фиброз, жировая дистрофия гепатоцитов.  $\times 100$ . Окраска по Ван-Гизон

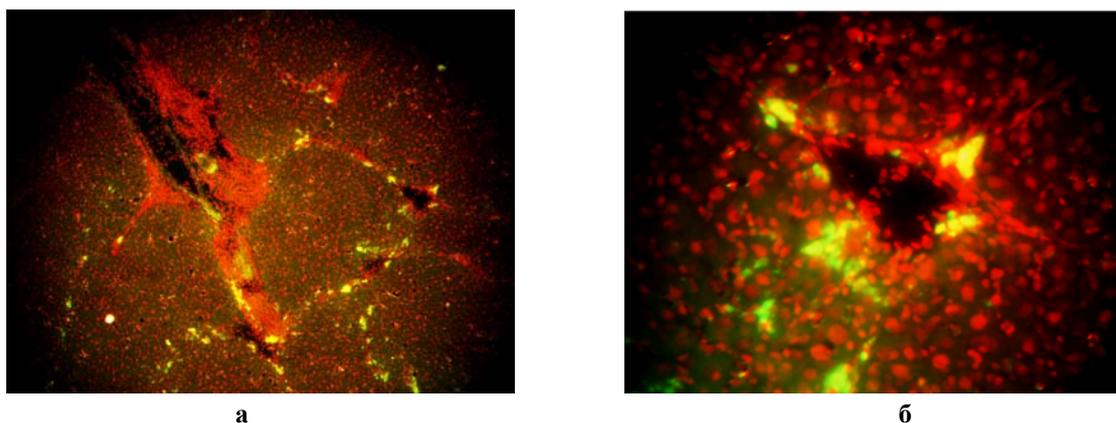


Рисунок 2 — Флуоресцентная микроскопия криопрепарата печени крысы с ХГ на 5-е сутки (объектив  $\times 10$  (а),  $\times 40$  (б))

Гепатоциты многогранные, кубической и призматической, местами разной величины и формы. До 11 % клеток имеют более крупные ядра и встречаются двухъядерные клетки. Цитоплазма хорошо развита, ядрышки маленькие. Цитоплазма люминесцирует зеленым цветом, ядра красные (мечены красителем PI). Определяется множественные флуоресцентные очаги желто-зеленого цвета (МСК, меченные РКН 67), распо-

лагающиеся вокруг портальных трактов, местами диффузно проникающие в дольки.

При окрашивании МСК красителем CM-Dil в клетках индуцировалось свечение в красном спектре. Ядра были мечены красителем Dapi (контрастированы синим цветом) (рисунок 3).

Флуоресцентная микроскопия также показала наличие в перипортальных зонах очагов специфической флуоресценции (рисунок 4).

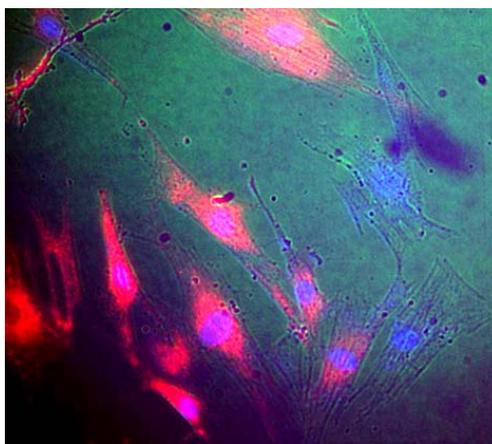


Рисунок 3 — Состояние культур меченных и немеченных МСК после 3 суток совместного культивирования *In vitro* (исходно 50 % интактных клеток и 50 %, меченных Dil-CM)

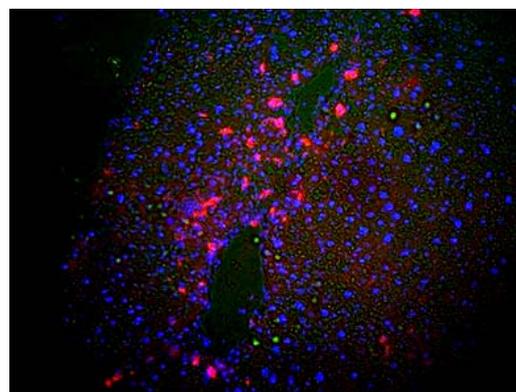
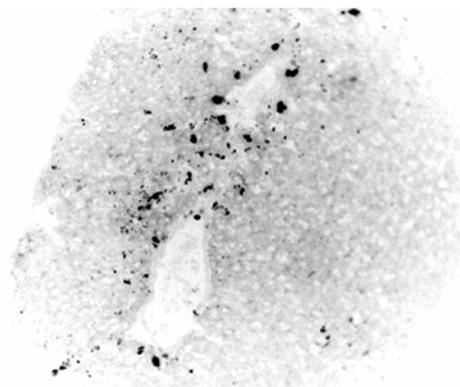


