

УДК 615.361+612.356:616-089.811



Кирик В. М.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

e-mail: biomedpost@gmail.com

МІГРАЦІЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ *Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺* ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН В РАННІ СТРОКИ ПІСЛЯ ІШЕМІЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ ГІПОКАМПА У МИШЕЙ

РЕЗЮМЕ

Вивчення міграційного та диференціального потенціалу різних типів стовбурових клітин залишається актуальним завданням для клітинної біології та регенеративної медицини. **МЕТОЮ** дослідження стала оцінка здатності трансплантованих гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) фетальної печінки мишей мігрувати в зону ішемічного пошкодження гіпокампа при субоципітальному інтравентрикулярному введенні та оцінка можливості їх диференціювання за нейральним шляхом в ранні строки після трансплантації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Мишам лінії *FVB-wt* моделювали ішемічне пошкодження гіпокампа та через 24 год. субоципітально трансплантували ГСК фетальної печінки плодів мишей лінії *FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J* (трансгенні по *GFP*). Сортивання фракції *Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺* ГСК проводили методом проточної цитометрії. Через 7 та 14 дб проводили імуногістохімічне дослідження зрізів головного мозку на експресію маркерів *GFP*, *NeuN* та *GFAP*.

РЕЗУЛЬТАТИ. Встановлено, що на 7-му добу після трансплантації введені клітини проникали на глибину до 100 мкм від стінки 3-го шлуночка, а на 14-ту добу поодинокі трансплантовані клітини локалізувались в ішемізованій *CA1* зоні гіпокампа. Введені клітини мали округлу форму і не експресували маркери *NeuN* та *GFAP*. У піддослідних тварин в *CA1* зоні гіпокампа зберігались ознаки реактивного астрогліозу та загибель нейронів, аналогічні показникам контрольної групи.

ВИСНОВКИ. Трансплантовані *Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺* ГСК фетальної печінки мишей здатні виживати та мігрувати в зону ішемічного пошкодження гіпокампа, але можливість їх диференціювання за нейрональним або астроцитарним типом в строк до 14 дб не підтверджена.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемопоетичні стовбурові клітини; фетальна печінка; ішемічне пошкодження гіпокампа

Питання міграційного потенціалу та пластичності різних типів стовбурових клітин продовжують викликати значний інтерес у дослідників в аспекті покращення регенераторних властивостей клітинних та тканинних трансплантатів [1]. В першу чергу, дослідження в цій області стосувались області трансплантації кісткового мозку, яка вже тривалий час застосовується в клініці [2, 3]. Можливість міграції клітин гемопоетичного ряду між нішами та їх трансдиференціювання в клітини похідні інших зародкових листків залишаються предметом постійних дискусій науковців.

Особливе зацікавлення викликають механізми залучення гемопоетичних стовбурових клітин в репарацію пошкоджень нервової

тканини. В експериментах на тваринах та за результатами ретроспективного аналізу деяких клінічних досліджень у реципієнтів кісткового мозку була продемонстрована не лише присутність донорських клітин в ділянках пошкодження головного мозку, а й експресія ними ряду маркерів, характерних для нейронів та нейроглії [4-8]. В цих роботах висловлюється припущення, що трансплантовані клітини потрапляють з кровотоком до ішемізованих ділянок і диференціюються там за нейральним типом. Проте є й дослідження з протилежними результатами, які ставлять під сумнів такі висновки, а можливість фузії донорських клітин з клітинами реципієнта теж залишається актуальною [9].

Тому при аналізі представлених авторами даних необхідно враховувати багато факторів, в тому числі джерело, методи отримання, підготовки та способів введення клітинного трансплантату. Зокрема, від джерела стовбурових клітин може залежати ступінь їх зрілості та, відповідно, потенціал міграції та диференціювання. Присутність серед трансплантованих мононуклеарних клітин кісткового мозку фракції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин не дозволяє достовірно говорити про здатність до трансдиференціювання власне гемопоетичних клітин.

Для характеристики гемопоетичних стовбурових клітин у мишей прийнято ряд імунофенотипічних ознак, що дозволяють ідентифікувати популяцію так званих LSK-клітин, які експресують антиген стовбурових клітин Sca-1 та рецептор фактора росту стовбурових клітин c-kit, не експресуючи при цьому маркери лінійності *Lin* (*CD45R/220*, *CD3*, *CD11b*, *TER-119*, *Ly6C/G*) [10]. Трансплантація сортованих *Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺* клітин дозволяє оцінити в експерименті міграційний та диференціальний потенціал саме стовбурових клітин гемопоетичного ряду.

