

Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга

Н.В. Касинская, О.И. Степанова, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Х.Х.Семенов, Т.Б. Бескова, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, С.Е. Деньгина

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна olsima50@mail.ru

Изучено морфологическими методами выявление донорского маркера гена зеленого белка у мышей-реципиентов больных сахарным диабетом 2 типа и подтверждено путем проведения полимеразной цепной реакции наличие гена зеленого белка на длительных сроках в организме животных.

Ключевые слова: мыши В.10GFP, идентификационная метка, клетки костного мозга.

Результаты современного состояния проблемы введения и выявления идентификационной метки показывают, что эти процессы достаточно трудоемки и дороги, однако при использовании донорских клеток костного мозга, содержащих ген зеленого белка от мышей линии В.10GFP и созданных нами праймеров для полимеразной цепной реакции от данных мышей, упростили и более точно решили эти проблемы.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности выявления донорских клеток костного мозга, содержащих метку гена зеленого белка, после их трансплантации мышам-реципиентам с генетической моделью СД 2 типа на длительных сроках.

Материалы и методы

Данное исследование проводилось на базе НЦБМТ РАМН. В эксперименте были задействованы здоровые трансгенные мыши линии В.10GFP, обоих полов, в возрасте 3 месяцев, использовавшиеся в качестве доноров клеток костного мозга (ККМ). Реципиентами ККМ являлись гомозиготные по гену диабе-

та мыши линии C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db), обоих полов, аналогичного возраста. Для осуществления аллогенной трансплантации стволовых клеток использовали гемопоэтическую фракцию костного мозга. Способ введения ККМ — внутривенный.

Реципиентам — мышам db/db проводили двукратное введение аллогенных гемопоэтических клеток костного мозга (ГПККМ) по 8-9 млн. (всего 16-18 млн. клеток) с интервалом в 7 дней; клетки были предварительно культивированы 5-7 суток; общий срок наблюдения составил 60, 120 и 224 суток.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах. Время гибели животных — 30-40 минут. Жизнеспособность клеток гемопоэтической фракции ККМ исследовалась с помощью их окрашивания трипановым синим.

Забор клеток костного мозга у мышей-доноров осуществлялся под наркозом, в качестве которого был использован диэтиловый эфир. Соблюдая стерильность, у доноров иссекали кости

предплечья, плеча, голени и бедра (вместе с суставами), отделяя их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы, и с помощью шприцев (объемами 1 и 2 мл) вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала. Суспензию клеток центрифугировали в течение 5 минут при 1500 об./мин.; осадок клеток ресуспендировали в лизирующем растворе (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:1, при комнатной температуре (22°C), в течение 1 мин., а затем центрифугировали 5 мин. при 1500 об./мин., добиваясь полного лизиса эритроцитов. Гемолизированный супернатант полностью удаляли отсасыванием с помощью водоструйного насоса, а клеточный осадок, содержащий мононуклеарные клетки (МНК) и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ), ресуспендировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко), с добавлением 25мМ NEPER, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Через 5-7 суток отбирали не прикрепившиеся к пластику клетки, которые затем использовали в опытах на животных как очищенную от стромальных (пластикадгезивных) клеток мононуклеарную фракцию гемопоэтических клеток. Полученная культура МНК была готова для трансплантации.

Криосрезы внутренних органов делали на криостате (для быстрого замораживания образцов тканей) фирмы «LEICA» (Германия) при температуре -18-24°C, толщина срезов составляла 5-6 микрон. Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию клеточного материала от доноров и криосрезы внутренних органов реципиентов проводили

на микроскопе фирмы «NIKON» (Япония). Флуоресцентную микроскопию проводили с использованием ультрафиолетового излучения с длиной волны 390 нм. Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат фирмы «OLYMPUS» (Япония).

Наличие гена, продуцирующего белок с зеленой флуоресценцией (GFP-green fluorescent protein) и содержащегося в ядрах клеток доноров, по присутствию которого можно идентифицировать клетки — как в культуре, так и после трансплантации во внутренних органах реципиентов (мышей db/db), выявляемые в криопрепаратах с помощью люминесцентной микроскопии — было подтверждено проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс выявления проводился в три этапа:

1. Выделение ДНК из пробы печени доноров и реципиентов (мышей db/db) при помощи набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Компания Биокон», Россия), по инструкции фирмы-производителя.

2. Амплификация геномной ДНК. Проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

3. Идентификация ПЦР-продуктов методом горизонтального электрофореза. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США).

Содержание реакционной смеси (объем — 25 мкл):

- 1,0 мкл геномной ДНК;
- 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы;
- 2,5 мкл 10x буфера;
- 2,5 мкл 25 mM хлорида магния;
- 0,5 мкл 10 mM dNTP;
- 0,5 мкл 10 M primers

(первая пара —
5'-CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC T-3'
5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGA T-3'

вторая пара —
5'-CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC T-3'
5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGAT-3');
• 17,8 мкл воды.

