

Оригінальна стаття

УДК 616.858-089.843:611.013.395:611.018.46]-092.9

Пятикоп В.А.¹, Мсаллам М.А.¹, Щегельская Е.А.¹, Кутовой И.А.¹, Губина-Вакулик Г.И.²

¹Кафедра нейрохирургии, Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

²Кафедра патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Особенности миграции меченых мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в организме крыс, у которых моделировали паркинсоноподобный синдром

Цель. Изучение локализации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ), меченных зеленым (DiO C18) и красным (Rhod Chol) витальными флуорохромами, после их внутривенного (ВВ) и интрацеребрального (ИЦ) введения в организм крыс, у которых моделировали паркинсоноподобный синдром (ПС).

Материалы и методы. Животные распределены на 3 группы по 6 особей в каждой: I — контрольная, ВВ и ИЦ введение меченых МСК КМ; II — модель ПС и ВВ введение зеленых МСК КМ; III — модель ПС и ИЦ введение красных МСК КМ. Трансплантацию клеток проводили на 7-е сутки моделирования ПС. Эффективность трансплантации МСК оценивали по степени уменьшения выраженности двигательных расстройств, локализацию меченных флуорохромами клеток в органах крыс выявляли на криосрезах головного мозга, легких, селезенки, сердца, почек и печени с помощью люминесцентного микроскопа через 4 и 9 сут после введения МСК.

Результаты. Флуоресцентные прижизненные красители DiO C18 (зеленый) и Rhod Chol (красный) могут быть эффективно использованы для изучения свойств МСК в культуре и их миграции в организме подопытных животных. Установлена избирательная миграция трансплантированных меченых МСК КМ к зонам повреждения головного мозга при моделировании ПС у крыс.

Выводы. Для доставки МСК в поврежденную зону головного мозга могут быть использованы их как ИЦ, так и менее инвазивное ВВ введение.

Ключевые слова: паркинсоноподобный синдром, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, трансплантация, меченные флуорохромами клетки, клеточная миграция, эксперимент.

Укр. нейрохірург. журн. — 2014. — №3. — С. 42-48.

Поступила в редакцию 31.03.14. Принята к публикации 19.05.14.

Адрес для переписки: Мсаллам Мохаммад Ахмад, Кафедра нейрохирургии, Харьковский национальный медицинский университет, пр. Ленина, 4, Харьков, Украина, 61022, e-mail: Dr_msallam@yahoo.com

Вступление. Прогресс в развитии клеточной биологии и регенеративной медицины позволяет сегодня надеяться на разработку эффективных методов лечения таких тяжелых нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз, детский церебральный паралич. Заслуживает внимания перспектива применения этого вида терапии при травме спинного и головного мозга, эпилепсии и многих других заболеваниях нервной системы [1–3]. Во многих исследованиях установлен положительный эффект при упомянутых заболеваниях введения МСК КМ [4, 5]. Однако недостаточно изучены пути миграции введенных МСК, их распределение в тканях реципиента. О механизмах их положительного влияния на организм мнения исследователей различны. Так, некоторые из них полагают, что введенные в мозг МСК посредством паракринного влияния стимулируют восстановление и защиту нейронов мозга реципиента, уменьшают интенсивность апоптоза клеток, уровень свободных радикалов в тканях, регулируют течение воспалительного процесса [6, 7].

Для изучения путей миграции и локализации стволовых клеток (СК) в организме используют различные способы их прижизненной маркировки. Открытие флуоресцентных белков позволило метить клетки и, таким образом, визуализировать их в культуре и организме подопытных животных в экспериментальных условиях. Распространен способ трансфекции культур МСК флуоресцентными белками GFP (зеленый) или Turbo FP 635 (красный) [8–10].

Этот способ трудоемкий, но позволяет проследить судьбу меченых клеток в течение продолжительного периода, поскольку они экспрессируют флуоресцирующий белок на протяжении всей своей жизни. Так, МСК КМ, трансфекцированные геном GFP и индуцированные *in vitro* с помощью специфических индукторов в нейроноподобные клетки, использовали для лечения экспериментального паралича задних конечностей крыс, обусловленного частичным разрушением спинного мозга. Введенные в зону повреждения МСК формировали пучки и мостики в эпицентре повреждения через 5 нед после введения. Клетки

Статья содержит рисунки, которые отображаются в печатной версии — в оттенках серого, в электронной — в цвете.

на срезах обнаруживали по их зеленому свечению в ультрафиолетовом свете. Введение МСК способствовало улучшению функционального состояния подопытных животных по сравнению с таковым контрольных [8]. Изучено взаимодействие МСК, меченных зеленым флуоресцентным белком GFP, и опухолевых, экспрессирующих красный флуоресцентный белок Discosoma DsRed [10]. Возможность метить клетки флуоресцентными маркерами разного цвета позволяет изучать функции, миграцию, трансформацию и взаимодействие одновременно нескольких типов клеток в культуре и в организме.