Рисунок 4 — Интегрирование меченных CM-Dil МСК в тканях организма (криосрез фрагмента печени; объектив  $\times 20$ ): слева — инвертированная флуоресцентная микроскопия (черные вкрапления — меченные МСК)

*Определение Sry гена в ткани печени после трансплантации*

Было проанализировано более 100 образцов ДНК из замороженных фрагментов печени. Положительный результат ПЦР на последовательность гена Sry был обнаружен у всех реципиентов в образцах тотальной ДНК. Наличие искомого гена верифицировали по температуре плавления продукта ПЦР.

При анализе результатов было установлено, что копийность гена Sry по отношению к гену Cyt p450c в образцах ДНК тканей мужского организма составляет  $397,6 \pm 36,96 \%$  ( $M \pm SE$ ,  $N = 14$ ). Для этого параметра в образцах тканей женского организма с положительным результатом ПЦР было выявлено непараметрическое распределение признака (тест Шапиро — Уилкисона,  $p < 0,0001$ )

и медианное значение составило  $0,00049$ ;  $0,00024-0,00106$  (Me; 25–75 %) при среднем значении  $0,0012 \pm 0,0003 \%$  ( $M \pm SE$ ,  $N = 54$ ), рисунок 5.

Медианное значение копийности гена Sry для неверифицированных положительных случаев составило  $0,00046$ ;  $0,00021-0,00097$  (Me; 25–75 %,  $N = 50$ ), а для верифицированных —  $0,00503 \pm 0,00193$  ( $M \pm SE$ ,  $N = 4$ ). При сравнении медианных значений копийности гена Sry в этих группах были выявлены достоверные отличия,  $p = 0,001$  (тест Манна — Уитни,  $U = 12$ ). Медианное значение копийности гена Sry в неверифицированной группе соответствовало количеству трансплантированных клеток  $1,07 \times 10^{-6}$ , в верифицированной —  $9,93 \times 10^{-6}$  или одна и десять донорских клеток на миллион клеток реципиента соответственно (рисунок 6).

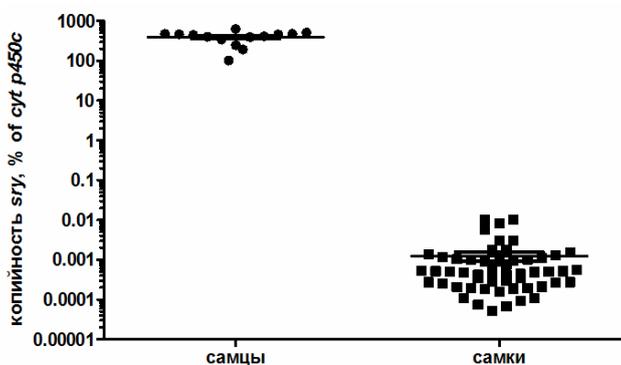


Рисунок 5 — Копийность гена Sry у самцов и самок

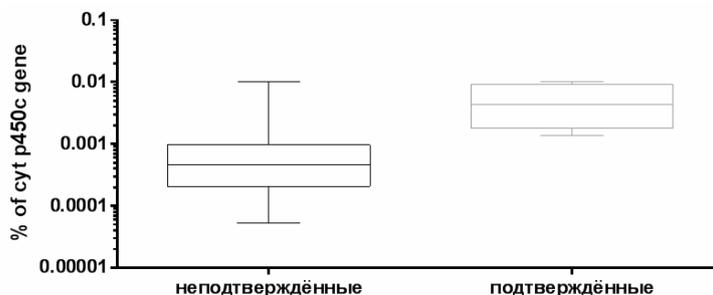


Рисунок 6 — Копийность гена Sry в тканях крыс-самок

Таким образом, экспериментально подтверждено выживание клеток донора в тканях реципиента в течение 45 суток после трансплантации МСК. Малое количество выявленных клеток может быть связано с иммунным отторжением, относительно малым количеством клеток трансплантата, низкой жизнеспособностью, что требует проведения дальнейших исследований.

**Выводы**

1. Апробированные методы трекинга МСК в тканях реципиента показали свою состоятельность.

2. Методики с окрашиванием МСК липофильными красителями (PKH67, CM-Dil) очень наглядно демонстрируют инкорпорацию МСК

в ткани печени реципиента. Эти технологии особенно эффективны в ранние сроки после трансплантации (1–2 недели).

3. В отдаленный посттрансплантационный период о приживлении клеток можно судить по выявлению гена Sry при разнополой родственной трансплантации.

