

На правах рукописи

Сабурина Ирина Николаевна

**Трансплантация миобластов и стромальных клеток костного
мозга человека в скелетные мышцы мыши.**

03.00.30 - биология развития, эмбриология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

**МОСКВА
-2003-**

Работа выполнена на Кафедре эмбриологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в ЗАО "РеМеТэкс"

Научные руководители: чл.-корр.РАМН В.С.Репин
к.б.н. М.Л.Семенова

Официальные оппоненты: д.м.н. Н.В.Миронов
к.б.н. Т.Л.Маршак

Ведущая организация: Российский государственный
Медицинский университет
им. Н.И.Пирогова

Защита диссертации состоится "23" Октября 2003 года
в 15.30 часов на заседании диссертационного Совета Д.501.001.52 в
Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по
адресу: 119899, Москва, МГУ, Биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан "23" сентября 2003 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.



Е.Н.Калистратова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Последние исследования на млекопитающих свидетельствуют о том, что самообновление и репарация тканей идет за счет локальных и системных процессов. Генератором локального обновления являются региональные стволовые клетки, а источником системного обновления – стромальные клетки костного мозга (СККМ). В общем виде эта схема поддержания клеточного гомеостаза подтверждена и для тканей человека (Liechty K.W. et al., 2000). Если СККМ постоянно используются организмом для самообновления эндотелия и специализированной паренхимы, то региональные стволовые клетки выступают на первый план в случае интенсивной локальной репарации после травмы, вирусных и прочих местных поражений (Goodell et al., 1997). В работах последних лет показано, что в ходе процессов репарации регулируемая численность СККМ не только направленно поступает в зоны повреждения, но и направленно дифференцируется в региональные соматические клетки без побочных аномалий дифференцировки (Lagasse et al., 2000; Strauer et al., 2002). Эта закономерность обновления и репарации соматических клеток с помощью двух источников стволовых клеток сейчас используется в медицине для лечения многих наследственных, аутоиммунных и возрастных дегенеративных заболеваний. Клеточная заместительная терапия мышечной дистрофии Дюшенна начала апробироваться в клинике в начале 90-х годов XX века. Как известно, дистрофин-дефицитные мышечные волокна подвергаются быстрой дегенерации при сокращении. В скрытую фазу заболевания разрушение мышечных волокон компенсируется интенсивной регенерацией. Клиническая манифестация начинается в период роста детей, когда резервы регенерации не в состоянии компенсировать деградацию мышц. В экспериментах на животных и первых испытаниях в клинике было показано, что локальная массивная трансплантация однородных аллогенных миобластов, размноженных в культуре и инъецированных в

УСЛОВИТЕЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
03 1004 80

скелетные мышцы, приводит к образованию химерных мышечных волокон, способных синтезировать дистрофин (Law et al., 1997). Однако интенсивная региональная гибель миобластов после внутримышечного введения заставила искать альтернативные источники клеток. Наиболее продвинутыми оказались эксперименты с локальным и системным введением СККМ, но многочисленные работы по оценке эффективности трансплантации миобластов и СККМ в скелетные мышцы трудно интерпретируются, поскольку проводились не в стандартных условиях, с клетками, полученными разными способами, имеющими разный исходный фенотип. В опытах на разных линиях животных, в разную фазу заболевания использовались разные дозы клеток (Ohlendieck et al., 1991; Liu et al., 1998; Duclas et al., 1998; Piccolo et al., 2000; Young et al., 2001). В таких случаях только сравнительный анализ активности миобластов и СККМ в одних экспериментах и на одной выборке животных позволяет выявить разницу в поведении клеток.

Цели и задачи исследований. Целью данного исследования являлось изучение сравнительного поведения и судьбы эмбриональных миобластов и СККМ человека при их трансплантации в нормальные и дистрофин-дефицитные скелетные мышцы мыши идентичным методом. В связи с этим были поставлены следующие задачи: провести сравнение способности клеток разного происхождения участвовать в регенерации мышечных волокон; проанализировать пригодность различных популяций культивированных клеток для трансплантаций, их способность дифференцироваться в клетки соответствующего фенотипа; изучить возможности применения данных клеточных популяций при лечении наследственных заболеваний скелетной мускулатуры; разработать модель для проведения предклинической экспресс-оценки состояния этих клеток.

Научная новизна. В данной работе впервые была прослежена судьба пересаженных миобластов и СККМ в течение первых суток после введения. Было показано, что при введении миобластов и СККМ в скелетную мышцу подавляющая часть погибших клеток оставалась в

зоне введения, тогда как живые клетки выявляются исключительно в неповрежденных участках ткани, а миграционный фронт клеток формировался в течение первых 6 часов и зона распространения донорских клеток практически не увеличивалась в более поздние сроки. Если популяции мигрирующих миобластов наблюдались в области эндомизия интактных волокон, то СККМ накапливались преимущественно в эпимизии и перимизии тех же мышц. Данное распределение донорских клеток было подтверждено при анализе положения дистрофин-положительных донорских клеток в мышечной ткани мышей линии C57Bl/10J-mdx на сроках до 37 дней после трансплантации.

Результаты данного исследования показали, что происходит атипичское, не характерное для нормальных мышц мыши, распределение дистрофина при использовании для трансплантации культуры эмбриональных миобластов и СККМ, полученных из плодов 17-19 недель развития, а наилучшие результаты дала трансплантация культивированных миобластов, полученных из эмбрионов 9-11 недель развития.