Метою дослідження була оцінка здатності гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки мишей до міграції в зону ішемічного пошкодження гіпокампа при субокципітальному інтравенотрикулярному введенні та оцінка можливості їх диференціювання за нейральним шляхом в ранні строки після трансплантації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проведено на самцях мишей лінії *FVB-wt* («дикий» тип) віком 3 міс. та *FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J* (трансгенні по гену зеленого флуоресцентного білка – *GFP*) з розплідника ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», які отримували стандартний раціон харчування та мали вільний доступ до води. Всі роботи з експериментальними тваринами проводились з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.), «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (*Страсбург*, 1986 р.), а також з дотриманням усіх принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Джерелом фетальних ГСК була печінка плодів мишей лінії *FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J* 12,5 дня гестаційного періоду. Вагітні самки підлягали евтаназії методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. В стерильних умовах виділяли плоди з матки та препарували фетальну печінку, яку подрібнювали в середовищі *RPMI-1640* (*Sigma*, США) шляхом пропускання через голки зменшеного діаметру. Фракцію мононуклеарних клітин, що містить ГСК, виділяли шляхом центрифугування протягом 15 хв при 380 г та температурі +4 °C на градієнт щільності *Ficoll-Paque* (*Sigma*, США) з питомою щільністю 1,077 г/см³ та відмивали в поживному середовищі *RPMI-1640*. Субпопуляцію *Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺* клітин виділяли методом проточної цитометрії з використанням лінійної панелі *Lineage Panel* з 5 моноклональних антитіл (*CD3e*, *CD11b*, *CD45R/B220*, *Gr1*, *Ly-76*), кон'югованих з *PerCP-Cy5.5*; *anti-Sca-1 (PE-Cy7)* та *anti-c-kit (APC-Cy7)* антитіл (усі – *Becton Dickinson*, США). Для сортування мононуклеарні клітин доводили до концентрації 2·10⁷ клітин/мл, додавали антитіла в робочій концентрації 0,5 мкг на 10⁶ клітин та інкубували протягом 30 хвилин при температурі +4 °C. Після двократного відмивання в середовищі *RPMI-1640* суспензію пропускали через клітинні фільтри з діаметром пор 70 мкм і доводили до концентрації 5·10⁶ клітин/мл. Сортування популяції *LSK* клітин проводили в асептичних умовах на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері *BD FACSAria* (*Becton Dickinson*, США) за допомогою програмного забезпечення *FACS Diva 6.1.2*. Відносний вміст життєздатних клітин, який визначали за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину (*7-AAD*), після сортування становив 88,5 ± 3,8%.

Ішемічний інсульт у мишей лінії *FVB wt* (n = 4) моделювали шляхом 20-хвилинної оклюзії обох загальних сонних артерій. Для операції та трансплантації клітин мишей вводили в наркоз за допомогою інтраперитонеального введення каліпсола (75 мг/кг) та ксилазину (2 мг/кг). Через 24 години після моделювання ішемії гіпокампа тваринам трансплантували субокципітально в 3-й шлуночок головного мозку 2·10⁵ виділених ГСК в 20 мкл середовища *DMEM+F12* (*Sigma*, США). Контрольні групи складали тварини із змодельованим ішемічним пошкодженням головного мозку, яким вводили лише 20 мкл середовища *DMEM+F12* (n = 2), та псевдооперовані тварини (n = 2).

Імуногістохімічне дослідження головного мозку проводили у відділі цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Через 7 або 14 діб після трансплантації мишей наркотизували інтраперитонеально (75 мг/кг каліпсола) та інгаляційно парами ефіру. Фіксацію тканини мозку виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації 4% розчином параформальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4) протягом 20 хвилин. Мишей декапітували, мозок препарували та фіксували у 4% розчині параформальдегіду протягом 12 годин при +4 °C. За допомогою вібротому *Vibroslice 752M* (*Campden Instruments Ltd*, Великобританія) готували фронтальні зрізи завтовшки 50 мкм, які інкубували у суміші первинних антитіл протягом 48 годин при +4 °C: кролячі *anti-GFAP* антитіла (титр 1:1500) (*DAKO*, Данія) + мишачі *anti-NeuN* (титр 1:1000) (*Chemicon*, США), або *anti-NeuN* (титр 1:1000) (*Chemicon*, США) + козячі *anti-GFP* (титр 1:5000) (*Novus biologicals*, США). Після відмивання від первинних антитіл зрізи інкубували з вторинними *anti-rabbit* антитілами (для *GFAP*, кон'югованими з *Alexa Fluor 594* або *Alexa Fluor 350* (титр 1:1000) (*Molecular Probes Inc.*, США) або *anti-goat* (для *GFP*) антитілами, кон'югованими з *Alexa Fluor 488* (титр 1:1000) (*Molecular Probes Inc.*, США), у розчині 0,1 М фосфатного буферу. Зрізи переносили на предметні скельця та покривали бальзамом *Vectashield Mount Medium* (*Vector*, США). Аналіз гістологічних препаратів проводили на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі *FV 1000-BX61 Wi* (*Olympus*, Японія).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після зовнішньої 20-хвилинної оклюзії сонних артерій у піддослідних мишей розвивався ішемічний інсульт, при якому максимальні зміни спостерігались в *CA1* зоні гіпокампа. На 8-му добу після моделювання у тварин контрольної групи без трансплантації клітин характерною ознакою ішемії гіпокампа було зменшення кількості пірамідних нейронів до 70% з їх дегенерацією, а також реактивний астрогліоз.

