



О. М. ЦУПИКОВ^{1,2}, В. М. КИРИК², К. В. ЯЦЕНКО¹,
Г. М. БУТЕНКО², Г. Г. СКИБО^{1,2}

¹ Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ

² ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ

Ефективність використання зеленого флуоресцентного білка як маркера для ідентифікації трансплантованих нейральних прогеніторних клітин у нервовій тканині мишей

Мета — оцінити ефективність використання зеленого флуоресцентного білка (GFP) як маркера донорських клітин у тканинах реципієнта у віддалені строки після трансплантації.

Матеріали і методи. Експериментальним тваринам трансплантували нейральні прогеніторні клітини, виділені з гіпокампів мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP. Через 90 днів після трансплантації GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин проведено імуногістохімічний аналіз зрізів мозку із використанням антитіл проти GFP за допомогою конфокального та електронного мікроскопа.

Результати. Імуногістохімічне дослідження з використанням антитіл проти GFP показало, що на 90-ту добу після стереотаксичної трансплантації у гіпокамп GFP-позитивні клітини диференціювалися в клітини з нейронною та гліальною морфологією. Ультраструктурний аналіз виявив, що трансплантовані GFP-позитивні клітини утворювали синаптичні контакти між донорськими клітинами і нейронами реципієнта на 90-ту добу після трансплантації.

Висновки. Результати дослідження свідчать про те, що GFP — це надійний нетоксичний маркер, який дає змогу ідентифікувати донорські клітини навіть у віддалені (до 90 діб) строки після трансплантації. Імуногістохімічне фарбування зрізів мозку із використанням антитіл проти GFP дає змогу візуалізувати донорські GFP-позитивні клітини за допомогою як конфокального, так і електронного мікроскопа.

Ключові слова: зелений флуоресцентний білок, нейральні прогеніторні клітини, трансплантація.

Сучасний розвиток клітинних і тканинних технологій тісно пов'язаний з новітніми розробками в галузі біохімії, біофізики та нанотехнологій. Виявлення і моніторинг клітинних та тканинних трансплантатів має важливе значення для розвитку клітинної терапії [3, 9]. Саме тому однією з актуальних проблем регенеративної медицини є не лише поліпшення проліферативного і диференційного потенціалу клітин в умовах культивування *in vitro*, а і безпечна, надійна та тривала оцінка міграції і диференціювання трансплантованих клітин в організ-

мі реципієнта *in vivo* [8]. З цією метою запропоновано варіанти мічення трансплантованих клітин: радіонуклідні, магнітні, флуоресцентні, генні тощо. Основними вимогами до таких міток є їх біосумісність і нетоксичність, відсутність впливу на геном клітини та її метаболізм, висока чутливість до виявлення сучасними методами ідентифікації маркера навіть в одній клітині протягом тривалого часу, мінімальне зниження здатності до детекції при поділі та диференціюванні клітин. Такими мітками можуть бути синтетичні аналоги нуклеотидів ДНК (бромдезоксидуридин (BrdU)), радіонукліди (⁹⁹Tc) тощо [1, 2, 10]. Але ці мітки не завжди стійкі та пе-

© О. М. Цупиков, В. М. Кирик, К. В. Яценко, Г. М. Бутенко, Г. Г. Скибо, 2017

редбачають попередній вплив на організм донора або культуру клітин для мічення їх безпосередньо перед процедурою трансплантації. Раніше також активно застосовували хромосомні маркери (виявлення Y-хромосоми у самок-реципієнтів клітин від самців, лінія мишей Т6Т6 тощо), але новим перспективним напрямом є використання трансгенних тварин, клітини яких стійко експресують гени, відповідальні за продукцію нетипових для організму реципієнта білків (β -галактозидаза *E. coli*, флуоресцентні білки), які можна виявляти імуногістохімічними або іншими методами [7]. Так, зелений флуоресцентний білок (від англ. green fluorescent protein (GFP)) є важливим маркером донорських клітин в організмі реципієнта завдяки нетоксичності та можливості виявлення простими методами візуалізації без руйнування структури тканин [6, 11].