Практическая значимость Полученные данные имеют существенное значение для клинической трансплантологии, поскольку доказывают различные способы и пути направленной миграции миобластов и СККМ в скелетной мышце. В работе впервые визуализирован и доказан факт преимущественной гибели пересаженных клеток в зоне введения. Эти данные в дальнейшем могут использоваться для улучшения эффективности трансплантации. Был разработан метод экспресс-оценки поведения трансплантированных клеток в тканях животного, который может быть применен для оценки пригодности разных популяций клеток для репарации поврежденных тканей при проведении предклинических испытаний. Предложенный метод может использоваться для оценки эффективности трансплантации не только в миологии, но и в кардиологии, неврологии, ортопедии.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены на научном семинаре кафедры эмбриологии биологического ф-та МГУ им. Ломоносова и представлены на Международном междисциплинарном семинаре «Новые технологии в медицине и экологии, интегративная медицина» (Словакия, 2003г.) и следующих конференциях: “Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении” (Москва, 2003); Всероссийская конференция “Гистологическая наука России в начале XXI века: итоги, задачи, перспективы” (Москва, 2003); 2-ой московский международный конгресс «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Объем и структура работы. Материалы диссертации изложены на 141 страницах машинописного текста и сгруппированы в следующие разделы: введение, обзор литературы, описание использованных методов, изложение результатов и выводы. Работа проиллюстрирована 92 микрофотографиями, графиками и рисунками, а также 9 таблицами. Список процитированной литературы содержит 171 источник (из них 32 работы отечественных авторов, в том числе и опубликованных в иностранных журналах, и 145 работ зарубежных авторов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

В качестве донорского материала использовался фетальный абортивный материал, полученный при искусственном прерывании беременности. Для получения первичной культуры миобластов фрагменты мышечных волокон, выделенных механически из закладки ягодичных мышц эмбрионов, соответствующих двум срокам гестации (7-12 нед. и 18-20 нед.), измельчали и подвергали ферментативной дезагрегации с использованием раствора диспазы, пипетировали до получения одноклеточной суспензии, центрифугировали (10 мин, 1000 об/мин.) и культивировали в ростовой среде ДМЕМ/F12 (1:1) с

добавлением 2 мМ L-глутамин; 50 мкг/мл гентамицина, ИТС (инсулин, трансферин, селенит, 1:100); EGF (epidermal growth factor, 20 нг/мл), и 20% эмбриональной телячьей сыворотки в плотности не менее 100тыс. кл/мл. При образовании миобластами плотного монослоя клетки дезагрегировали 0,05% р-ром трипсина и перепассировали; длительность культивирования составляла 16-35 дней, что соответствовало 4-7 пассажам. Для отдельных культур длительность культивирования составила более двух месяцев. Для индукции дифференцировки миобластов ростовую среду в культурах заменяли не каждые два дня, а через 5-6 дней. Для трансплантаций использовали клетки четвертого и пятого пассажей с общим сроком культивирования от 15 до 20 дней.

СККМ получали из бедренных костей плодов человека 17-19 нед. гестации путем промывания полости кости раствором Хэнкса с помощью иглы 16G, насаженной на шприц. Полученную суспензию центрифугировали (10 мин, 1000 об/мин, 2 раза), полученный клеточный осадок ресуспендировали в ростовой среде следующего состава: ДМЕМ/F12 (1:1), 2мМ L-глутамин, ИТС (инсулин, трансферин, селенит, 1:100), 50 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки и рассеивали в плотности не менее 1 млн. клеток / мл. Через 2-3 суток культивирования среду с не прикрепившимися кроветворными клетками костного мозга сливали, добавляли свежую среду, и продолжали культивировать оставшиеся прикрепленными ко дну чашки клетки стромы еще 8-12 сут, меняя среду каждые 3 суток. При достижении плотного монослоя культуру рассеивали в соотношении 1:2. Общая длительность культивирования составляла 18-20 дней. Для трансплантаций использовали первичные культуры СККМ или после первого пассажа.

Перед трансплантацией монослой миобластов и СККМ дезагрегировали, клеточную суспензию отмывали в растворе Хэнкса. Для визуализации клеток после трансплантации их окрашивали ядерным люминесцентным красителем бисбензими́дом (Hoechst 33342, Serva) по методике, используемой нами в предыдущих исследованиях

(Александрова, Сабурин и др., 2001). Перед каждой инъекцией клеток животным-реципиентам суспензию тщательно пипетировали.

Для визуализации живых и погибших клеток и анализа их распределения в тканях животного-реципиента мы использовали нижеследующую, разработанную нами методику двойного флуоресцентного окрашивания. Суспензию культивированных эмбриональных миобластов и СКМ человека окрашивали по следующей схеме: 1) для визуализации ядер суспензию клеток инкубировали в растворе бисбензимида (Hoechst 33342) в PBS в концентрации 0,02 мг/мл с последующей отмывкой в растворе Хенкса; 2) для выявления живых и мертвых клеток использовали LIVE/DEAD кит (Molecular Probes, L-23103) с флуоресценцией в красной части спектра; окрашивание суспензии клеток проводили в соответствии с протоколами производителя, но перед трансплантацией отмывки реактива не проводили. LIVE/DEAD кит, не оказывающий цитотоксического воздействия, предлагается фирмой Molecular Probes для выявления погибших клеток методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофотометрии. Клетки с поврежденной мембраной светятся в 100 раз ярче интактных, т.к. краситель проходит через мембраны погибших клеток и связывается со свободными аминогруппами как на поверхности, так и внутри клеток. Живые клетки окрашиваются слабо, поскольку в них краситель может взаимодействовать со свободными аминогруппами только на клеточной поверхности.