4. При проведении метода определения генетического материала донорских клеток в тканях реципиента методом ПЦР установлено, что положительный результат может быть получен для единичных клеток донора в образцах ткани, однако для получения надежного верифицированного (по кривым плавления продукта ПЦР) результата необходимо, чтобы

донорские клетки присутствовали в тканях в концентрации не менее  $10^{-5}$ .

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кирик, В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине / В. М. Кирик, Г. М. Бутенко // Журн. АМН України. — 2010. — Т. 16, № 4. — С. 576–604.
2. Яргин, С. В. Стволовые клетки и клеточная терапия: на подступах к научному подходу / С. В. Яргин // Цитология. — 2010. — Т. 52, № 11. — С. 918–920.
3. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone / H. Zhu [et. al.] // Nat Protoc. — 2010. — Vol. 5(3). — P. 550–600.
4. Barry, F. P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F. P. Barry, J. M. Murphy // Int J Biochem Cell Biol. — 2004. — Vol. 36(4). — P. 568–584.
5. Dan, Y. Y. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective / Y. Y. Dan, G. C. Yeoh // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2008. — Vol. 23. — P. 687–698.
6. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver / T. G. Fellous [et al.] // Hepatology. — 2009. — Vol. 49. — P. 1655–1663.
7. Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking / P. K. Horan [et al.] // Methods in Cell Biology. — 1990. — Vol. 33. — P. 469.
8. Gokhale, P. J. A prospective on stem cell research / P. J. Gokhale, P. W. Andrews // Semin Reprod Med. — 2006. — Vol. 24(5). — P. 289–297.
9. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // Mol Biol Cell. — 2002. — Vol. 13(12). — P. 4279–4295.
10. Meirelles, Lda S. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells / Lda. S. Meirelles, N. B. Nardi // Front Biosci. — 2009. — № 14. — P. 4281–4298.
11. Meirelles, Lda S. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells / Lda. S. Meirelles, A. I. Caplan, N. B. Nardi // Stem Cells. — 2008. — 26(9). — P. 2287–2299.
12. 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.

Поступила 06.11.2014

УДК 616.133.3:615.462:616-091

### ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АРТЕРИАЛЬНОГО КРОВОТОКА В КАРОТИДНОМ БАССЕЙНЕ

А. А. Печёнкин, А. А. Лычиков, С. Л. Ачинович, Л. А. Мартемьянова

Гомельский государственный медицинский университет  
Гомельский областной клинический онкологический диспансер

**Цель:** изучение морфологических изменений при применении различных пластических материалов при включении в артериальный кровоток каротидного бассейна.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на экспериментальных животных. Оперативное вмешательство выполнялось 15 беспородным собакам. Средний вес составлял  $23 \pm 2$  кг. Все особи были самцы. При проведении экспериментальных исследований применяли различные заплатные материалы; в качестве искусственного материала — ПТФЭ кондуит, в качестве поверхностной аутовены использована большая подкожная вена, в качестве глубокой аутовены — бедренная вена. Оценка морфологических параметров проводилась с использованием световой оптической и электронной микроскопии. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы «Statistica» 6.0, оценка нормальности распределения признаков — с использованием критерия Шапиро-Уилка. Оценка нормальности распределения количественных признаков показала, что распределение показателей отличалось от нормального ( $p < 0,001$ ), поэтому сравнительный анализ между группами проводился с использованием методов непараметрической статистики. Для сравнительной характеристики признаков применялись непараметрические методы исследования: сравнение двух независимых выборок — U-критерий Манна — Уитни. При представлении числовых значений была использована медиана (Me), 25- и 75-й перцентиль: Me (25 %, 75 %). За уровень статистической значимости принимался  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Морфологическое исследование пластических материалов связано также с оценкой функции сосудистых протезов. При этом большое значение придается состоянию микроциркуляторного русла стенок сосудов. Важную роль в изучении морфологических и функциональных особенностей заплат играют морфометрический метод исследования. Особый интерес представляет изучение применения бедренной вены в качестве пластического материала.

**Заключение.** Через 12 месяцев от начала эксперимента наибольшая толщина стенки заплаты была выявлена при использовании бедренной вены, что отражает наиболее оптимальную адаптацию к условиям кровотока. Степень васкуляризации была выявлена при использовании бедренной вены, что благоприятно отражается на функционировании данного вида пластического материала.

**Ключевые слова:** морфология, вены, артерии, пластические материалы, эндартерэктомия.

### DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN PLASTIC MATERIALS UNDER THE INFLUENCE OF ARTERIAL BLOOD FLOW IN THE CAROTID BASIN

A. A. Pechionkin, A. A. Lyzhikov, S. L. Achinovich, L. A. Martemyanova

Gomel State Medical University  
Gomel Regional Clinical Oncologic Center

**Objective:** to study morphological changes in the application of various plastic materials for inclusion of the carotid basin into arterial blood flow.