GFP було виділено з медузи *Aequorea victoria* в 1961 р. [5], однак широко застосовувати його почали лише в 1990-ті роки, після того як вдалося клонувати ген *GFP* з медузи і показати, що цей білок, будучи синтезований практично в будь-якому організмі, флуоресцює під впливом ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі від 395 до 470 нм [4].

Ген *GFP* можна вводити у клітини тварин за допомогою плазмідного або вірусного вектора. У разі введення в зиготу він забезпечує стійку експресію GFP у всіх тканинах і органах генетично модифікованої тварини. Для створення таких трансгенних тварин найчастіше використовують техніку прямої мікроін'єкції ДНК у пронуклеуси зигот.

Мета роботи — оцінити ефективність використання зеленого флуоресцентного білка (GFP) як маркера донорських клітин у тканинах реципієнта у віддалені строки після трансплантації.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на самках мишей лінії FVB дикого типу (10 тварин) та FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J (5 тварин), трансгенних за геном *GFP* під промотором β -актину, віком 4—5 міс, яких утримували в стандартних умовах віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» з вільним доступом до води та їжі. Всі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою», а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Отримання GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин з фетального гіпокампа миші

У стерильних умовах з мозку плодів на 17—18-ту добу ембріонального розвитку від мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J, трансгенних за геном

GFP, виділяли гіпокампи. Фетальну нервову тканину механічно дисоціювали за допомогою пастерівських піпеток різного діаметра у середовищі Neurobasal (Gibco, США). Отриману суспензію клітин пропускати крізь нейлонові клітинні фільтри (Falcon, США) з діаметром пор 40 мкм. Очищену фракцію нейральних прогеніторних клітин (НПК) отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22 % розчин Percoll). Частку життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлуориметра-сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактіноміцином (7-AAD) (Becton Dickinson, США).

Трансплантація GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин

Свіжоізолювану та очищену суспензію НПК ($2,0\text{—}2,5 \cdot 10^5$ клітин у 2 мкл середовища Neurobasal) стереотаксично трансплантували в гіпокамп експериментальних тварин (координати від брегми: lateral $\pm 1,5$ мм, posterior — 2,0 мм, dorsoventrally — 1,7 мм) під комбінованим 2,2,2-трибромоетаноловим наркозом (125 мг/кг, інтраперитонеально).

Імуногістохімічний аналіз вібротомних зрізів головного мозку

Забір матеріалу для імуногістохімічного аналізу проводили у тварин на 90-ту добу після трансплантації НПК. Перед забором матеріалу мишей наркотизували внутрішньом'язовим введенням калісолу (75 мг/кг маси тіла) та інгаляційно ефіром. Фіксацію тканини проводили методом транскардіальної перфузії-фіксації 4 % розчином формальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,4. За допомогою вібратора VT1000A (Leica, Німеччина) виготовляли фронтальні зрізи мозку завтовшки 40 мкм. Після промивки у 0,1 М фосфатному буфері зрізи блокували у розчині 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4) з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну та 0,3 % Тритон X-100. Для виявлення донорських клітин використовували антитіла проти GFP (1 : 7000, Novus Biologicals, США). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з AlexaFluor 488 (1 : 1000, Molecular Probes Inc., США). Пофарбовані зрізи покривали середовищем IMMOUNT (Thermo Scientific, США). Імуногістохімічно забарвлені зрізи мозку досліджували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

Імуногістохімічний аналіз GFP-позитивних трансплантованих клітин на електронно-мікроскопічному рівні

Фіксацію тканини у наркотизованих тварин (калісол (75 мг/кг) — внутрішньом'язово, ефір — інгаляційно) проводили методом транскардіальної перфузії-фіксації охолодженням 2 % розчином фор-