СК можно метить и синтетическими флуоресцентными красителями (PKH 26, DDC) [11, 12], которые прочно связываются с мембранными структурами живой клетки. Эти маркеры позволяют обнаруживать меченые клетки в организме в течение 2–3 нед. Позже сигнал ослабевает из-за распределения меченых мембран между дочерними клетками вследствие клеточного деления. На модели ишемического инсульта у крыс изучена миграция МСК, меченных PKH 26, после их ВВ введения [11]. Обнаружено небольшое количество меченых клеток в ишемической зоне головного мозга крыс через 2 нед после их введения. После ИЦ введения меченных зеленым красителем DDC нейроиндуцированных МСК крысам при криогенной травме головного мозга флуоресцирующие клетки через 1 нед обнаружены среди клеток реципиента в пограничной с травмой зоне [12].

Целью работы было изучение распределения МСК КМ, меченных зеленым и красным витальными флуорохромами DiO C18 ($\lambda_{em}=513$ нм) и Rhod Chol ($\lambda_{em}=580$ нм) в тканях мозга и внутренних органов после их ВВ и ИЦ введения в организм крыс, у которых моделировали ПС.

Материалы и методы исследования. Флуорохромные липофильные прижизненные красители DiO C18 (зеленый, $\lambda_{em}=513$ нм) и Rhod Chol (красный, $\lambda_{em}=580$ нм), синтезированные в Институте сцинтилляционных материалов НАН Украины (Харьков), любезно предоставлены нам для экспериментальных исследований.

Эксперименты проведены на 18 крысах-самцах линии Вистар-Альбино-Глаксо массой тела от 200 до 250 г в возрасте от 3 до 4 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария (12-часовой световой день, свободный доступ к воде и пище, температура 23–25°C).

Животные распределены на три группы по 6 особей в каждой:

I группа — контрольная, интактные животные, которым ВВ вводили МСК, меченные DiO C 18 (зеленый, $\lambda_{em}=513$ нм) и ИЦ, меченные Rhod Chol (красный, $\lambda_{em}=580$ нм);

II группа — модель ПС с последующим (на 7-е сутки) ВВ введением в хвостовую вену МСК КМ, меченных флуорохромом DiO C18 (зеленый, $\lambda_{em}=513$ нм);

III группа — модель ПС с последующим (на 7-е сутки) ИЦ введением в субталамическую зону МСК КМ, меченных Rhod Chol (красный, $\lambda_{em}=580$ нм).

ИЦ вводили по 30×10^3 культивированных МСК в 10 мкл раствора Хэнкса, ВВ вводили в хвостовую вену по $0,3 \times 10^6$ МСК в 500 мкл раствора Хэнкса.

Распределение флуоресцентных клеток на криосрезах толщиной 20–25 мкм, приготовленных с помощью микротом-криостата МК-25 (завод «Технолог», Россия) из ткани головного мозга, печени, селезенки, сердца, легких и почек крыс, изучали через 4 и 9 сут после введения МСК с помощью люминесцентного микроскопа Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия).

Способ моделирования ПС. ПС у крыс моделировали путем химической деструкции при введении 6-гидроксидофамина (6-OHDA, Almbion Ltd, Россия) в дозе 8 мкг/кг в зону черного вещества (Substantia nigra — SN) головного мозга [13]. Животных вводили в наркоз путем инъекции тиопентал-натрия (50 мг/кг) внутривенно и фиксировали в стереотаксическом аппарате. После обработки 3% раствором йода по средней линии производили линейный разрез длиной до 2 см и скелетировали кость. Координаты SN соответствовали точке, находящейся на линии уровня фронтальной поверхности головного мозга от брегмы — Anterior-Posterior (AP) + 4 мм, латерально — 1,5 мм, вглубь — 8,2 мм (**рис. 1**). С двух сторон симметрично накладывали фрезевые отверстия диаметром 1 мм и через капилляр вводили 6-OHDA (8 мкг/кг) на глубину 8,2 мм.

При билатеральной химической деструкции SN у крыс возникали грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да» «нет-нет»), «горбоподобного» изгиба туловища, вертикально поднятого хвоста.

Двигательные расстройства наблюдали у всех животных в 1-е сутки после ИЦ деструкции, они сохранялись в течение всего периода наблюдения (до 54 сут).