На 7-му добу після трансплантації в групі тварин, яким вводили ГСК фетальної печінки, донорські клітини були виявлені біля місця введення в стінках 3-го шлуночка мозку (рис. 1). Клітини знаходились в тканині мозку на глибині до 10 мкм та зберігали округлу форму.

В окремих препаратах виявлено групи клітин, які перебували на різній глибині до 100 мкм від стінки шлуночка, що може свідчити про активний процес міграції трансплантованих клітин в тканині мозку в напрямку ішемізованої ділянки, досягаючи зони пошкодження гіпокампа (рис. 2).

На 14-ту добу поодинокі трансплантовані клітини були виявлені в зоні *CA1* гіпокампа на відстані до 500 мкм від стінки шлуночка, зберігаючи округлу форму без морфологічних ознак диференціювання. В усіх інших досліджених анатомічних структурах мозку донорських клітин у вказані строки виявлено не було (дані не представлено).

При цьому як на 7-му, так і на 14-ту добу після трансплантації клітин (8-ма та 15-та доба після моделювання ішемічного пошкодження головного мозку відповідно) у тварин дослідної групи в зоні *CA1* гіпокампа зберігались ознаки реактивного астрогліозу та загибель нейронів, аналогічні показникам контрольної групи.

При імуногістохімічному дослідженні трансплантовані клітини на 7-му та 14-ту добу після трансплантації не експресували маркер нейронів *NeuN* та маркер астроцитів *GFAP*, що підтверджує та доповнює дані інших авторів. Зокрема, *Massengale M.* та ін. (2005) продемонстрували, що трансплантовані гемопоетичні клітини експресували в пошкодженому мозку лише маркери мікроглії *Iba1* та *Mac1* [11]. *Roybon L.* та ін. (2006) при стереотаксичній трансплантації мічених *LSK* клітин в смугасте тіло та мозочок не виявили експресії ними маркерів *NeuN* та *calbindin* (специфічний для клітин Пуркінє), і навіть *Iba1* [12]. *Wehner T.* та ін. також встановили, що клітини кісткового мозку, трансплантовані мишам з фокальною ішемією головного мозку, не диференціюються в астроцити [13].

Хоча в нашому дослідженні не було виявлено ознак покращення морфологічної картини ішемізованих ділянок гіпокампа, а також змін морфології та фенотипу донорських клітин, факт міграції трансплантованих гемопоетичних клітин з порожнини шлуночків в ділянку ішемічного пошкодження головного мозку підтверджує припущення багатьох дослідників, що донорські стовбурові клітини різних типів, в тому числі і гемопоетичні, здатні відповідати на сигнали ішемізованих тканин та активно мігрувати в зону пошкодження [14, 15].

ВИСНОВКИ

ПРОДЕМОНСТРОВАНО ЗДАТНІСТЬ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З ФЕНОТИПОМ *Lin-Sca-1⁺c-kit⁺*, ОТРИМАНИХ З ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ МИШЕЙ, ВИЖИВАТИ ТА МІГРУВАТИ З ПОРОЖНИНИ ШЛУНОЧКІВ В ОСЕРЕДОК ІШЕМІЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ ГІПОКАМПА *IN VIVO*, ЩО МОЖЕ СВІДЧИТИ ПРО АКТИВНИЙ ХОУМІНГ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ВІДПОВІДЬ НА СИГНАЛИ ПОШКОДЖЕННЯ ТКАНИН, ЯКІ ВІДРІЗНЯЮТЬСЯ ЗА ПОХОДЖЕННЯМ В ОНТОГЕНЕЗІ. В СТРОК 14 ДІБ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МОРФОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ОЗНАК ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ВВЕДЕНИХ КЛІТИН В НЕЙРОНИ АБО АСТРОЦИТИ НЕ ВИЯВЛЕНО.

ПОДЯКА

Висловлюю подяку співробітникам відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця в особі Г. Г. Скибо та О. М. Цупікова за допомогу при проведенні досліджень.

Рис. 1. Фронтальний зріз на рівні 3-го шлуночка головного мозку миші через 7 дів після трансплантації ГСК фетальної печінки, конфокальна мікроскопія. Трансплантовані ГСК мічені *anti-GFP* антитілами (зелений колір), астроцити – *anti-GFAP-Alexa594* (червоний колір), x200.