мальдегіду та 0,2 % розчином глутаральдегіду (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4. Головний мозок після виділення промивали в 0,1 М фосфатному буфері. За допомогою вібратора VT1000A (Leica, Німеччина) виготовляли фронтальні зрізи мозку завтовшки 150 мкм. Зрізи інкубували протягом ночі з первинними козячими анти-GFP антитілами (1 : 500, Novus Biologicals, США) при 4 °С. Потім тканину інкубували з біотинілізованими кролячими анти-козячими вторинними антитілами (1 : 200, DakoCytomation, США) при кімнатній температурі протягом 2 год. Для візуалізації вторинних антитіл використовували зв'язаний біотинпероксидазний комплекс (ABC) (Vector Laboratories, США) з подальшою інкубацією з 3,3'-діамінобензидином тетрахлоридом (DAB) і 0,015 % перекисом водню. Після DAB реакції зрізи дофіксували в 1 % розчині осмію (Sigma-Aldrich, США) на 0,1 М фосфатному буфері, у висхідних концентраціях спирту, а потім поміщали в епоксидну смолу Епон. Ультратонкі зрізи виготовляли за допомогою алмазного ножа і контрастували цитратом свинцю та уранілацетатом. Для ідентифікації GFP/DAB-мічених клітин і синаптичних контактів зрізи досліджували на електронному мікроскопі JEOL 100-CX (JEOL, Японія). На електронограмах синапсами вважали структури, які мали як мінімум 2—3 синаптичні везикули в пресинаптичній терміналі, постсинаптичну щільність у постсинапсі та синаптичну щілину між ними.

Результати та обговорення

Перед трансплантацією аналізували життєздатність свіжоізольованих НПК та підраховували кількість GFP-позитивних клітин у цій популяції. Частка життєздатних свіжоізольованих НПК після виділення з гіпокампа і очищення становила від 89,8 до 93,5 %. Вміст GFP-позитивних клітин серед життєздатних у цій фракції — від 97,5 до 99,5 % (рис. 1).

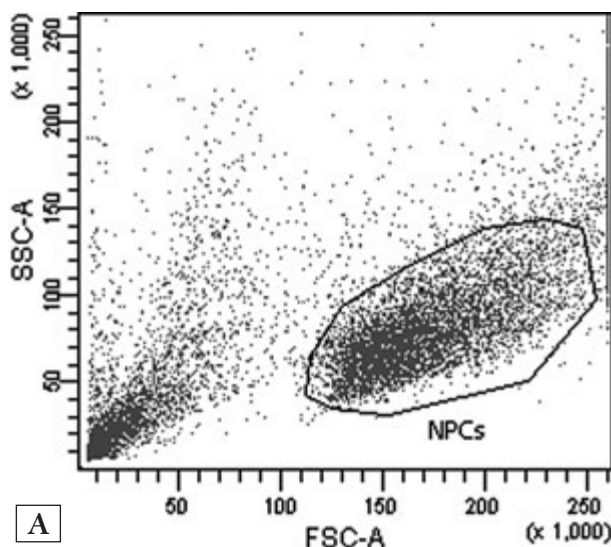
Імуногістохімічне дослідження з використанням антитіл проти GFP показало, що на 90-ту добу після стереотаксичної трансплантації у гіпокамп GFP-позитивні клітини диференціювалися в клітини з нейронною (рис. 2А) та гліальною (GFAP-позитивні) (рис. 2Б, В) морфологією.

GFP-позитивні нейрони мали добре розгалужене дендритне дерево (див. рис. 2А). На дендритах виявлялися чітко виражені шипики (див. рис. 2А, вставка), що може свідчити про утворення синаптичних контактів між трансплантованими клітинами та нейронами гіпокампа реципієнта.