Метод получения в культуре МСК КМ человека. Суспензию КМ забирали у 2 добровольных доноров. Размноженные из нее в культуре МСК использовали в эксперименте после получения информированного согласия доноров. Из костно-губчатого биоптата подвздошной кости человека (объемом 1 см³) выдавливали суспензию костного мозга в раствор Хэнкса в чашке Петри, перенесли ее в центрифужную пробирку и осаждали путем центрифугирования при скорости 450 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в культуральной среде ДМЕМ/F12 (1:1) с 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 ммоль L-глутамин и раствором антибиотиков/антимикотиков

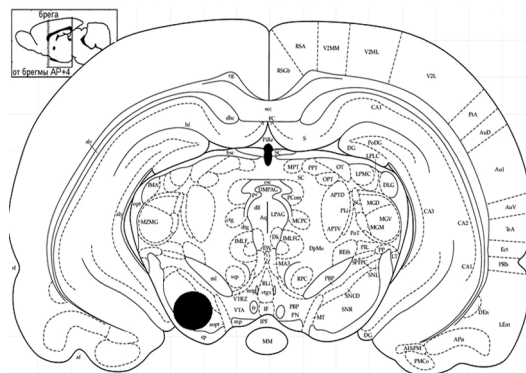


Рис. 1. Схема фронтального среза мозга крысы (приведено по [14]) при AP + 4 мм (черная метка SN на глубину 8,2 мм).

(SIGMA-ALDRICH) в объеме 5 мкл/мл и рассеивали в культуральные флаконы (объемом 75 см³). Через 48 ч культивирования в CO₂-инкубаторе отмывали прикрепившиеся ко дну флаконов МСК от гемопоэтических клеток в двух сменах раствора Хэнкса, добавляли культуральную среду и культивировали МСК до образования клеточного монослоя в течение 2–3 нед. Среду меняли дважды в неделю. Клетки снимали со дна флаконов после инкубации в растворе трипсин-ЭДТА (SIGMA-ALDRICH, кат. № Т3924). Клеточную суспензию осаждали путем центрифугирования при скорости 450 g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали до необходимой концентрации клеток в растворе Хэнкса. Жизнеспособность клеток оценивали после окрашивания 0,1% раствором трипанового синего в камере Горяева.

Метод включения флуорохромов в МСК КМ.

Чтобы приготовить рабочий раствор для маркировки клеточной суспензии МСК, маточные растворы (1 мг/мл) флуорохромов DiO C18 (зеленый, λ_{em}=513 нм) и Rhod Chol (красный, λ_{em}=580 нм) в диметилсульфоксиде разводили в 100 раз раствором Хэнкса. МСК ресуспендировали в 2 мл рабочего раствора красителя и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. Клетки осаждали при скорости 430 g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в свежем растворе Хэнкса, наносили каплю суспензии на предметное стекло и оценивали качество окрашивания МСК с

помощью люминесцентного микроскопа Axiostar Plus (рис. 2). Часть меченых клеток рассеивали в чашки Петри для культивирования, оценивали степень флуоресценции меченых клеток через 1 и 2 нед с помощью люминесцентного микроскопа.

Результаты и их обсуждение. МСК КМ человека обладают адгезией к культуральному пластику и благодаря этому могут быть легко выделены из суспензии клеток КМ. Они формируют на дне флаконов гетерогенные колонии фибробластоподобных клеток с овальными ядрами средних размеров и несколькими ядрышками.

На основании анализа результатов исследования нами оптимизированы методы маркировки МСК человека с использованием новых прижизненных флуорохромов Rhod Chol (красный) и DiO C18 (зеленый), синтезированных в Институте сцинтилляционных материалов НАН Украины.

Эти красители прочно связываются с мембранными структурами цитоплазмы клетки, не проникают в ядро, не цитотоксичны при оптимальной концентрации и длительности инкубации в них клеток. После инкубации с этими флуорохромами 95% клеток были жизнеспособными, сохраняли пролиферативный потенциал при культивировании и способность к флуоресценции в течение 2 нед (рис. 3).

Таким образом, можно было надеяться, что после введения в организм животных жизнеспособность,

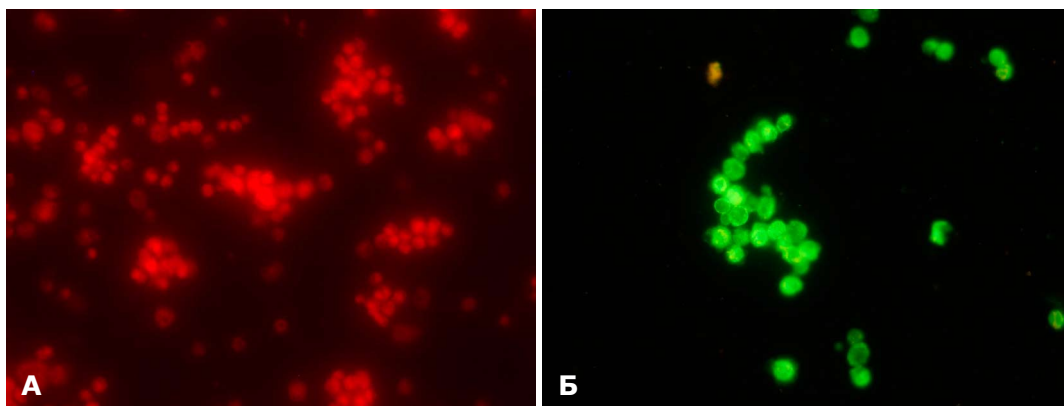


Рис. 2. Люминесцентная микроскопия. Меченные флуорохромами МСК в виде клеточной суспензии, готовой к введению. А — Rhod Chol (красный); Б — Dio C18 (зеленый). Ув.×200.