Эксперименты по трансплантации клеток проводили на лабораторных мышах линий ICR (самцы возраста 2-2,5 мес., n=40) и C57BL/10J-mdx (mucular dystrophy X-chromosome linked, самцы возраста 4-6 мес., n=29), выращенных в виварии кафедры эмбриологии МГУ им. М.В.Ломоносова. Мыши C57BL/10J-mdx страдают мышечной дистрофией, гистологически и генетически гомологичной мышечной дистрофии Дюшена/Беккера человека (Bulfield et al., 1984). Мутация mdx носит точечный характер, приводит к преждевременной терминации трансляции гена дистрофина (Sicinski et al., 1989) в

результате чего в мышечных волокнах отсутствует продукт его экспрессии. Эта линия мышечных клеток является всемирно признанной моделью для исследования патологического процесса, протекающего при миодистрофиях и широко используется в экспериментах по разработке методов лечения данных заболеваний.

Для экспериментов отбирали самцов в возрасте 10-12 недель. Перед трансплантацией клеток в мышечную ткань мышшь наркотизировали внутривентральным введением калипсола (кстамин гидрохлорид 500 мг/10мл в форме солянокислой соли, Гедон Рихтер АО, Венгрия) в расчете 0,004 мл на 1 грамм массы животного. В поверхностную и среднюю ягодичные мышцы (*m. gluteus superficialis*, *m. gluteus medius*) с помощью гамильтоновского шприца мышцам вводили клеточную суспензию в разведении 500 тыс. клеток в 1 мкл на глубину 2-3 мм по приведенной ниже схеме (таблица 1) или физиологический раствор в том же объеме (контрольная группа).

Через 30 минут, 2, 6 и 18 часов, 15 и 37 суток после проведенной операции мышшь умерщвляли путем дислокации шейных позвонков, диссектировали ягодичную мышцу, ориентировали ее на алюминиевой подложке для последующей резки поперек мышечных волокон и замораживали в жидком азоте.

Таблица 1: Схема трансплантаций эмбриональных клеток человека в скелетные мышцы мышши

Вид клеток	Время культивирования	Объем раствора	Общее кол-во клеток
Мнобласты, полученные от эмбрионов 9-ти нед. развития	20 дней, 4-ый пассаж	5 мкл (5 инъекций по 1 мкл)	2 500 000
Мнобласты, полученные от плодов 19-ти нед. развития	20 дней, 3-ий пассаж	5 мкл (5 инъекций по 1 мкл)	2 500 000
СККМ, полученные от плодов 19-ти нед. развития	19 дней, 1-ый пассаж	5 мкл (5 инъекций по 1 мкл)	2 500 000

Исследуемые кусочки мышц извлекали из жидкого азота и готовили серийные криостатные срезы толщиной 10 – 15 мкм,

высушивали их при комнатной температуре и просматривали под люминесцентным микроскопом (Axiovert 25, K. Zeiss) По люминесцентному свечению клеток, окрашенных бисбензими́дом, отбирали срезы с трансплантированными клетками.

Для визуализации специфического мышечного белка десмина в миоблестах, последние инкубировали с мышинными моноклональными антителами к десмину человека ("Biotrend"), а затем с антимышиными иммуноглобулинами кролика, конъюгированными с FITC ("Abcam") в течение 2 часов при 37°C. Дистрофин выявляли, инкубация криостатные срезы мышц с моноклональными антителами мыши к дистрофину человека (Abcam) в течение 2 часов при 37°C и с антимышиными иммуноглобулинами козы, конъюгированными с фикоэритрином (Abcam).

Для изучения миграционной способности трансплантированных клеток серийные срезы просматривали под люминесцентным микроскопом, отбирали те, на которых видна была зона прокола (идентифицировалось по массе LIVE/DEAD кит положительных клеток) и фотографировали цифровой камерой. На фотографиях измеряли треки (пути) бисбензими́д-положительных клеток, как наименьшее расстояние, отделяющее данную клетку от края зоны прокола. Статистическую обработку результатов проводили при помощи компьютерной программы Stadia 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Получение эмбриональных клеточных культур. В работе использовались фетальные ткани от 13-ти эмбрионов 7-12 недель развития (миобласты) и 5-ти плодов 18-20 недель развития (миобласты и СКМ). Выделенные миобласты вели на непокрытых пластиковых чашках Петри (d=90мм) в среде DMEM/F12 с добавлением 20% сыворотки. Более 80% миобластов, полученных из 7-12 нед. эмбрионов, после посева прикреплялись ко дну культуральной чашки в течение 1-3 часов, в то время как миобласты, полученные из 18-20 нед. плодов,

прикреплялись в течение 24-35 часов. Длительность культивирования миобластов, полученных от 7-12 недельных эмбрионов, составляла не менее 30 дней. При этом, достигая высокой плотности, клетки не сливались, оставаясь одноядерными и сохраняли свой миогенный фенотип (Рис. 1А). Для оценки чистоты и однородности культур использовали тест на десмин, коллаген I и коллаген III типа (определялась примесь фибробластов). Миобласты на 4-5 пассажах сохраняли до 95% десмин+ клеток, не содержали коллаген I+ и коллаген III+ клеток и при индуцированной дифференцировке формировали симпласты и миотубы (Рис. 1В).