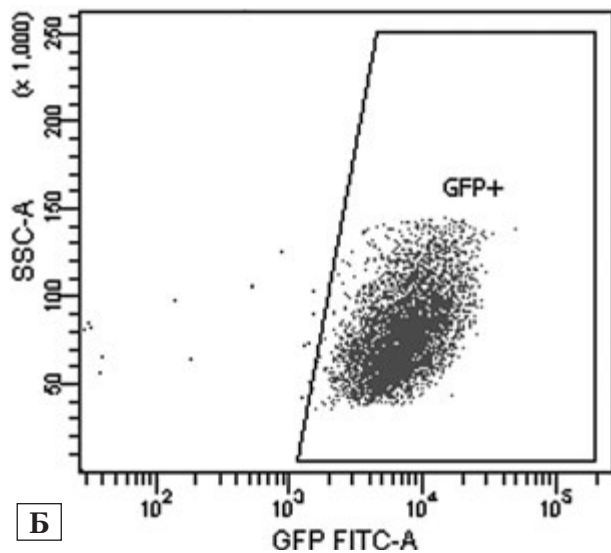
Для підтвердження наявності синаптичних контактів між трансплантованими GFP-позитивними клітинами та нейронами реципієнта проведено імуногістохімічний аналіз зрізів гіпокампа за допомогою електронного мікроскопа. GFP-позитивні донорські клітини легко було візуалізувати на електронограмах через інтенсивно-чорне електронно-

щільне забарвлення цитоплазми і відростків унаслідок діамінобензидинової (DAB) реакції (рис. 3).

Ультраструктурне дослідження підтвердило, що GFP/DAB-позитивні пре- та постсинаптичні структури утворювали контакти із GFP-негативними синапсами (див. рис. 3).



А



Б

Tube: NPCs GFP

Population	#Events	%Parent
All Events	10,000	100.0
NPCs	5,092	50.9
GFP+	5,066	99.5

В

Рис. 1. Визначення за допомогою лазерного цитофлуориметра-сортера FACSAria кількості GFP-позитивних клітин у суспензії: А — відбір популяції непошкоджених клітин; Б — виявлення GFP-позитивних живих клітин на каналі флуоресценції FITC; В — абсолютна та відносна кількість проаналізованих клітин за ієрархією аналізу