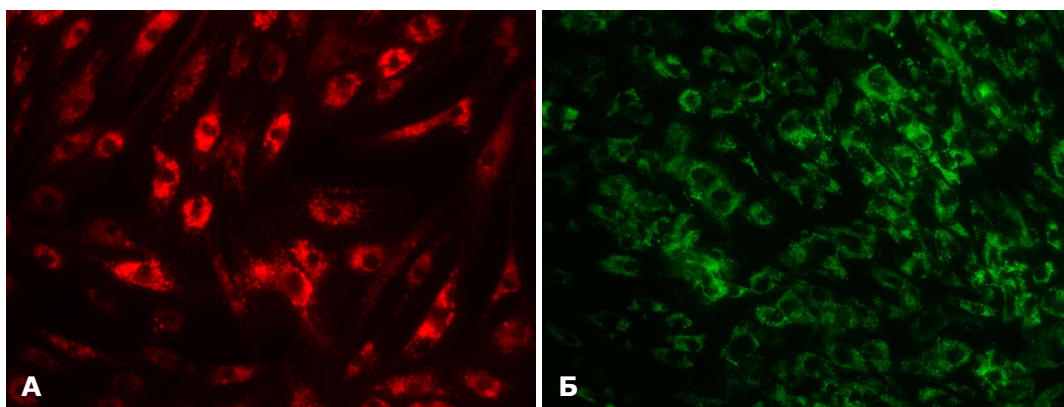


Рис. 3. Люминесцентная микроскопия. Меченные флуорохромами МСК через 1 нед культивирования *in vitro*. А — Rhod Chol (красный); Б — Dio C18 (зеленый). Ув.×200.

функціональні властивості та флуоресценція кліток, мечених цими флуорохромами, зберігаються.

На класических гистологіеских препаратех головногo мозга криси показано, що комплекс кліток в зоні SN у інтактних животиных має форму трикутника, представленого нейронами середньої величини, угловатої та продовгатої форми, що свідечує про наявність віступків, формуючих конуси в місцях відходження від тіл нейронів (рис. 4). Через 7 сут після

хіміескої деструкції SN при моделюванні ПС в цій зоні повністю або майже повністю зникли нейрони з великими тілами на фоні збільшення кількості гліальних елементів та рідкості нейропілія.

МСК з зеленою флуоресценцією виявлені в криосрезах головногo мозга криси II групи (рис. 5), на криосрезах печені та нирок (рис. 6, 7).

В тканинах селезенки, легких та серця мечені МСК не виявлені. В печені та нирках після ВВ введення

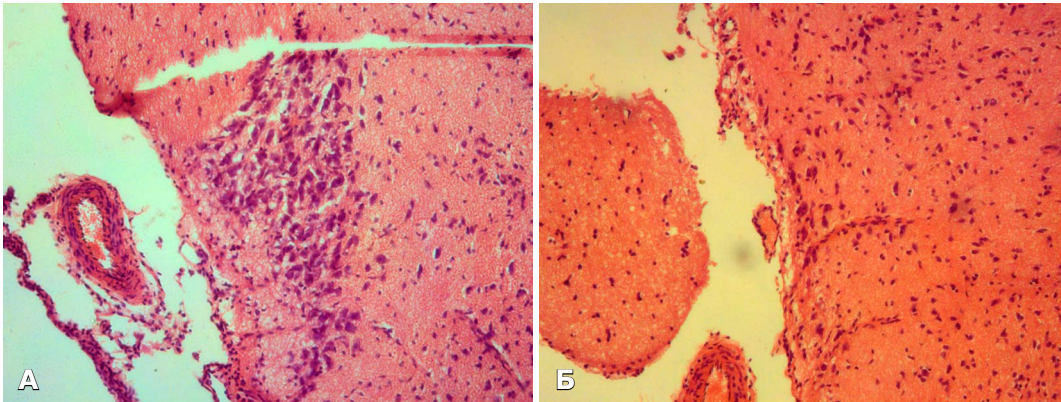


Рис. 4. Микрофото. Структура зони SN головногo мозга криси. А — у інтактних животиных; Б — на 7-е сут після хіміескої деструкції зони SN головногo мозга (модель ПС). Окраска гематоксилином та еозином. Ув.×100.

