

Сравнение различных методов выделения, мечения и трансплантации звёздчатых клеток печени крысы

Шафигуллина А.К.¹, Гумерова А.А.^{1,2}, Трондин А.А.¹, Шарипова Э.И.¹, Титова М.А.^{1,2}, Газизов И.М.¹, Бурганова Г.Р.¹, Калигин М.С.¹, Андреева Д.И.¹, Ризванов А.А.^{1,2}, Мухамедов А.Р.¹, Киясов А.П.^{1,2}

¹Казанский государственный медицинский университет, г. Казань

²Казанский Приволжский Федеральный Университет, г. Казань

420012, Республика Татарстан, г.Казань, ул.Бутлерова,49

Sh.aygul@gmail.com, +79274197879

Comparison of different methods of rat hepatic stellate cells isolation, labeling and transplantation

Shafigullina A.K.¹, Gumerova A.A.^{1,2}, Trondin A.A.¹, Sharipova E.I.¹, Titova M.A.^{1,2}, Gazizov I.M.¹, Burganova G.R.¹, Kaligin M.S.¹, Andreeva D.I.¹, Rizvanov A.A.^{1,2}, Muhamedov A.R.¹, Kiassov A.P.^{1,2}

¹Kazan State Medical University, Kazan

²Kazan Federal Volga Region University, Kazan

420012, Republic of Tatarstan, Kazan, Butlerova str., 49

Sh.aygul@gmail.com, +79274197879

Реферат. На сегодняшний день всё больше исследований посвящено изучению роли звёздчатых клеток печени (ЗКП) в регенерации печени. При трансплантации ЗКП остаётся ряд нерешённых технических вопросов, в частности, выделения ЗКП, мечения клеток и пути введения. В ходе данной работы было проведено сравнение двух методов выделения клеток: метод коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза и ассоциированного выделения ЗКП и гепатоцитов методом Сеглена. Также было проведён анализ эффективности различных методов мечения ЗКП: мембранными флуоресцентными метками РКН26 и геном зелёного флуоресцентного белка, доставляемого в клетки методом электропорации, с помощью

химического реагента TurboFect или аденовируса. Далее меченые клетки были трансплантированы в печень крыс после частично гепатэктомии двумя методами: в систему воротной вены и в селезёнку. На основании полученных результатов можно заключить, что для выделения ЗКП предпочтительным является метод коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза, для мечения клеток – доставка гена GFP аденовирусом, для трансплантации – в систему воротной вены.

Ключевые слова: звёздчатые клетки печени, GFP, выделение клеток, мечение клеток, аденовирус, флуоресцентные мембранные метки PKH26, трансплантация.

Report. ...

Key words: hepatic stellate cells, GFP, cells isolation, labeling, adenovirus, fluorescent membrane dye PKH26, transplantation.

Введение. Всё больше данных появляется об участии звёздчатых клеток печени (ЗКП) в регенерации печени. Бóльшее количество исследований направлено на изучения роли в регенерации печени собственных ЗКП путём иммуногистохимического окрашивания гистологических препаратов печени антителами к десмину – маркёру ЗКП крысы [Friedmann, 2008], а также α -ГМА – маркёру портальных миофибробластов и активированных ЗКП [Friedmann, 2008]. Другой путь исследования – трансплантация ЗКП животным с повреждением печени. Однако, в данном случае возникает ряд технических и методологических вопросов: вопрос оптимального метода выделения ЗКП, мечения клеток и пути трансплантации.

На сегодняшний день ЗКП печени крыс могут быть выделены двумя методами: 1) методом коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза

[Knook, 1982]; 2) методом ассоциированного получения гепатоцитов и ЗКП (по Сеглену) [Nuefield, 1997]. В литературе данных по сравнению эффективности данных методов нет, что и стало одной из задач данной работы.