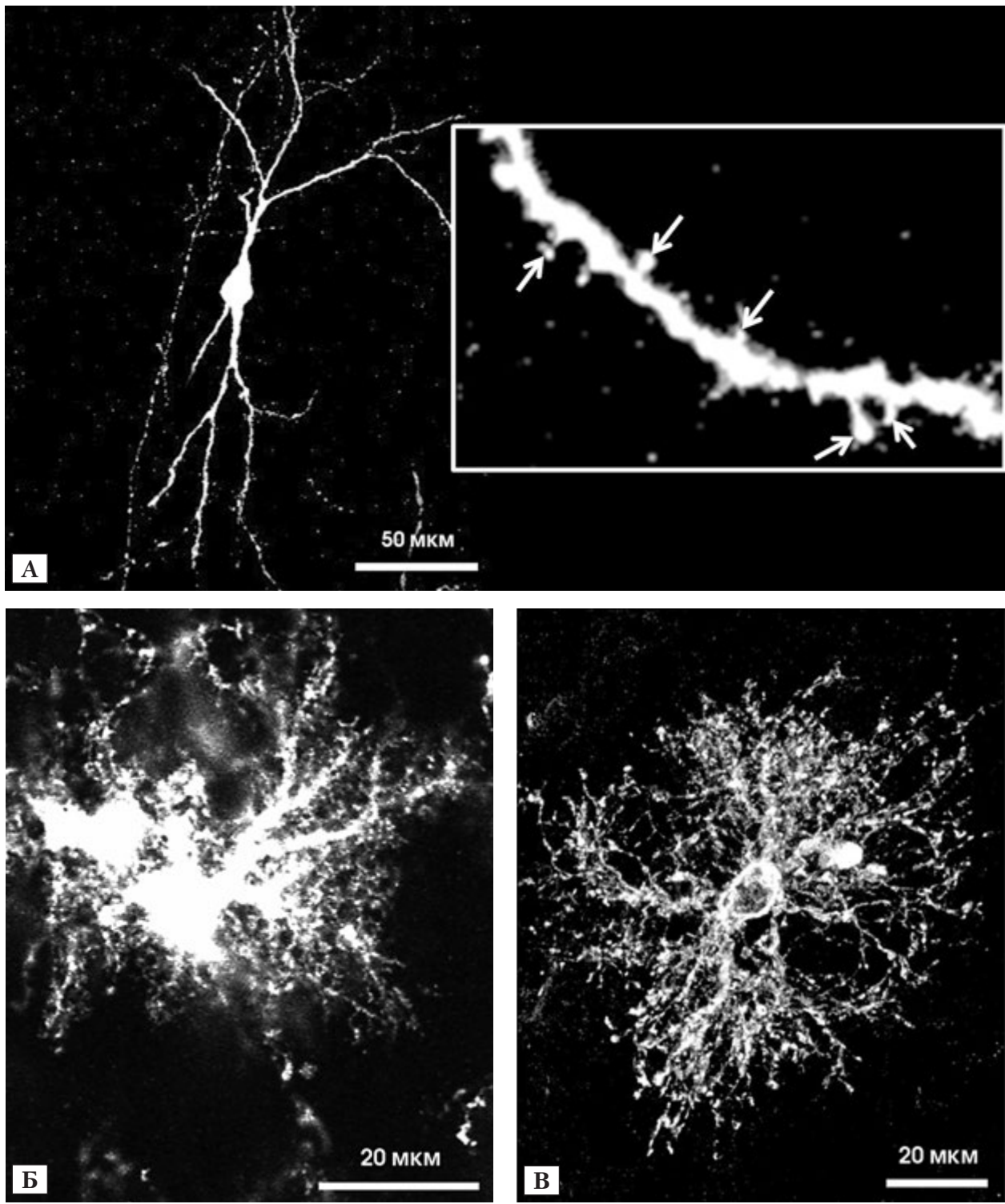


Рис. 2. Конфокальні зображення GFP-позитивних трансплантованих клітин в СА1 зоні гіпокампа на 90-ту добу після трансплантації: А — GFP-позитивна клітина, яка має морфологічні особливості нейрона. У вставці показано дендритний відросток із шипиками (позначено стрілками) при збільшенні; Б — GFP-позитивна клітина, яка за морфологічними ознаками подібна до астроциту; В — GFP-позитивна клітина з морфологічними характеристиками олігодендроциту.