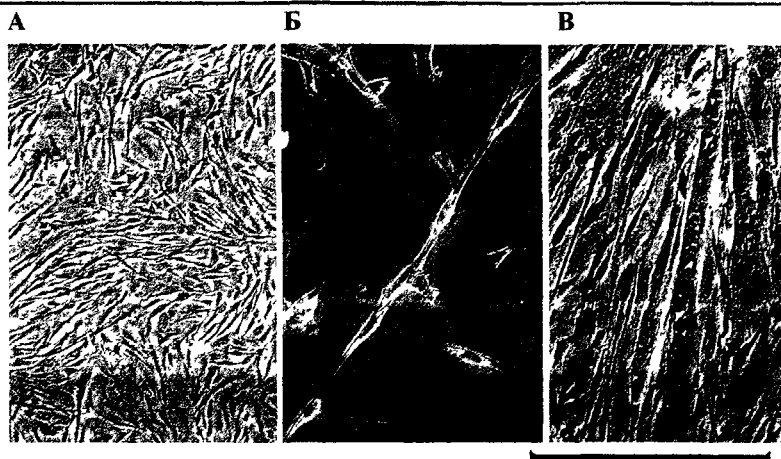


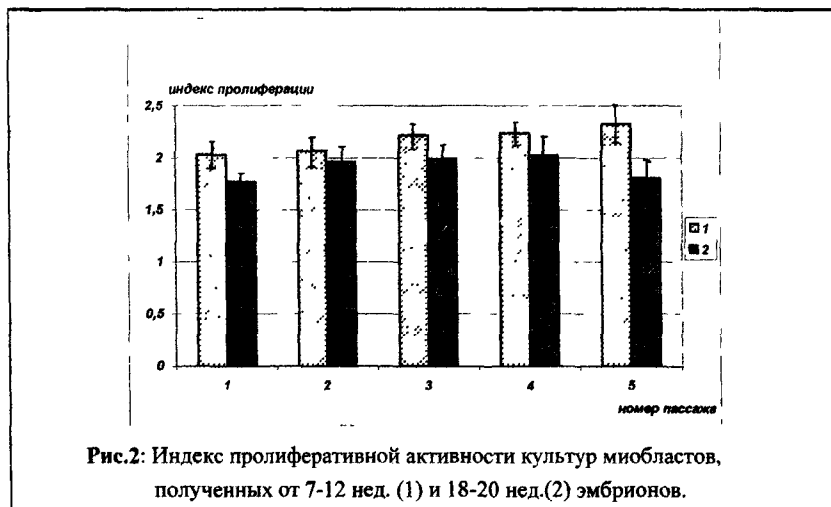
Рис.1. Культуры эмбриональных миобластов (фазово-контрастная микроскопия):

А – миобласты от 9-ти нед эмбрионов человека, 14 день культивирования; Б – миобласты от 19-ти. нед плодов человека, 2 день культивирования; В – индуцированная дифференцировка миобластов, 26 день культивирования; образование симпластов и миотубов. (Измерительный отрезок – 100, 40 и 60 мкм для А, Б и С соответственно)

При тех же самых условиях культивирования в культурах миобластов, полученных от плодов более поздних сроков, слияние отдельных клеток можно было увидеть уже на 2-3 день культивирования, клетки выстраивались в один ряд, образуя

протяженные цепочки (Рис. 1Б). Миобласты, полученные от плодов 18-20-ти нед. развития, сохраняли незрелый фенотип в течение 16-20 дней (3-4 пассажа).

При культивировании миобластов различалось время, необходимое для образования полного монослоя. Для миобластов, полученных от 7-12 нед. эмбрионов достаточно было 3-4 сут., а для миобластов, полученных от 18-20-ти нед. плодов требовалось не менее 5-6 сут. О пролиферативной активности клеточных культур миобластов судили по индексу пролиферации (отношение количества выросших за 4 дня клеток к числу посеянных) (рис. 2)



Если индекс пролиферативной активности для миобластов 7-12 нед. сохранялся высоким в течение 5 пассажей, то для миобластов 18-20 нед. индекс пролиферативной активности имел тенденцию к снижению к 5 пассажу.

В отличие от миобластов, для СККМ прикреплялись ко дну культуральных чашек только через 3 дня. Прикрепленная популяция состояла из двух морфологически различных типов фибробластоподобных клеток: больших расплывчатых и мелких игольчатых или веретеновидных (Рис. 3А). Плотный монослой из

СККМ образовывался лишь к 10 дню культивирования. Гетерогенность СККМ сохранялась при дальнейшем культивировании и отчетливо выявлялась при трипсинизации (Рис. 36)

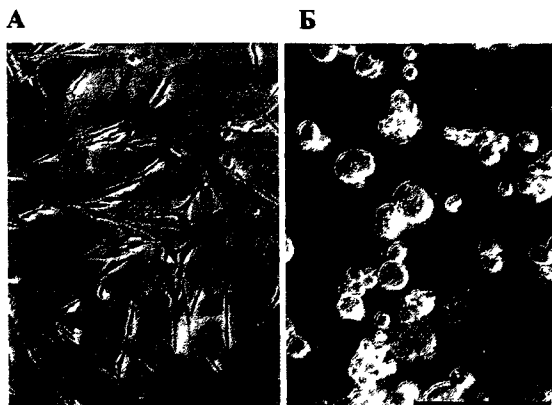


Рис. 3: Культуры эмбриональных СККМ (фазово-контрастная микроскопия): А – СККМ от 19-ти нед. плодов человека, 4-ый день культивирования; Б – СККМ после трипсинизации, 14 день культивирования; гетерогенность клеточной культуры. (Измерительный отрезок - 80мкм (А) и 40 мкм (Б))