Следующий вопрос – метод мечения клеток. Для мечения клеток необходим метод простой и информативный, стабильный и определяемый на протяжении длительного периода времени, в том числе после деления трансплантированных клеток. Известно множество различных методов получения меченых клеток: методы генетической модификации, молекулярно-биологические методы введения плазмиды, несущей ген зелёного флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein, GFP), а также химические методы с применением мембранных красителей. Бесспорно, самым эффективным методом является выделение клеток из ткани трансгенных зелёных мышей. Сопоставимым по эффективности является метод выявления трансплантированных клеток по Y-хромосоме – для этого в качестве донора клеток выступает мужская особь, а реципиента – женская. Определение клеток по Y-хромосоме может быть проведено методом ПЦР в режиме реального времени [Ling-Jid Wung Yong Ming Cben, 2002] или методом гибридизации *in situ* [Nagwaelkhalif, 2010]. Главное преимущество данных методов заключается в том, что нет необходимости проводить дополнительные процедуры по мечению клеток, а благодаря наследованию признака выявить EGFP или Y-хромосому можно и в дочерних клетках. Ограничивают широкое применение данных методов высокая стоимость и необходимость специального оборудования и навыков. Также, общепринятым является проведение лабораторных экспериментов на самцах животных, тогда как при трансплантации клеток самкам при интерпретации результатов необходимо учитывать некоторые их физиологические особенности.

Некоторыми исследователями проведены эксперименты по ксенотрансплантации, однако в данном случае большую роль в

приживлении клеток играет иммунная система [Chamberlain, J., 2007], поэтому данный метод не может быть применён в клинических исследованиях.

Альтернативный метод, позволяющий метить клетки, – с помощью флуоресцентных мембранных меток PKH (Sigma) [Jin SZ, 2010]. Данный метод прост в проведении и позволяет получить высокий процент меченых клеток (Technical support for PKH Dye, Sigma).

Наиболее распространённым и изученным является метод мечения клеток с помощью GFP. Методы доставки GFP в клетки очень разнообразны – методом электропорации, химический метод с помощью липосом или специальных реагентов (например, TurboFect), а также с помощью вирусных векторов. При работе с белком GFP необходимо помнить, что он обладает повышенной иммуногенностью, поэтому клетки, экспрессирующие ген белка GFP, элиминируются иммунной системой [FELIX C. POPP, 2007]. Тем не менее метод выявления трансплантированных клеток по GFP прост и информативен, широко применяется и поэтому необходимо определить наиболее оптимальный метод мечения ЗКП с помощью GFP. Поэтому второй задачей данной работы стало сравнение различных методов доставки гена GFP и мечения с помощью флуоресцентной мембранной метки PKH, как наиболее перспективных.

Следующим важным вопросом является путь введения клеток. В целом все методы введения гемопоэтических (ГСК) и мезенхимных стволовых клеток могут быть разделены на 3 группы: прямое или адресное введение в определенный орган, полупрямое и системное введение [Zhang et al., 2008]. Примером прямого введения могут быть эксперименты Sato 2005 года [Sato, Y., 2005], когда клетки были введены непосредственно в поражённую печень; примеры полупрямого введения – внутриселезёночное [2007, Aurich, I.] и интраперитонеальное [Zun Chang Liu, 2006] введения; пример системного введения - внутривенное введение,

которое было проведено Fang [2004, Fang, B.] и в хвостовую вену [Terai S, 2003]. Также клетки могут быть введены в воротную вену [FELIX C. POPP, 2007] или в печеночную артерию [Mohamadnejad et al., 2007b], что несомненно повышает количество клеток, поступающих с током крови в печень [Long-Jun Dai, 2009] и можно рассматривать как варианты прямого введения клеток. Пути введения ЗКП малоизучены, поэтому нами были выбраны два наиболее достоверных пути введения: в систему воротной вены и в селезёнку, из которой с током венозной крови клетки теоретически должны достичь системы воротной вены и далее самой печени.

Материалы и методы.