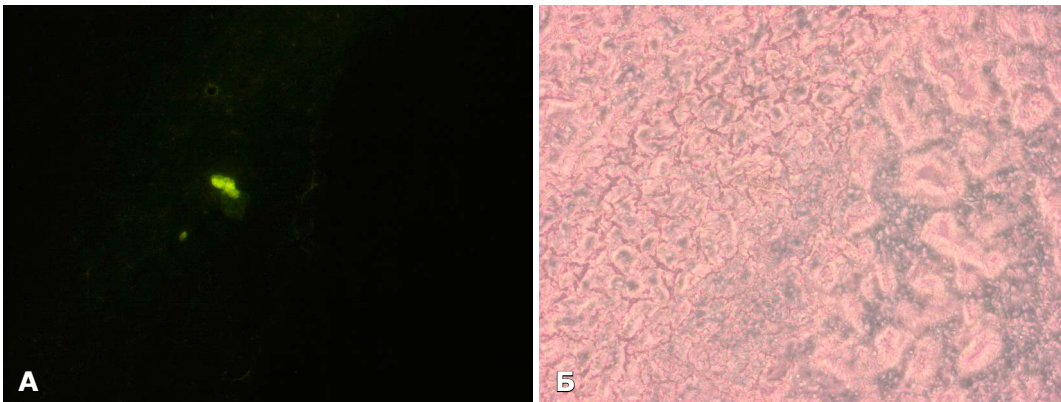


Рис. 5. Мечені зеленою флуорохромом МСК КМ в зоні деструкції головногo мозга криси з ПС через 4 сут після ВВ введення. А — люмінесцентна мікроскопія; Б — світлова мікроскопія. Ув.×200.

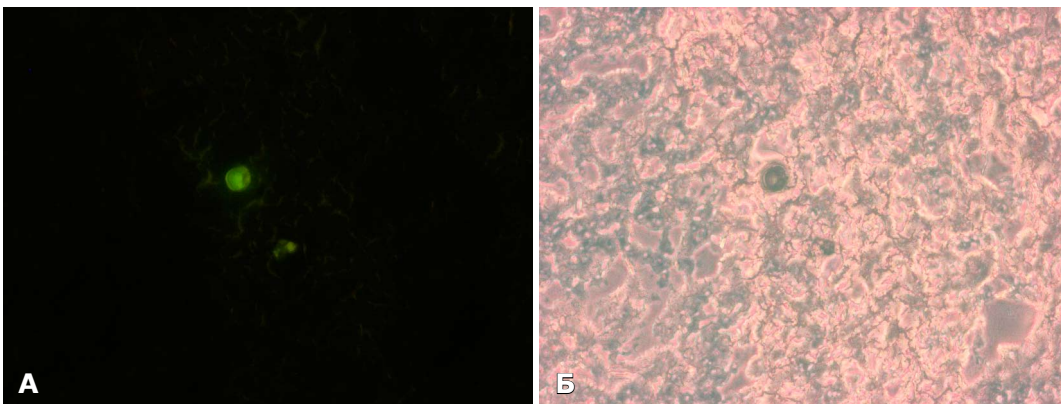


Рис. 6. Мечені МСК КМ на криосрезах печені криси групи II. 4-е сутки після ВВ введення кліток. А — люмінесцентна мікроскопія; Б — світлова мікроскопія. Ув.×200.

меченные DiO C18 клетки обнаруживали также через 9 сут. В структурах неповрежденного головного мозга крыс контрольной группы после ВВ трансплантации меченные зеленым флуорохромом МСК не обнаружены. В печени и почках этих крыс выявлены отдельные меченые МСК.

Аналогичные результаты отмечены при изучении миграции МСК жировой ткани, трансфицированных геном красного флуоресцирующего белка Turbo FR 635, после их ВВ введения мышам, у которых моделировали опухоль (мышам линии nude подкожно вводили клетки опухоли Hela Kyoto — рак шейки матки). При исследовании различных органов подопытных животных на криопрепаратах флуоресцирующие клетки обнаружены преимущественно в печени, почках и селезенке [9].

В нашем исследовании после ИЦ введения МСК, меченных красным флуорохромом Rhod Chol, животным III группы скопления клеток с красной флуоресценцией обнаружены на 4-е и 9-е сутки в головном мозге вблизи поврежденной зоны SN (**рис. 8**).

Как при ВВ, так и ИЦ введении светящиеся клетки распределялись преимущественно в зоне деструкции мозга и субталамической зоне, однако при ВВ введении меченых клеток в зоне SN было значительно меньше, чем при ИЦ введении. Через 4 сут после введения клетки светились ярче и их было больше,

чем через 9 сут после трансплантации. Такая миграция МСК после ВВ введения может быть обусловлена как нарушением целостности гематоэнцефалического барьера, так и появлением в области деструкции или воспаления сигнальных белков (цитокинов), определяющих избирательную миграцию введенных клеток.