Трансплантация эмбриональных миобластов и СККМ мышам линии C57Bl/10J-mdx. При трансплантации эмбриональных миобластов и СККМ, мышей C57Bl/10J-mdx разделили на 3 экспериментальные группы: первой (n=8) инъекцировали миобласты, полученные от эмбрионов 9-ти нед. развития, второй (n=8) - миобласты, полученные от плодов 19-ти нед. развития, а третьей (n=8) – СККМ, также полученные от плодов 19 нед. развития. Животным контрольной группы (n=5) параллельно вводили по 5 мкл физиологического раствора. Результаты этих экспериментов представлены на Рис.4-6. Мышечные волокна, положительно окрашенные на дистрофин, были обнаружены у всех мышей, которым инъекцировали эмбриональные клетки. Однако выявлялись существенные различия в локализации дистрофина в мышечной ткани в разных экспериментальных группах.

В группе животных, которым инъекцировали культивированные миобласты, полученные от эмбрионов ранних сроков развития (9 нед.), присутствие большого количества дистрофин-положительных волокон

выявлялось в области повреждения. Как правило, дистрофин располагался в кортикальной области мышечных волокон. Он выявлялся на препаратах сплошной светящейся линией по периметру срезованных поперек мышечных волокон (Рис. 4А).

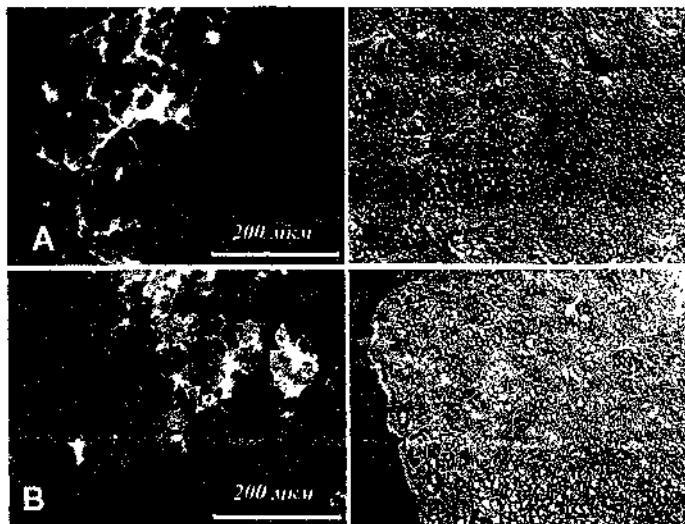


Рис. 4. Поперечные гистологические срезы ягодичной мышцы мыши, обработанные I антителами мыши к дистрофину человека и II антителами козы, конъюгированными с фикоэритрином.

А, Б – распределение дистрофина через 37 дней после трансплантации миобластов от 9-ти нед. эмбрионов человека; дистрофин присутствует во всех мышечных волокнах, находящихся непосредственно около области инъекции и занимает в них периферическое положение в кортикальной области волокна, характерное для нормальных мышечных волокон;

В, Г – распределение дистрофина через 37 дней после трансплантации миобластов от 19-ти нед. плодов человека: атипичное распределение дистрофина выражено в диффузном свечении цитоплазмы дистрофин-положительных волокон.

(А, В – люминесцентная, Б, Г – фазово-контрастная микроскопия)

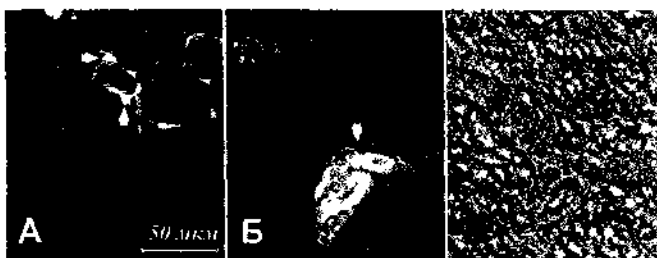


Рис. 5. Распределение дистрофина в мышечных волокнах через 37 дней после трансплантации миобластов от 19-ти. нед плодов человека (обработка антителами к дистрофину); стрелками показаны мелкие дистрофин-положительные клетки, прилегающие к регенерировавшим мышечным волокнам.

(А, Б – люминесцентная, В – фазово-контрастная микрофотография участка, представленного на фотографии Б)

Такое распределение дистрофина соответствовало его локализации у мышей нормального фенотипа. На всех препаратах интенсивность свечения фикоэритрина ослабевала по мере удаления от места введения эмбриональных клеток. На периферии дистрофин-положительной области в большинстве мышечных волокон наблюдалась лишь частичная флуоресценция в кортикальной области. Уровень и морфологический характер гетерогенности клеток совпадал с результатами, описанными в других работах (Colter et al., 2001; Poulson et al., 2002; Hung et al., 2002)

Второй группе животных инъецировали миобласты, полученные от плодов 19-ти нед. развития. У всех животных этой группы так же обнаружены зоны дистрофин-положительных мышечных волокон, располагающихся в области прокола. Периферическое свечение фикоэритрина соответствовало распределению дистрофина в мышечных волокнах с нормальным фенотипом. Однако, во внутренней зоне дистрофин-положительной области, прилегающей непосредственно к месту прокола, были обнаружены группы волокон с

атипичным расположением дистрофина. Кроме более яркого свечения по периферии наблюдалось выраженное диффузное свечение всего мышечного волокна (Рис. 4В; Рис 5Б). На периферии дистрофин-положительной области, также как и у животных первой группы обнаруживались волокна с частичным, очаговым свечением кортикальной области (Рис. 5А, Б).