Исследование было проведено на белых беспородных крысах-самцах рода Вистар весом 250-300 г, находящихся на стандартном рационе вивария и имеющих свободный доступ к воде. Проведение исследований одобрено Республиканским комитетом по Этическим вопросам при проведении клинических испытаний-исследований лекарственных средств при Министерстве здравоохранения Республики Татарстан (протокол №3 от 21.03.2011).

Выделение ЗКП было проведено двумя методами: 1) методом коллагеназно-пропазовой перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза (Knook, 1982) и 2) методом Сеглена для ассоциированного выделения гепатоцитов и ЗКП (Neufeld, 1997). Сравнимые параметры: чистота культуры, выживаемость клеток, простота и стоимость метода выделения.

В основе обоих методов выделения ЗКП лежит перфузия печени через систему воротной вены, различия заключались в растворах для перфузии. В первом методе перфузия печени была проведена следующими растворами: 1) буферным сбалансированным солевым раствором Гейса (Gey's Balanced Salt Solution, GBSS, Sigma), объемом 80 мл, скорость перфузии 10 мл/мин; 2) GBSS в комбинации с пропазой (Pronase E, Sigma)

для лизиса гепатоцитов объёмом 80 мл (0,264 г – проназа), скорость перфузии 10 мл/мин; 3) GBSS в комбинации с проназой (0,08 г) и коллагеназой для лизиса соединительнотканной стромы печени (0,16 г, Collagenase Type I, Sigma) объёмом 100 мл., скорость перфузии 3,33 мл/мин). После окончания перфузии печень извлекали из брюшинной полости и измельчали, полученную суспензию клеток инкубировали в растворе GBSS в комбинации с 0,04 г проназы E, 0,048 г коллагеназы I и 0,08 г ДНК-азы в течение 30 минут при температуре 37°C. Последующее разделение клеток было проведено путём центрифугирования в градиенте плотности гистоденза.

По методу Сеглена перфузия печени была проведена растворами: 1) этиленгликольтетраацетата (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid, EGTA) объёмом 50 мл, скорость перфузии 10 мл/мин; 2) буферного сбалансированного солевого раствора Гейса (GBSS, Sigma) объёмом 30 мл при скорости перфузии 10 мл/мин и 3) раствором 0,5% коллагеназы (Биолот) объёмом 50 мл в течение 5 минут, скорость перфузии 10 мл/мин. После окончания перфузии печень, как и в предыдущем методе, извлекали из брюшинной полости и измельчали, клеточную суспензию сразу центрифугировали в течение 10 минут при скорости вращения 450 g.

Количество выделенных клеток и их выживаемость определяли путём подсчёта клеток в камере Горяева при разведении клеточной суспензии в трипановом синем в соотношении 1:10. ЗКП культивировали в питательной среде ДМЕМ (Sigma) с 10% содержанием бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, Sigma), 146 мг/мл L-глутамина и 100 Ед/мл пенициллина – 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma) в инкубаторе при 37°C и 5% содержании CO₂ во влажной атмосфере.

В следующем экспериментальном блоке было проведено сравнение эффективности 4-х разных методов мечения клеток: 1) метод генетической модификации путём их электропорации плазмидой pEGFP-N2, отвечающей за экспрессию зелёного флуоресцентного белка; 2) метод

введения плазмиды pEGFP-N2 с помощью специального реагента TurboFect (Fermentas); 3) метод трансфекции клеток аденовирусом со встроенным геном GFP; 4) применение мембранного красного флуоресцентного красителя PKH26 (Sigma). **Надо ли более подробно описывать методы?** Сравнимые параметры: эффективность трансфекции (количество меченых клеток), выживаемость клеток, длительность сохранения флуоресценции, а также возможность введения клеток сразу после мечения или необходимость культивирования клеток с целью их восстановления после мечения.