Протокол амплификации
включал:

- 1 цикл: 94°C — 3 минуты;
- 2 цикл : 94°C — 15 секунд
62°C — 30 секунд
72°C — 30 секунд. 38 циклов
- 3 хранение 4°C.

Результаты и их обсуждение

Для выявления связи клинических, биохимических и морфологических изменений наступающих в организме мышей db/db с СД 2 типа после проведения клеточной терапии с распределением ККМ в организме и их жизнеспособностью — нами были проведены исследования с аллогенными донорскими ККМ — мышью В.10GFP при внутрибрюшинном введении их мышам db/db. ККМ выявляли в криопрепаратах разных органов на 60 и 120 сутки после введения с помощью люминесцентной микроскопии, т.к. введенные клетки содержат флуоресцирующий ген зеленого белка (390 нм). Наше исследование показало, что на 60 и 120 сутки после внутрибрюшинного введения введенные клетки достигают разных органов и не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность. Люминесцентная микроскопия по флуоресценции криосрезов разных органов позволила нам выявить донорские клетки в поджелудочной железе, селезенке, почках, печени (рис. 1, рис. 2) и связать возникающие в этих органах из-

менения (морфологические и функциональные) со стимуляцией в этих органах процессов адаптации и компенсации [2, 3, 6, 7, 8, 9, 10].

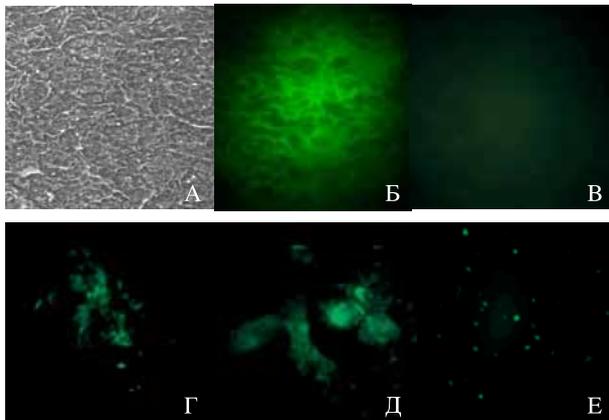


Рис. 1. Распределение донорских ККМ (мышь В.10GFP) в органах через 60 суток после внутрибрюшинного введения их реципиентам db/db. Увел. x 200

А — поджелудочная железа донора В.10GFP (с геном зеленого белка); фазово-контрастная микроскопия; Б — поджелудочная железа донора В.10GFP; люминесцентная микроскопия; В — поджелудочная железа реципиента db/db с СД 2 типа без введения ККМ, люминесцентная микроскопия; Г — поджелудочная железа реципиента после введения ККМ; Д — селезенка после введения ККМ; Е — почка после введения ККМ; люминесцентная микроскопия.

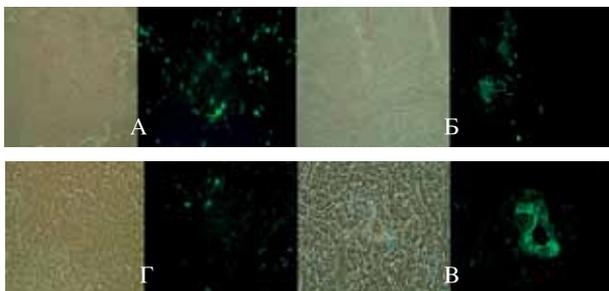


Рис. 2. Распределение донорских ККМ (мышь В.10GFP) в органах через 120 суток после внутрибрюшинного введения реципиентам db/db; Увел. x 200

А — поджелудочная железа; Б — печень; В — селезенка; Г — почка (флуоресцентное свечение в периваскулярных участках почечной артерии); слева — фазово-контрастная микроскопия; справа — люминесцентная микроскопия; Увел. x 400.

Сопоставление результатов морфологического исследования органов при про-

ведении клеточной терапии аллогенными ККМ на фоне развернутой клинической картины СД (через 3 мес. после рождения) показывает, что клеточная терапия оказывала положительный эффект, а также использование донорского материала ККМ содержащих ген-зеленого белка позволила нам использовать их как идентификационную метку на длительных сроках после введения.

Гистологическим методом мы выявили у реципиентов во внутренних органах присутствие донорского гена-зеленого белка на 60 и 120 сутки после введения, что также нами было подтверждено с помощью более точного ПЦР метода их присутствие у реципиентов не только в те же сроки (рис.3 А,Б), но и выделить их на более отдаленном сроке, т.е. через 224 сутки после введения ККМ (рис.3 В.) когда животные пали естественной смертью и где длительность жизни реципиентов составила 314 дней (в группе контроля без лечения ККМ длительность жизни животных db/db составила 199 дней [1, 4, 5]).