Животным третьей группы инъецировали СККМ, полученные от плодов 19-ти недель развития. У всех животных этой группы вокруг места введения клеток в мышечной ткани наблюдались дистрофин-положительные области с нетипичным распределением флуоресцентной метки. Дистрофин в основном располагался вдоль крупных соединительнотканых оболочек мышц (по эпимизию и в основном по перимизию) (Рис. 6А, В, Д), причем свечение фикоэритрина распределялось не равномерно вдоль соединительнотканной оболочки, а в виде дискретных, ярких очагов. Кроме такого нетипичного распределения дистрофина, редко встречались мышечные волокна с нормальным его распределением по кортикальному слою.

Но во всех трех экспериментальных группах при введении различных клеточных культур дистрофин положительные области, соответствующие зоне расположения транспортированных клеток занимали локальные ограниченные области в мышечной ткани и располагались вокруг зон введения эмбриональных клеток.

Исследование распространения эмбриональных миобластов и СККМ в мышечной ткани в первые сутки после трансплантации.

Для анализа процесса формирования зоны распространения трансплантированных клеток в первые часы после пересадки была разработана методика двойного флуоресцентного мечения клеток перед инъекцией, о которой говорилось в разделе материалов и методов. После стандартного окрашивания бисбензимидам клетки ресуспензировали в растворе, содержащем некролит и затем суспензию меченных клеток инъецировали в ягодичную мышцу мышей ICR по

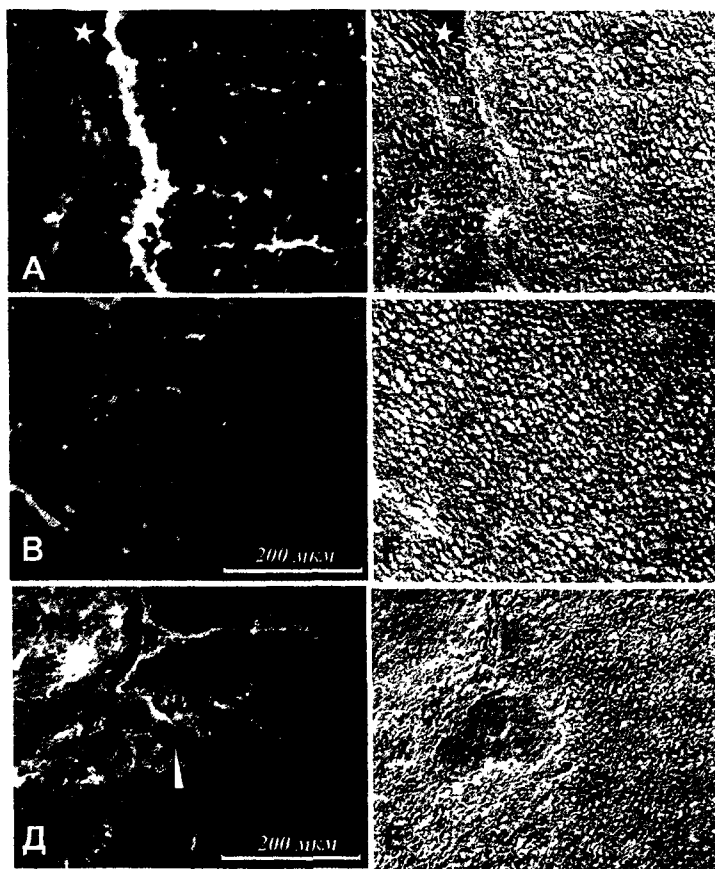


Рис 6. Поперечные гистологические срезы ягодичной мышцы мыши через 37 дней после трансплантации эмбриональных СККМ человека (обработка антителами к дистрофину); показано расположение дистрофин-положительных клеток преимущественно в области перимизия и эпимизия:
 А, Б – центральная область распределения дистрофина; В, Г – краевая область распределения дистрофина; Д, Е – единично встречающиеся мышечные волокна с нормальным распределением дистрофина (показано стрелкой).
 (А, В, Д – люминесцентные микрофотографии и Б, Г, Е – фазово-контрастные микрофотографии соответственно).