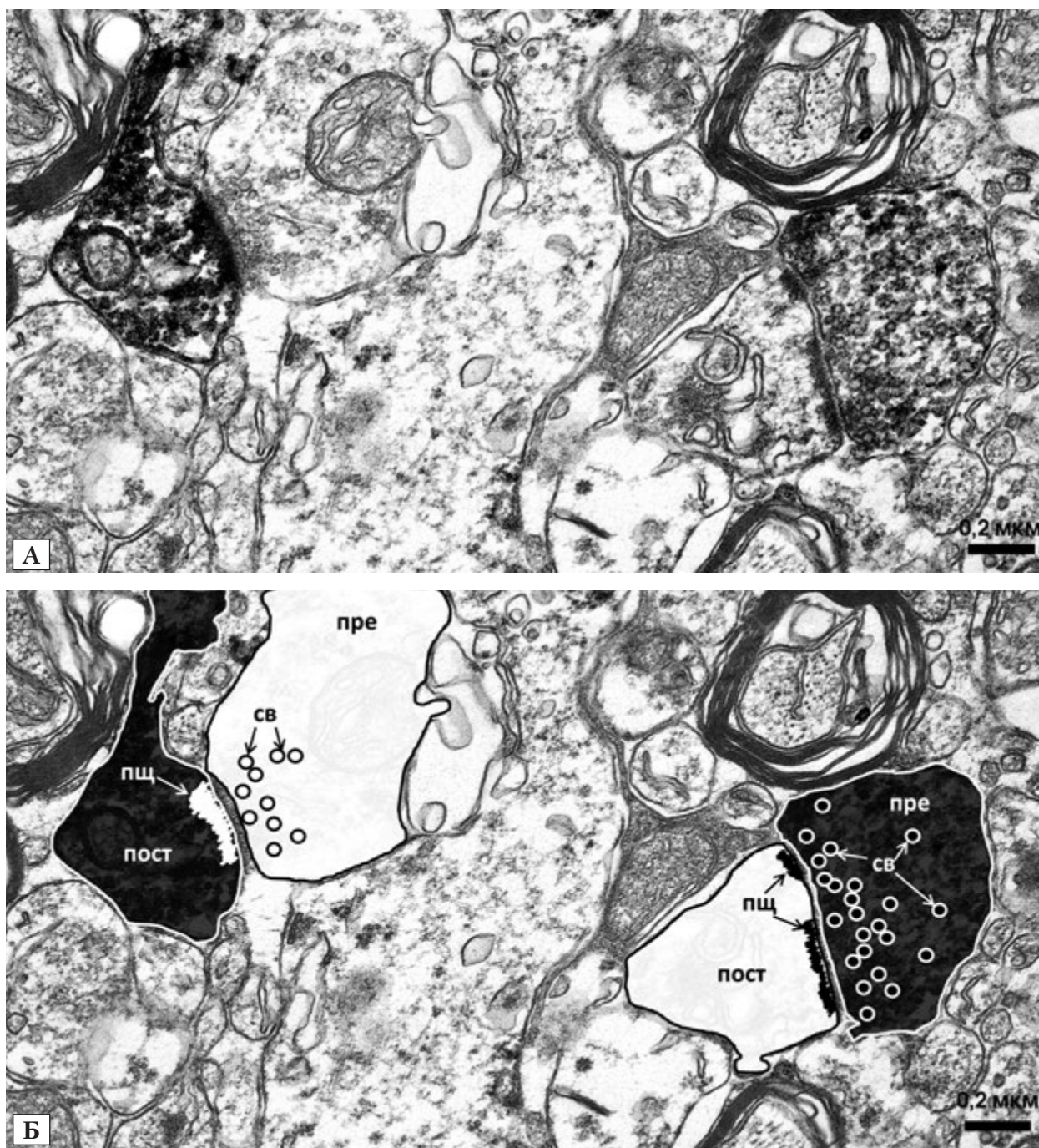


Рис. 3. Електронно-мікроскопічні зображення GFP/DAB-позитивних синаптичних контактів: А — два GFP/DAB-позитивні синаптичні контакти. Зліва — простий синапс із безперервною постсинаптичною щільністю у GFP/DAB-позитивній постсинаптичній структурі, яка контактує з GFP-негативною пресинаптичною терміналю (ПРЕ). Справа — перфорований синапс з чітким перериванням постсинаптичної щільності (позначено стрілками) у GFP/DAB-негативній постсинаптичній структурі, яка контактує з GFP-позитивною пресинаптичною терміналю; Б — схематичне зображення електроннограми (А). Чорним кольором позначені GFP/DAB-позитивні структури, білим — GFP/DAB-негативні. ПРЕ — пресинаптична терміналь; ПОСТ — постсинаптична структура; ПЩ — постсинаптична щільність; СВ — синаптичні везикули

Для визначення синаптичних контактів використовували такі критерії: наявність синаптичних везикул у пресинапсі, синаптичної щільності та постсинаптичної щільності (ПЩ) (див. рис. 3Б). Ультраструктурні характеристики синаптичних контактів, утворених донорськими клітинами, не відрізнялися від синапсів у гіпокампі реципієнта. Спостерігали різні типи синаптичних контактів: прості, з безперервною ПЩ (див. рис. 3, лівий синапс) і перфоровані з переривчастою ПЩ (див. рис. 3, правий синапс).