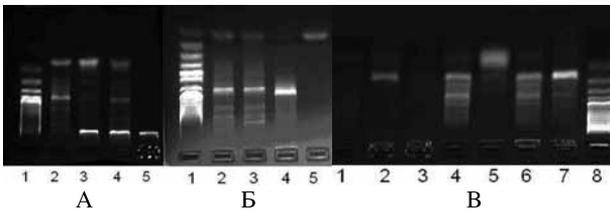


Рис. 3. Электрофоретический спектр продуктов амплификации от реципиента db/db на 60-120-224 сутки после введения аллогенных донорских клеток костного мозга

А — на 60 сутки после введения ККМ; 1- маркер молекулярной массы; 2- без гена зелёного белка; 3- наличие гена зелёного белка; 4- наличие гена зелёного белка; 5- наличие гена зелёного белка; Б — на 120 сутки после введения ККМ; 1 — маркер молекулярной массы; 2 — наличие гена зелёного белка; 3 — наличие гена зелёного белка; 4 — наличие гена зелёного белка; 5 — без гена зелёного белка; В — на 224 сутки после введения ККМ; 1, 3, 5 — без гена зелёного белка; 2, 4, 6, 7 — с геном зелёного белка; 8 — маркер молекулярной массы.

Выводы

1. В качестве установления идентификационной метки донорского материала возможно использование клеток костного мозга мышей линии В.10GFP.

2. Аллогенные клетки костного мозга после трансплантации сохраняются в организме реципиента (мышы линии C57BL/KsJYLepr^{db/+}) в течение длительного времени, участвуя в процессах морфогенеза внутренних органов.

3. Введение клеток костного мозга позволяет в 1,6 раза увеличить сроки жизни животных по сравнению с контролем (СД 2 типа без клеток костного мозга).

4. Пролонгированное поддержание восстановительного морфогенеза поврежденных органов при моделировании СД 2 типа обусловлено длительным (120 дней) сохранением жизнеспособности введенных клеток костного мозга, что подтверждается люминесценцией клеток костного мозга мышей В10.GFP содержащих ген зеленого белка.

5. Создание новых праймеров от мышей линии В.10GFP позволило более точно подтвердить наличие донорских клеток в организме реципиентов (через 60 и 120 дней) и выявить в более отдаленные сроки (224 дней).

Список литературы

1. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. М: ВПК. — 2004. — с. 217с.

2. *Онищенко Н.А.* Инфузия регуляторных пептидов селезенки, трансплантация стволовых клеток костного мозга как два подхода к восстановительному лечению поврежденных органов. // Вестн.

трансплантолог и искусств. органов. — 2002. — № 3. — с. 91-92.

3. **Румянцев А.Г., Масчан А.А.** Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. // Изд. Медицинское информ. Агентство, Москва. — 2003. — с. 910.

4. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Галахова Т.В., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.** Мыши линии C57BL/KsLepr^{db}/+ как генетическая модель сахарного диабета 2 типа. // М. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2007. — № 12. — с. 664-667.

5. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Галахова Т.В., Онищенко Н.А., Касинская Н.В.** Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышях линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ // М. Биомедицина. — 2009. — № 2. — с. 28-40.

6. **Степанова О.И., Онищенко Н.А., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Га-**

лахова Т.В. Использование клеток разных фракций аллогенного костного мозга для терапии сахарного диабета типа 2 на генетической модели. // М. Биомедицина. — 2008. — № 2. — с.78-81.

7. **Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., и др.** Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановления терапии поврежденных органов. // Вестник трансплантации и иск. органов. — 2002. — № 4. — с. 3-6.

8. **Chen L.B., Jiang X.B., Yang L.** Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. // World J. Gastroenterol. — 2004. — 10(20). — p. 3016-3020.

9. **Hess D., Li L., Martin M. et al.** Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. // Nat. Biotechnol. — 2003. — 21(7). — p. 763-70.

10. **Raffii S., Lyden O.** Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. // J. Nat. Med. — 2003. — № 9. — p. 702-712.

Green protein gene as a marker of the stem and progenitor bone marrow cell transplantation

N.V. Kasinskaya, O.I. Stepanova, N.N. Karkishchenko, V.N. Karkishchenko, H.N. Semenov, T.B. Beskova, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, S.E. Dengina

Morphological methods of identification of the donor marker green protein gene in mice-recipients patients with type 2 diabetes and is confirmed by the polymerase chain reaction in the presence of the gene of green protein for a long time in the body of animals were studied

Key words: mouse B.10GFP, an identification mark, the cells of the bone marrow.