методике, описанной выше. В этой серии экспериментов были исследованы криостатные срезы мышцы следующих групп животных с введением СКЖМ (0,5; 2; 6 и 18 часов после трансплантации, n=5 в трансплантации n=5 в каждой группе)

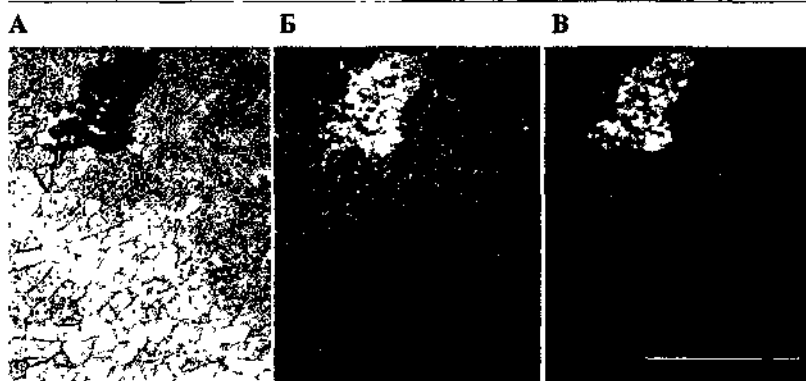


Рис. 7. Гистологические срезы мышечной ткани, окрашенный для выявления живых и погибших трансплантированных клеток (миобласты, 0,5 часа после инъекции)

А – фазово-контрастная микрофотография; Б – распределение клеток, окрашенных бисбензимином в мышечной ткани вокруг зоны прокола; В - скопление погибших клеток в зоне прокола.

(длина измерительного отрезка - 200 мкм)

Через 0,5 часа после инъекции вокруг прокола формировалась зона распространения трансплантированных клеток. При этом погибшие клетки (имеющие ядра, окрашенные бисбензимином и цитоплазму, окрашенную китом LIVE/DEAD) располагались в виде скопления непосредственно в зоне прокола, а живые клетки, демонстрирующие только свечение бисбензимида, находились в толще мышечной ткани вокруг зоны прокола, в неповрежденных мышечных волокнах (Рис. 7). Та же картина распределения живых и погибших клеток была обнаружена через 2, 6 и 18 часов после инъекции. Результаты данного исследования показывают, что в первые часы после инъекции клеток происходит миграция трансплантированных клеток, а

не инфузия всей массы клеток в результате избыточного давления при инъекции, так как в этом случае наблюдалось бы равномерное распределение на срезах живых и погибших клеток. Очевидно, все погибшие клетки остаются в зоне прокола в виде агрегатов, а жизнеспособные клетки мигрируют вглубь мышечной ткани.

При трансплантации эмбриональных миобластов и СККМ уже через 2 часа наблюдались существенные различия в распределении разных популяций клеток в мышечной ткани. Эмбриональные миобласты распространялись в мышечной ткани равномерно вокруг зоны прокола, причем большее количество бисбензимидаположительных клеток наблюдалось ближе к месту введения. При введении СККМ меченые клетки наблюдались на более дальних расстояниях от зоны прокола, чем миобласты, при этом бисбензимидаположительные клетки располагаются в виде цепочек вдоль соединительно-тканной оболочки мышцы (в основном в перимизии). Статистическую обработку результатов измерений, включающую в себя анализ типа распределения, проводили при помощи программы Stadia 6.0. Так как при анализе значений выборок было выяснено, что во всех случаях распределение отличалось от нормального, для проведения сравнений использованы не выборочные средние, а медианы выборок; анализ проводили при помощи непараметрических критериев сдвига (критерии Вилкоксона и Ван дер Вердена). Гистограммы распределений, представленные на Рис. 8, дают возможность предположить, что как при трансплантации миобластов, так и при трансплантации СККМ методом локального введения, в суспензии присутствовали клетки с разной способностью к миграции вглубь мышечной ткани реципиента. Большая часть миобластов мигрировала на расстояние до 2000 мкм. При трансплантации СККМ наблюдались 2 клеточные субпопуляции мигрирующих клеток. Первая – клетки с невысокой способностью к миграции, которые располагались на расстоянии до 1000-1500 мкм от зоны введения и вторая популяция – активно мигрирующие клетки, которые наблюдались на расстоянии 1500-4000 мкм. Наличие достоверных различий при сравнении выборок,

соответствующих 0,5, 2 и 6 часам после трансплантации клеток свидетельствует об увеличении зоны распространения трансплантированных клеток (как миобластов, так и СККМ) в этот период времени.

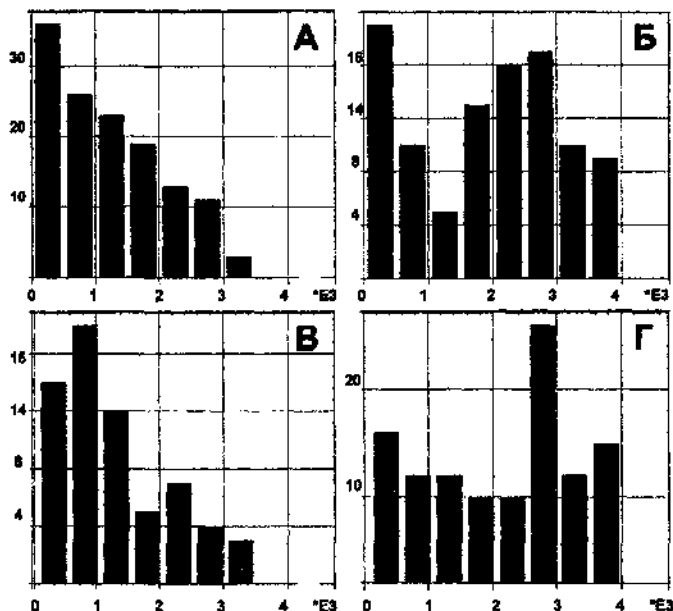


Рис. 8: Гистограммы распределения расстояний, отделяющих трансплантированные клетки от инъекционного трека: миобласты через 6 (А) и 18 часов (В) и СККМ через 6 (Б) и 18 часов (Г) часов после инъекции.
(по оси абсцисс отложено расстояние в микрометрах, по оси ординат – количество клеток)