Введение клеток было интраоперационное после операции частичной гепатэктомии. Для трансплантации меченых ЗКП были выбраны 2 метода введения: 1) в селезёнку; 2) в систему воротной вены. Анализ результатов трансплантации ЗКП был проведён методом иммуногистохимического окрашивания парафиновых гистологических срезов антителами к EGFP.

Результаты и обсуждение.

1. Сравнение методов выделения ЗКП крысы. Обоими методами нами были получены ЗКП крысы. Поскольку метод Сеглена направлен на ассоциированное получение ЗКП и гепатоцитов, то для получения чистой культуры ЗКП требовалось от 7 до 10 дней до гибели гепатоцитов. Также необходимо отметить, что в присутствии гепатоцитов ЗКП росли медленнее.

Метод Сеглена является менее затратным в финансовом плане, более прост в исполнении, однако более высокие показатели жизнеспособности (90%) и чистоты культуры (99,5%) были при выделении клеток методом коллагеназно-проназной перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза. Данный метод мы рекомендуем для получения чистой культуры ЗКП.

2. Сравнение методов мечения ЗКП. При сравнении различных методов мечения клеток были получены следующие результаты. Наименее эффективным по количеству меченых клеток (около 50%), их

выживаемости (30%) является метод электропорации. Длительность сохранения свечения составила всего 7 суток, а необходимость последующего культивирования клеток в течение 12 ч для их восстановления увеличивает потери клеток (при снятии клеток с чашки перед введением). Метод введения плазмидной конструкции pEGFP-N2 с помощью специального реагента TurboFect позволяет получить около 60% меченых клеток при хорошем уровне их выживаемости (рис. 1), однако длительность свечения составляет всего около 10 суток, значит клетки, меченые данным методом могут применяться только в краткосрочных экспериментах. Метод вирусной трансфекции обладает рядом преимуществ: простота метода (культивирование в течение 1 часа в условии инкубатора [17]), высокая эффективность (90%) и высокий уровень выживаемости клеток (порядка 90%). Важно отметить, что после вирусной трансфекции нет необходимости в дополнительном восстановлении клеток, можно их сразу трансплантировать. Максимальное количество меченых клеток (100%) было достигнуто при витальном мечении их мембранным флуоресцентным красителем РКН26 (Таблица 1). Также как и при вирусной трансфекции клетки, меченые мембранными метками РКН26, могут быть трансплантированы сразу после их мечения. Главным недостатком мечения клеток красителем РКН26 является то, что мембранная метка неустойчива к действию различных химических растворителей, применяемых при фиксации органов в парафин и иммуногистохимического окрашивания, поэтому последующую визуализацию клеток лучше проводить лишь на гистологических срезах, выполненных на криостате. Ещё одним недостатком является размывание красителя при делении клеток, поэтому данный метод не подходит для длительных экспериментов и экспериментов, подразумевающих пролиферацию трансплантированных клеток [M.L. Rand, 2002]. Передача метки дочерним клеткам без ослабления флуоресценции возможна лишь при мечении клеток аденовирусом или ретровирусом, несущим ген GFP.

На основании полученных результатов наиболее оптимальным методом мечения клеток был выбран метод мечения клеток аденовирусом, несущим ген EGFP.

Таблица 1

Сравнение различных методов мечения клеток

Название метода	Эффективность	Выживаемость клеток	Длительность сохранения флуоресценции	Необходимость восстановления клеток
Электропорация плазмиды pEGFP-N2	50%	30%	7 дней	12ч культивирования
С помощью специального реагента TurboFect	90%	70	10 дней	24ч культивирования
Вирусная трансфекция (аденовирус)	90%	70%	14 дней	нет
Флуоресцентный мембранный краситель PKH26	100%	50% (потери при промывании)	14 дней <i>in vivo</i> 1 месяц <i>in vitro</i>	нет

3. Сравнение методов трансплантации ЗКП. Меченые ЗКП были трансплантированы непосредственно во время операции частичной гепатэктомии. Нами было проведено сравнение двух методов введения: в селезёнку и в систему воротной вены.