У крыс контрольной группы после ИЦ введения скопление МСК, меченных флуорохромами, обнаруживали только в зоне введения.

Таким образом, ВВ введенные МСК током крови не распределяются равномерно во всех тканях организма, а мигрируют избирательно в зоны-мишени поврежденного органа, в данном случае — головного мозга экспериментальных животных, что согласуется с результатами других авторов. Например, американские исследователи изучали локализацию МСК самцов крыс после ВВ введения самкам крыс через 1 сут после повреждения головного мозга. Через 15 сут отмечено значительное улучшение моторных и неврологических функций у подопытных животных по сравнению с контрольными. Инъецированные клетки обнаруживали по наличию Y-хромосомы преимущественно в паренхиме поврежденного мозга. Они экспрессировали характерные для нейронов (NeuN) и астроцитов (GFAP) маркеры [15]. Меченные бромдезоксисуридином МСК КМ (без индукции и пос-

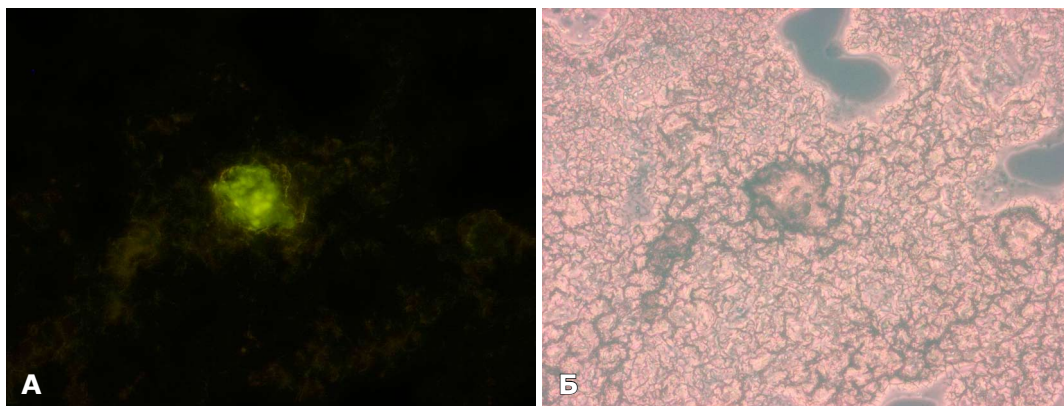


Рис. 7. Скопление меченных зеленым флуорохромом МСК КМ на криосрезе почки крысы группы II. 4-е сутки после ВВ введения клеток. А — люминесцентная микроскопия; Б — световая микроскопия. Ув.×200.

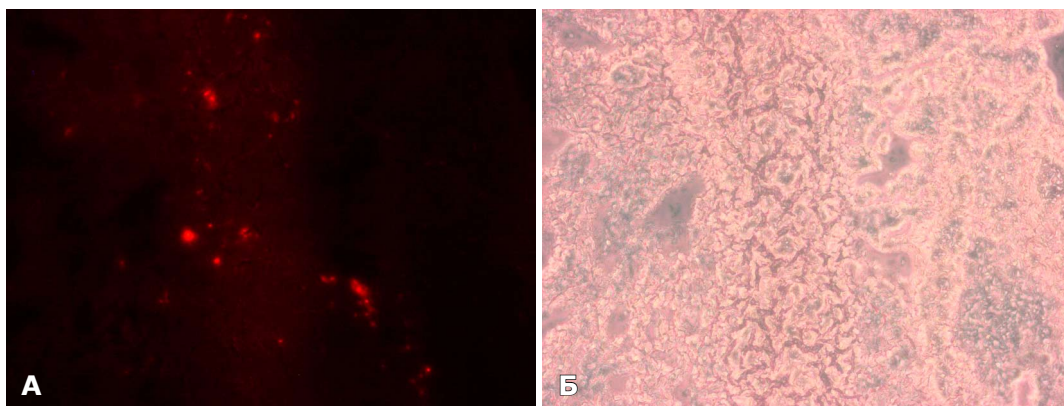


Рис. 8. Меченные красным флуоресцентным красителем МСК КМ в зоне деструкции головного мозга крыс группы III через 4 сут после ИЦ введения. А — люминесцентная микроскопия; Б — световая микроскопия. Ув.×200.

ле индукции факторами роста нейронов) вводили во внутреннюю сонную артерию крысам с черепно-мозговой травмой через 24 ч после ее нанесения. Через 7 сут МСК обнаруживали преимущественно в ипсилатеральном полушарии, на границе с зоной повреждения. В МСК выявлена экспрессия нейронспецифических и глиоспецифических белков, причем, их экспрессия была выше в предварительно индуцированных клетках. Таким образом, было показано, что МСК КМ, введенные внутриаартериально, выживают и мигрируют в поврежденный мозг [16].