Однако, при сравнении медиан выборок, соответствующих 6 и 18 часам достоверных различий не было выявлено как для миобластов, так и для СККМ. Эти результаты свидетельствуют о том, что при локальной инъекции эмбриональных клеток в мышечную ткань, зона распространения этих клеток формируется в первые 6 часов и в последствии практически не увеличивается. Эти данные совпадают с нашими результатами, полученными при анализе распределения

дистрофин-положительных клеток в мышечной ткани мыши после трансплантации эмбриональных миобластов и СККМ. На более поздних сроках (более месяца) после трансплантации донорские клетки также располагаются в виде ограниченных локальных областей вокруг зон введения. В наших предыдущих работах было показано, что прогениторные клетки других типов тоже обладают достаточно ограниченной способностью к миграции вглубь тканей животного реципиента. Нейральные прогениторные клетки при трансплантации в мозг крыс мигрировали на расстояние от 200-300 мкм до 1500-2000 мкм от места инъекции (Александрова и др., 2001). По-видимому, расстояния в несколько миллиметров является предельным значением при миграции трансплантированных прогениторных клеток в ткани реципиента.

ВЫВОДЫ

1. Налажен метод стандартного получения однородной культуры эмбриональных миобластов человека (ЭМЧ) из фетальной ткани 7-12 нед и 18-20 нед развития. Миобласты на 4-5 пассаже сохраняли до 95% десмин-положительных клеток, не содержали коллаген I-положительных и коллаген III-положительных клеток. До 90% миобластов формировали миотубы *in vitro*.
2. Показано, что трансплантации ЭМЧ 7-12 нед развития в скелетную мышцу mdx мышей вели к стабильному периферическому встраиванию дистрофин-положительных клеток в кортикальный зоне поврежденных/регенерирующих мышечных волокон mdx мышей. Трансплантация ЭМЧ 19 нед. развития приводила к достоверному увеличению химерных мышечных волокон с интенсивным диффузным свечением всего мышечного волокна. Причины этих различий не установлены.
3. Аналогичная трансплантация СККМ в скелетную мышцу mdx мышей вела к накоплению пересаженных дистрофин-положительных клеток в перимизии/эпимизии.
4. Для изучения судьбы пересаженных ЭМЧ и СККМ разработан метод количественной оценки распределения живых/погибших клеток в первые сутки после введения.
5. Этим методом установлено, что при введении ЭМЧ и СККМ в скелетную мышцу преобладающая часть погибших клеток оставалась в зоне введения, тогда как живые клетки выявлялись исключительно в неповрежденной ткани. Миграционный фронт клеток формировался в течение первых 6 часов и практически не изменялся в более поздние сроки.
6. Этим же методом выявлены 2 субпопуляции СККМ с разной способностью к миграции в мышечной ткани.
7. Показано, что популяция мигрирующих миобластов наблюдалась в области эндомизия интактных волокон, а СККМ накапливались преимущественно в эпимизии и перимизии тех же мышц.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. М.А. Александрова, И.Н. Сабурин, Л.И. Корочкин, А.В. Ревещин, В.С. Репин, А.А. Ржанинова, Г.Т. Сухих. Поведение и дифференцировка нейрональных стволовых клеток *in vivo*// Известия АН. Серия биологическая. 2001, 6, 656-665.
2. М.А. Александрова, Р.А.Полтавцева, М.В. Марей, А.В. Ревещин, И.Н. Сабурин, И.В. Дубровина, Л.И. Корочкин, Г.Т. Сухих. Трансплантация культивированных нейральных прогениторных клеток человека в мозг крыс: миграция и дифференцировка. //Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2001, 132, 10, 455-458.
3. М.А. Александрова, И.Н. Сабурин, Р.А.Полтавцева, М.В. Марей, И.В. Дубровина, А.В. Ревещин, Л.И. Корочкин, Г.Т. Сухих. Миграция и развитие нейральных стволовых клеток человека при трансплантации в мозг крыс. //Цитология, 2001, 43, 9, 838.
5. М.А. Alexandrova, I.N. Saburina, R.A. Poltavtseva, A.V. Revistchin, L.I. Korochkin, G.T. Sukhikh. Behavior of human neural progenitor cells transplanted to rat brain. //Development Brain Research, 2001, V.132 №1-2, P3-1.
6. Сабурин И.Н., Ржанинова А.А., Семенова М.Л., Голиченков В.А., Репин В.С. Трансплантация культивированных миобластов в скелетные мышцы мыши./ Международный междисциплинарный семинар "Новые технологии в медицине и экологии, интегративная медицина" Татры, Словакия, 2003, С.107-111.
7. Сабурин И.Н., Семенова М.Л., Томм Н.А., Ржанинова А.А., Голиченков В.А., Репин В.С. Трансплантация эмбриональных миобластов и стромальных клеток костного мозга человека в скелетную мышцу мышей линии C57BL/10J-mdx. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. в печати.

1249

РНБ Русский фонд

2004-4

25069

Отпечатано в кооперативе «Учебная полиграфия»
Москва, Ленинские горы, МГУ, 1 Гуманитарный корпус.
www.stprint.ru e-mail: zakaz@stprint.ru тел 939-3338
Заказ № 375, тираж 50 экз. Подписано в печать 23. 09. 2003 г.