Таким чином, імуногістохімічне фарбування на електронно-мікроскопічному рівні із використанням антитіл проти GFP дає змогу не лише ідентифікувати GFP-позитивні трансплантовані клітини у тканині реципієнта, а й в деяких випадках проаналізувати потенційне диференціювання конкретної донорської клітини, уникаючи подвійного чи потрійного імуногістохімічного фарбування.

Крім того, електронна мікроскопія дає змогу аналізувати взаємодію GFP-позитивних донорських клітин із клітинами реципієнта або інші морфологічні аспекти, які складно виявляти за допо-

могою конфокальної мікроскопії. Як показано в нашій роботі, електронна мікроскопія дає змогу дослідити утворення синаптичних контактів між трансплантованими GFP-позитивними клітинами та нейронами реципієнта, а також аналізувати ультраструктурні характеристики таких контактів.

Отже, результати електронно-мікроскопічного аналізу свідчать про те, що GFP — це зручний маркер для мічення донорських GFP-позитивних клітин, який дає змогу візуалізувати їх не лише на світловому рівні, а й на електронно-мікроскопічному із збереженням ультраструктурних характеристик трансплантованих клітин.

Висновки

GFP — це надійний нетоксичний маркер, який дає змогу ідентифікувати донорські клітини навіть у віддалені (до 90 діб) строки після трансплантації. Імуногістохімічне фарбування зрізів мозку із використанням антитіл проти GFP дає змогу візуалізувати донорські GFP-позитивні клітини як на світловому, так і на електронно-мікроскопічному рівні.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція та дизайн дослідження, інтерпретація отриманих результатів — О. Ц.;

збір та опрацювання матеріалу — О. Ц., В. К., К. Я.; написання тексту — О. Ц., В. К.; редагування — Г. Б., Г. С.

Література

1. Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays // *Oncogene*. — 2004. — Vol. 23(43). — P. 7210—7222.
2. Donahue R. E., Srinivasula S., Uchida N. et al. Discordance in lymphoid tissue recovery following stem cell transplantation in rhesus macaques: an in vivo imaging study // *Blood*. — 2015. — Vol. 126(24). — P. 2632—2641.
3. Ferreira L., Karp J. M., Nobre L. et al. New Opportunities: The use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells // *Cell. Stem Cell*. — 2008. — Vol. 3. — P. 136—146.
4. Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Gene*. — 1992. — Vol. 111. — P. 229—233.
5. Sanders J. K., Jackson S. E. The discovery and development of the green fluorescent protein, GFP // *Chem. Soc. Rev.* — 2009. — Vol. 38(10). — P. 2821—2822. doi: 10.1039/b917331p.
6. Schneider A. F., Hackenberger C. P. Fluorescent labelling in living cells // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2017. — Vol. 7(48). — P. 61—68.
7. Skuk D., Tremblay J. P. First study of intra-arterial delivery of myogenic mononuclear cells to skeletal muscles in primates // *Cell Transplant.* — 2014. — Vol. 23(Suppl. 1). — S141—150.
8. Wang Y., Xu C., Ow H. Commercial nanoparticles for stem cell labeling and tracking // *Theranostics*. — 2013. — Vol. 3. — P. 544—560. doi: 10.7150/thno.5634.
9. Xu C., Mu L., Roes I. et al. Nanoparticle-based monitoring of cell therapy // *Nanotechnology*. — 2011. — Vol. 22(49). — P. 494001. doi: 10.1088/0957-4484/22/49/494001.
10. Yan F., Yue W., Zhang Y. L. et al. Chitosan-collagen porous scaffold and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for ischemic stroke // *Neural. Regen. Res.* — 2015. — Vol. 10(9). — P. 1421—1426. doi: 10.4103/1673-5374.163466.
11. Yu J., Hao G., Wang D. et al. Therapeutic effect and location of GFP-labeled placental mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in rats // *Stem Cells Int.* — 2017. — Vol. 2017. — P. 1798260.