При трансплантации ЗКП в селезёнку крыс EGFP-позитивные клетки были обнаружены только в самой селезёнке, в печени введённых клеток не было. Вероятно, это связано с тем, что ЗКП обладают высокой адгезией и поэтому остались в месте введения, в самой селезёнке, и кровеносного русла не достигли.

Напротив, при введении ЗКП в систему воротной вены в печени крыс были обнаружены EGFP-позитивные клетки, напоминающие по форме гепатоциты (рис. 2). Таким образом, при введении ЗКП в систему воротной вены клетки успешно достигают печени, встраиваются в паренхиму органа и участвуют в восполнении недостающей вследствие частичной

гептэктомии популяции гепатоцитов. Для трансплантации ЗКП предпочтительным является метод введения в систему воротной вены.

Подводя итог можно заключить, что наиболее эффективным для выделения ЗКП является метод коллагеназно-проназной перфузии печени крысы с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза, оптимальный метод мечения клеток – с помощью аденовируса, несущего ген GFP, а наилучший метод введения клеток – в систему воротной вены печени.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 09-04-97013-р_поволжье_а+нужен ли грант, который выполняется сейчас?

Литература:

1. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 125-172.
2. Knook D.L., Seffelaar A.M., de Leeuw A.M. Fat-storing cells of the rat liver. *Exp. Cell Res.* 1982; 132: 468-71.
3. Neufeld D.S. Isolation of rat liver hepatocytes / D.S. Neufeld // *Methods Mol Biol.* – 1997. – V. 75. – P. 145-151.
4. Engraftment assessment in human and mouse liver tissue after sex-mismatched liver cell transplantation by Real-Time Quantitative PCR for Y chromosome sequences / Ling-Jid Wung [et al.] // *Liver Transpl.* – 2002. – V. 8. – P. 822-82.
5. Homing of transplanted bone marrow cells in livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice / B.V. Nagwaelkharif [et al.] // *APMIS.* – 2010. – V. 118. – P. 277–287.
6. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep / J. Chamberlain [et al.] // *Hepatology.* – 2007. – V. 46. – P. 1935–1945.
7. Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone marrow mononuclear cell homing to the liver in a mouse model of acute hepatic injury /

S.Z. Jin [et al.] // *Dig Dis Sci.* – 2010. – V. 55, № 10. – P. 2805-2813.

8. Concurrent measurement of the survival of two populations of rabbit platelets labeled with either two PKH lipophilic dyes or two concentrations of biotin / M.L. Rand [et al.] // *Cytometry.* – 2002. – V. 47. – P.111–117.

9. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury / F.C. Popp [et al.] // *Stem Cells.* – 2007. – V. 25. – P. 639–645.

10. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury / Z.X. Zhang [et al.] // *Cytotherapy.* – 2008. – V. 10. – P. 134–139.

11. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion / Y. Sato [et al.] // *Blood.* – 2005. – V. 106. – P. 756–763.

12. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers / I. Aurich [et al.] // *Gut.* – 2007. – V. 56. – P. 405–415.

13. Liu Z. C. and Chang T.M.S. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model / Z. C. Liu and T.M.S. Chang // *Liver Transplantation.* – 2006. – V. 12. – P. 566-572.

14. Systemic infusion of FLK1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice / B. Fang [et al.] // *Transplant.* – 2004. – V. 78. – P. 83–88.

15. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes / S. Terai [et al.] // *J Biochem.* – 2003. – V. 134, № 4. – P. 551-558.

16. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis / Long-Jun Dai [et al.] // *Stem Cell Research.* – 2009. – V. 2. – P. 16–25.

17. Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза мононуклеарными клетками пуповинной крови человека, генетически модифицированными рекомбинантными аденовирусами / А.А. Ризванов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. VII, № 2. – С. 44.