В наших исследованиях заметное восстановление двигательных функций (исчезновение монотонных движений головой и вертикально поднятого хвоста) у крыс, которым моделировали ПС, происходило на 8–9-е сутки после ВВ (группа II) и ИЦ (группа III) введения меченых МСК КМ. Однако у большинства животных в эти сроки еще сохранялся «горбоподобный» изгиб туловища. Достоверные различия в группах не обнаружены.

Выводы. 1. Флуоресцентные прижизненные красители DiO C18 (зеленый) и Rhod Chol (красный) могут быть эффективно использованы для изучения свойств МСК в культуре и в организме опытных животных.

1. Установлена избирательная миграция введенных меченых МСК КМ к зонам повреждения головного мозга при моделировании ПС у крыс.

2. Для доставки МСК в дефектную зону головного мозга может быть использовано их как ИЦ, так и менее инвазивное ВВ введение.

Список литературы

1. Пятикоп В.А. Нейрохирургическая коррекция двигательных расстройств при паркинсонизме (экспериментальное и клиническое исследование): дис. д-ра мед. наук: спец. 14.01.05 — нейрохирургия / В.А. Пятикоп. — К., 2009. — 293 с.
2. Dantuma E. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases / E. Dantuma, S. Merchant, S. Kiminobu // *Stem Cell Res. Ther.* — 2010. — V.1, N5. — P.37.
3. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality / S. Ehnert, M. Glanemann, A. Schmitt, S. Vogt, N. Shanny, N.C. Nussler, U. Stöckle, A. Nussler // *Langenbecks Arch. Surg.* — 2009. — V.394, N6. — P.985–997.
4. Индукция стромальных клеток костного мозга в нейробласты и их использование в лечении пациентов с болезнью Паркинсона / Е.А. Щегельская, В.А. Пятикоп, Ю.Е. Микулинский [и др.] // *Материалы III съезда трансплантологов Украины (Донецк, 5–8 окт. 2004 г.)*. — Донецк, 2004. — С.381–384.
5. Получение нейробластов из клеток стромы костного мозга и их клиническое применение при некоторых заболеваниях нервной системы / В.А. Яворская, Н.П. Волошина, В.В. Хвысюк, А.В. Гребенюк, А.Ю. Гаврюшин, К.В. Грециких, О.Л. Пелехова, Ю.Е. Микулинский, В.В. Васильевский, Л.Ф. Шестопалова, Е.А. Щегельская // *Укр. нейрохирург. журн.* — 2006. — №4. — С.89–96.
6. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease / N. Joyce, G. Annett, L. Wirthlin, S. Olson, G. Bauer, J.A. Nolte // *Regen. Med.* — 2010. — V.5, N6. — P.933–946.
7. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques / T. Hayashi, S. Waka, M. Kitada, T. Ose, H. Watabe, Y. Kuroda, K. Mitsunaga, D. Matsuse, T. Shigemoto, A. Ito, H. Ikeda, H. Fukuyama, H. Onoe, Y. Tabata, M. Dezawa // *J. Clin. Invest.* — 2013. — V.123, N1. — P.272–284.
8. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery / C.P. Hofstetter, E.J. Schwarz, D. Hess, J. Widenfalk, A. El Manira, D.J. Prockop, L. Olson // *PNAS.* — 2002. — V.99, N4. — P.2199–2204.
9. Исследование взаимодействия мезенхимных стволовых клеток и опухоли методами флуоресцентного биоимиджинга / А.В. Мелешина, Е.И. Черкасова, Е.А. Сергеева [и др.] // *Соврем. технологии в медицине*. — 2012. — №4. — С.7–16.
10. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis / P. Marlene, G. Muriel, M. Eliane, A. Rafii, N. Benabbou, P. Mirshahi, I. Hennebelle, P. Bourin, B. Allal, J. Teissie, M. Mirshahi, B. Couderc // *Int. J. Cancer.* — 2010. — V.126, N9. — P.2090–2101.
11. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток / Н.Н. Зинькова, Е.Г. Гилерович, И.Б. Соколова, С.К. Вийде, Е.В. Шведова, Г.В. Александров, П.В. Кругляков, Т.В. Кислякова, Д.Г. Польшцев // *Цитология*. — 2007. — Т.49, №7. — С.566–575.
12. Восстановление структурно-функциональных параметров у крыс с криогенной травмой головного мозга после трансплантации клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты / В.А. Пятикоп, Е.А. Щегельская, Ю.Е. Микулинский [и др.] // *Пробл. криобиологии*. — 2005. — Т.15, №3. — С.449–451.
13. Jeon B.S. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: Time course and morphology of cell death / B.S. Jeon, V. Jackson-Lewis, R.E. Burke // *Neurodegeneration.* — 1995. — V.4. — P.131–137.
14. Fikova E. Stereotaxic atlases for the cat, rabbit, and rat brain // E. Fikova, J. Marsala. — Praha: SZN, 1960. — 126 p.
15. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells / A. Machmood, D. Lu, L. Wang, Y. Li, M. Lu, M. Chopp // *Neurosurgery.* — 2001. — V.49, N5. — P.1196–1203.
16. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury / D. Lu, L. Wang, J. Chen [et al.] // *Neurotrauma.* — 2001. — V.18, N8. — P.813–819.