О. М. ЦУПИКОВ^{1,2}, В. М. КИРИК², Е. В. ЯЦЕНКО¹, Г. М. БУТЕНКО², Г. Г. СКИБО^{1,2}

¹ Інститут фізіології імені А. А. Богомольця НАН України, Київ

² ГУ «Інститут генетическої і регенеративної медицини НАМН України», Київ

Эффективность использования зеленого флуоресцентного белка как маркера для идентификации трансплантированных нейральных прогениторных клеток в нервной ткани мышей

Цель — оценить эффективность использования зеленого флуоресцентного белка (GFP) как маркера донорских клеток в тканях реципиента в отдаленные сроки после трансплантации.

Матеріали і методи. Експериментальним животним трансплантировали нейральні прогениторні клітки, які були виділені з гіпокампу мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних по гену GFP. Через 90 днів після трансплантації GFP-позитивних нейральних прогениторних кліток був проведений імуногістохімічний аналіз срезів мозку з використанням антител проти GFP з допомогою світлового і електронного мікроскопа.

Результати. Імуногістохімічне дослідження з використанням антител проти GFP показало, що на 90-і сутки після стереотаксическої трансплантації в гіпокамп GFP-позитивні клітки диференціувалися в клітки з нейронної і гліальної морфологією. Ультраструктурний аналіз виявив, що трансплантіровані GFP-позитивні клітки утворили синаптичні контакти між донорськими клітками і нейронами реципієнта на 90-і сутки після трансплантації.

Висновки. Результати дослідження свідчать про те, що GFP — це надійний нетоксичний маркер, що дозволяє ідентифікувати донорські клітки навіть в віддалені (до 90 суток) терміни після трансплантації. Імуногістохімічне окрашування срезів мозку з використанням антител проти GFP дозволяє візуалізувати донорські GFP-позитивні клітки при допомозі як світлового, так і електронного мікроскопа.

Ключові слова: зелений флуоресцентний білок, нейральні прогениторні клітки, трансплантація.

O. M. TSUPYKOV^{1,2}, V. M. KYRYK², K. V. YATSENKO¹, G. M. BUTENKO², G. G. SKIBO^{1,2}

¹Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine, Kyiv

The efficiency of using green fluorescent protein as a marker for the identification of transplanted neural progenitor cells in mice nervous tissue

Objective — to evaluate the efficiency of green fluorescent protein (GFP) usage as a marker of donor cells in the recipient's tissues in the long term after transplantation.

Methods and subjects. Neural progenitor cells (NPCs) isolated from the hippocampus of the FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J mice transgenic by the GFP gene were transplanted stereotactically into hippocampus of the experimental animals. 90 days after GFP-positive NPC transplantation, an immunohistochemical analysis of brain sections at the light and electron microscopic levels using antibodies against GFP was performed.

Results. An immunohistochemical study using antibodies against GFP showed that at the 90th day after transplantation in the hippocampus, GFP-positive cells were differentiated into the cells with neuronal and glial morphology. The ultrastructural analysis showed that transplanted GFP-positive cells formed synaptic contacts between donor cells and recipient's neurons at 90 days after transplantation.

Conclusions. The results of the study indicate that GFP is a reliable non-toxic marker that allows to identify donor cells even in the late (up to 90 days) post-grafting period. Immunohistochemical staining of brain sections using antibodies against GFP allows to visualize donor GFP-positive cells at both light and electron microscopic levels.

Key words: green fluorescent protein, neural progenitor cells, transplantation.