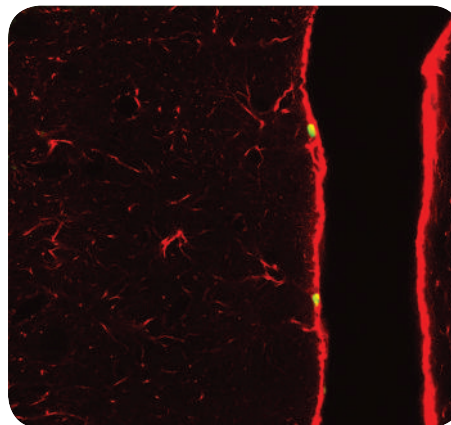
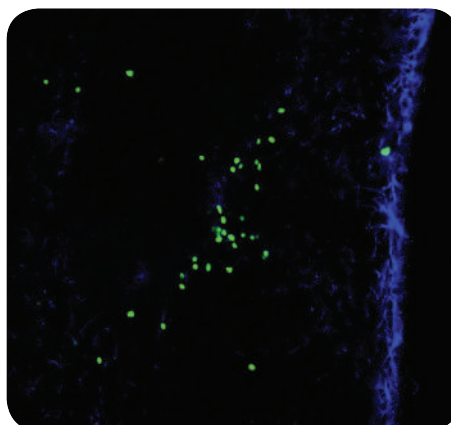


Рис. 2. Фронтальний зріз на рівні 3-го шлуночка головного мозку миші через 7 дів після трансплантації ГСК фетальної печінки, конфокальна мікроскопія. Трансплантовані ГСК мічені *anti-GFP* антитілами (зелений колір), астроцити – *anti-GFAP-Alexa 350* (синій колір), x200.



ЛІТЕРАТУРА

1. *Mazo I.* Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking [Text] / *I. Mazo, S. Massberg, von U. Andrian* // Trends in Immunology. – 2011. – Vol. 32, № 10. – P. 493–503.
2. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration [Text] / *C. Jopling, S. Boue, J. C. Izpisua Belmonte* // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2011. – Vol. 12. – P. 79–89.
3. Evidence for Bone Marrow Adult Stem Cell Plasticity: Properties, Molecular Mechanisms, Negative Aspects, and Clinical Applications of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transdifferentiation [Text] / *I. Catacchio, S. Berardi, A. Reale, et al.* // Stem Cells Int. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 589139. – 11 p.
4. *Eglitis M.* Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice [Text] / *M. Eglitis, E. Mezey* // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 4080–4085.
5. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow [Text] / *E. Mezey, K. Chandross, G. Harta, et al.* // Science. – 2000. – Vol. 290. – P. 1779–1782.
6. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice [Text] / *T. Brazelton, F. Rossi, G. Keshet, H. Blau* // Science. – 2000. – Vol. 290. – P. 1775–1779.
7. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains [Text] / *E. Mezey, S. Key, G. Vogelsang, et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 1364–1369.
8. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study [Text] / *C. Cogle, A. Yachnis, E. Laywell, et al.* // Lancet. – 2004. – Vol. 363. – P. 1432–1437.

9. Failure of bone marrow cells transdifferentiate into neural cells in vivo [Text] / *R. Castro, K. Jackson, M. Goodell, et al.* // Science. – 2002. – **Vol. 297**, № 5585. – P. 1299.
10. Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice [Text] / *J. Chen, F. Ellisona, K. Keyvanfara, et al.* // Exp. Hematol. – 2008. – **Vol. 36**. – P. 1236-1243.
11. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain [Text] / *M. Massengale, A. Wagers, H. Vogel, et al.* // J Exp Med. – 2005. – **Vol. 201**. – P. 1579–1589.
12. Failure of Transdifferentiation of Adult Hematopoietic Stem Cells into Neurons [Text] / *L. Roybon, Z. Ma, F. Asztely, et al.* // Stem Cells. – 2006. – **Vol. 24**. – P. 1594–1604.
13. Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo [Text] / *T. Wehner, M. Bontert, I. Eyupoglu, et al.* // J Neurosci. – 2003. – **Vol. 23**. – P. 5004–5011.
14. *Kaplan R.* Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells [Text] / *R. Kaplan, B. Psaila, D. Lyden* // Trends Mol Med. – 2007. – **Vol. 13**, № 2. – P. 72-81.
15. *Magnon C., Lucas D., Frenette P.* Trafficking of Stem Cells [Text] / *C. Magnon, D. Lucas, P. Frenette* // Methods Mol Biol. – 2011. – **Vol. 750**. – P. 3-24.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автор підтверджує відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 12.08.2014 р.

Прийнята до друку 17.10.2014 р.