П'ятикоп В.О.¹, Мсаллам М.А.¹, Щегельська О.А.¹, Кутувий І.О.¹, Губіна-Вакулик Г.І.²

¹Кафедра нейрохірургії, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

²Кафедра патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Особливості міграції мічених мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку в організмі щурів, у яких моделювали паркінсоноподібний синдром

Мета. Вивчення локалізації мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (МСК КМ), мічених зеленим (DiO C18) і червоним (Rhod Chol) вітальними флуорохромами, після їх внутрішньовенного (ВВ) і інтрацеребрального (ІЦ) введення в організм щурів, у яких моделювали паркінсоноподібний синдром (ПС).

Матеріали і методи. Тварини розподілені на 3 групи по 6 особин у кожній: I — контрольна, ВВ і ІЦ введення мічених МСК КМ; II — модель ПС і ВВ введення зелених МСК КМ; III — модель ПС і ІЦ введення червоних МСК КМ. Клітини трансплантували на 7-му добу моделювання ПС. Ефективність трансплантації МСК оцінювали за ступенем зменшення вираженості рухових розладів, локалізацію мічених флуорохромами клітин в органах щурів виявляли на криосрезах головного мозку, легенів, селезінки, серця, нирок і печінки за допомогою люмінесцентного мікроскопа через 4 і 9 діб після введення МСК.

Результати. Флуоресцентні прижиттєві барвники DiO C18 (зелений) і Rhod Chol (червоний) можна ефективно використовувати для вивчення властивостей МСК в культурі та їх міграції в організмі дослідних тварин. Встановлено селективну міграцію трансплантованих мічених МСК КМ до зон пошкодження головного мозку при моделюванні ПС у щурів.

Висновки. Для доставки МСК у пошкоджену зону головного мозку можуть бути використані їх як ІЦ, так і менш інвазивне ВВ введення.

Ключові слова: паркінсоноподібний синдром, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, трансплантація, мічені флуорохромами клітини, клітинна міграція, експеримент.

Укр. нейрохірург. журн. — 2014. — №3. — С. 42-48.

Надійшла до редакції 31.03.14. Прийнята до публікації 19.05.14.

Адреса для листування: Мсаллам Мохаммад Ахмад, Кафедра нейрохірургії, Харківський національний медичний університет, пр. Леніна, 4, Харків, Україна, 61022, e-mail: Dr_msallam@yahoo.com.

Pyatikop V.A.¹, Msallam M.A.¹, Shchegelskaya E.A.¹, Kutovoy I.A.¹, Gubina-Vakulik G.I.²

¹Department of Neurosurgery, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

²Department of Pathological Anatomy, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Migration features of labeled bone marrow mesenchymal stem cells in rats with modeled Parkinson-like syndrome

The purpose. To study localization of bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSC), labeled by green (DiO C18) and red (Rhod Chol) vital fluorochromes, after intravenous (IV) and intracerebral (IC) transplantation into rats with modeled Parkinson-like syndrome (PS).

Materials and methods. The animals were divided into 3 groups, each of 6: I — control, IV and IC administration of labeled BM MSC; II — PS model and IV administration of green BM MSC; III — PS and IC transplantation of red BM MSC. Cell transplantation was performed on the 7th day after PS modeling. MSCs transplantation effectiveness was assessed by decrease of motor disorders degree, localization of fluorochrome labeled cells in the organs of rats was detected on cryosections of brain, lung, spleen, heart, kidneys and liver on the 4th and 9th day after MSC injection using fluorescence microscope.

Results. Fluorescent vital dyes DiO C18 (green) and Rhod Chol (red) can be effectively used to study MSCs properties in culture and their migration in the body of experimental animals. Selective migration of transplanted labeled BM MSCs to damaged areas of the brain damage at PS modeling in rats was shown.

Conclusions. For MSCs delivery in the brain damaged area their IC and less invasive IV transplantation can be used.

Key words: Parkinson-like syndrome, bone marrow mesenchymal stem cells, transplantation, fluorochrome-labeled cells, cell migration, experiment.

Ukr Neyrokhir Zh. 2014; 3: 42-8.

Received, March 31, 2014. Accepted, May 19, 2014.

Address for correspondence: Msallam Mohammad Ahmad. Department of Neurosurgery, Kharkiv Medical National University, 4 Lenina Ave, Kharkov, Ukraine, 61022, e-mail: Dr_msallam@yahoo.com.