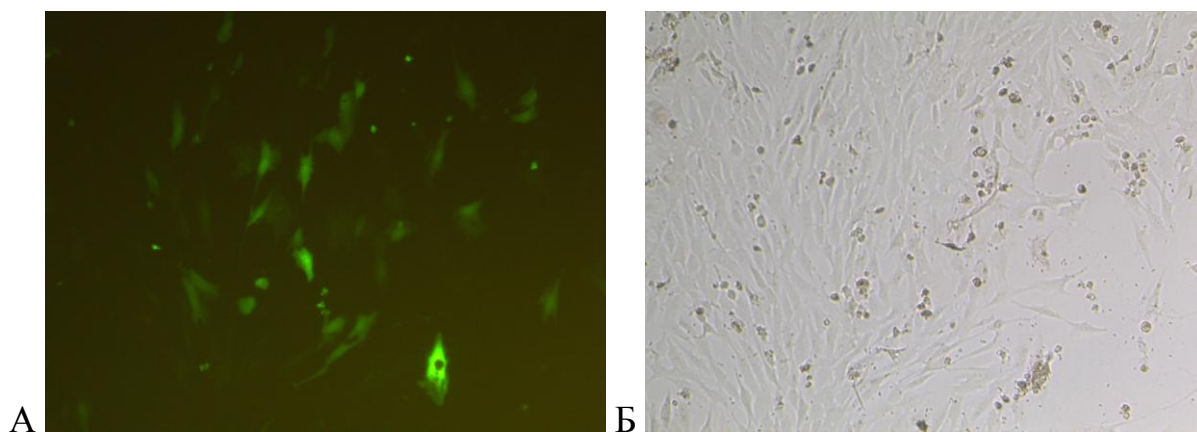


Рис. 1. Культура ЗКП на 3-ий день после мечения их плазмидой pEGFP-N2 с помощью специального реагента TurboFect: А – флуоресцентная микроскопия, Б – фазово-контрастная микроскопия, x10.

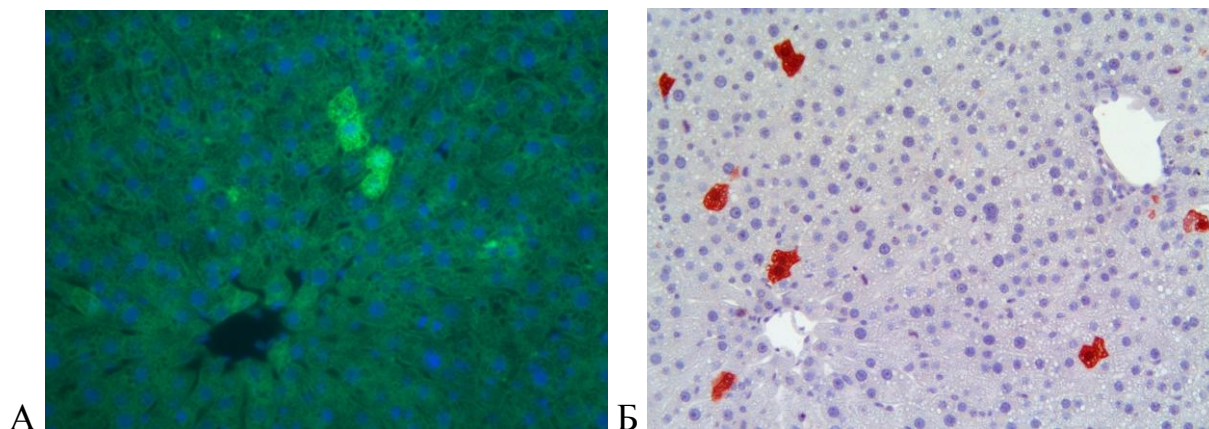


Рис. 2. Печень крысы на 2-е сутки после частичной гепатэктомии и трансплантации GFP+ ЗКП в систему воротной вены: А – иммунофлуоресцентное окрашивание печени, x40; Б – иммуногистохимическое окрашивание печени, x10.