

Регенерация гепатопанкреаса речных раков после трансплантации клеток костного мозга мышей-доноров

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹, Г.Д. Капанадзе¹,
О.И. Степанова¹, Ж.О. Курищенко¹, Н.В. Петрова¹

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства», Московская область

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, scbmt@yandex.ru

Эксперимент показал успешную регенерацию гепатопанкреаса речных раков после ксенотрансплантации им стволовых клеток мышей-доноров.

Ключевые слова: стволовые клетки, гидробионты, речные раки, гепатопанкреас.

Введение

Регенеративная терапия с использованием своих или чужих стволовых клеток на сегодняшний день уже стала реальностью. Выявлено, что стволовые клетки обладают высокой миграционной и регенеративной способностью. Принцип действия стволовых клеток заключается в их уникальных свойствах: стимулирование ангиогенеза, способность к практически бесконечному воспроизведению себе подобных, возможность дифференцироваться в зависимости от микроокружения.

В основном, источником стволовых клеток является костный мозг и пуповинная кровь. Проллиферативный потенциал эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и способность к дифференцировке делает их уникальными. Вместе с ЭСК появилась возможность изучения процессов дифференцировки клеток на ранних этапах развития эмбрионов, внесения генетических изменений в развивающийся организм, создания модель-

ных животных для разработки методов лечения различных заболеваний. Впервые эмбриональные стволовые клетки человека были получены в работе [10]. Дифференцированные производные ЭСК человека могут быть использованы для восстановления функциональности тканей при широком спектре заболеваний, связанных с утратой клетками возможности нормально функционировать. Сюда относятся нейродегенеративные заболевания, повреждения ЦНС, заболевания сердца, диабет и другие [7, 9, 3].

Выявлено, что у беспозвоночных животных с бесполом размножением стволовые клетки тотипотентны и, тем самым, подобны половым. Подобны их общая морфология, включая и ультраструктурный уровень (герминальные тела), экспрессия гена *vasa*, активность щелочной фосфатазы и, вероятно, теломеразная активность, обеспечивающие тотипотентность и потенциальное бессмертие этих клеток. Активность теломеразы показана для самообновляющихся

клеток колониальной асцидии *Botryllus schlosseri* [5, 6]. Получены свидетельства общности и эволюционного консерватизма морфологических и функциональных характеристик тотипотентных стволовых клеток представителей различных таксонов многоклеточных животных: книдарии, турбеллярии, корнеголовые ракообразные и млекопитающие [8, 4, 1].

Целью нашей работы являлось моделирование патологии у альтернативных биомоделей – беспозвоночных гидробионтов, выявление возможности межвидовой трансплантации клеток костного мозга (ККМ) мышей пойкилотермным гидробионтам, а также коррекция патологии гепатопанкреаса речных раков с помощью стволовых клеток.

Решение проблемы межвидовой трансплантации стволовых клеток систематически отдаленных видов позволит в перспективе найти другие источники стволовых клеток, такие как циркулирующие жидкости пойкилотермных гидробионтов.

Материалы и методы

Объектами настоящего эксперимента являлись длиннопалые речные раки *Pontastacus leptodactylus*.

Раки содержались в аквариумах объемом 160 л, с принудительной аэрацией и водоочисткой. Температура воды находилась в пределах 16-17°C; pH – 6,9-7,1. Кормление раков производилось личинками хирономид по поедаемости.

Мечение раков проводили лаком для ногтей (рис. 1).



Рис. 1. Речной рак с метками на карапаксе.

Раки были распределены на 4 группы (см. табл. 1).

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных – 30-40 мин). Исследовали жизнеспособность клеток гемопоэтической и стромальной фракций ККМ по окраске трипановым синим.

Забор ККМ проводили у мышей-доноров, содержащих ген зеленого белка (GFP), под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с суставами и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца (1 мл и 2 мл) вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали вместе с лизирующим раствором (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из рас-

Таблица 1

Группы речных раков в эксперименте

Группа 1 n=7	Группа 2 n=12	Группа 3 n=12	Группа 4 n=12
Интактный контроль	Без патологии	С искусственно вызванной патологией гепатопанкреаса (однократное введение Аллоксана в дозе 50 мг/кг)	
	Введение стволовых клеток в дозе 10 млн ККМ	Без введения ККМ	

чета 1:4 в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре 22°C. Затем надосадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую от эритроцитов и полученную смесь клеток ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ HEPES; 0,58 г/л глутамина; 100 мкг/л гентамицина; 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA); 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO₂-инкубаторе, атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности в течение 3-х суток [2].

Через 3 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых неприкрепившихся гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластанных фибробластоподобных клеток – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Полученная смешанная культура из гемопоэтических и стромальных ККМ мышей-доноров вводилась в вентральный синус речных раков в дозе 8-10 млн ККМ на 15-е сутки после создания модели патологии гепатопанкреаса.

Вскрытие опытных объектов производилось под хлороформным наркозом на 7-й, 14-й и 21-й дни после введения ККМ.

Индекс гепатопанкреаса рассчитывали как отношение массы органа к массе тела и выражали в процентах.

Гистологические исследования проводили с помощью цифровой микроскопии препаратов, которые готовили следующим образом. Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином.

Результаты и их обсуждение

На 9-14-й день после введения аллоксана (группы 3 и 4) погибли 4 рака (1 самец и 3 самки). Консистенция гепатопанкреаса – от плотной до дряблой, цвет светло-коричневый или желто-коричневый (рис. 2А, Б).

При плановом вскрытии раков (рис. 2В, Г) обнаружено, что цвет гепатопанкреаса в разных группах был различным. Индексы гепатопанкреаса в опытных группах не имели достоверных отличий от контроля (табл. 2).



Рис. 2. Вскрытие речных раков. А – самка, гонады буро-серого цвета; Б – самка, гепатопанкреас желто-коричневый; В – самка, гонады светло-коричневые, гепатопанкреас болотно-зеленого цвета; Г – самец, гонады белые, гепатопанкреас коричневый.

Таблица 2

Показатели гепатопанкреаса в эксперименте

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Цвет органа	Зелено-серый	Зелено-серый	Темно-зеленый, коричневатый, в одном случае с желтоватыми очагами	Темно-зеленый, иногда с черными очагами или ярко-желтый
Индекс, %	4,24±1,06	4,26±1,64	4,34±0,20	4,19±0,14

Гистологические исследования показали, что при моделировании патологии аллоксаном в дозе 50 мг/кг в гепатопанкреасе речных раков происходят следующие изменения: усиление вакуолизации R-клеток, местами некроз групп этих клеток вплоть до некроза единичных трубочек. F- и B-клетки просматриваются плохо, либо вообще не дифференцируются; инфильтра-

ция гемоцитами интертубулярной стромы (от незначительной до умеренной). Отек стромы (от умеренного до выраженного). На 14-е сутки после введения аллоксана гепатопанкреас представлен отдельно расположенными трубочками, выстланными уплощенными эпителиальными клетками, просвет резко расширен, заполнены густым секретом (рис. 3).

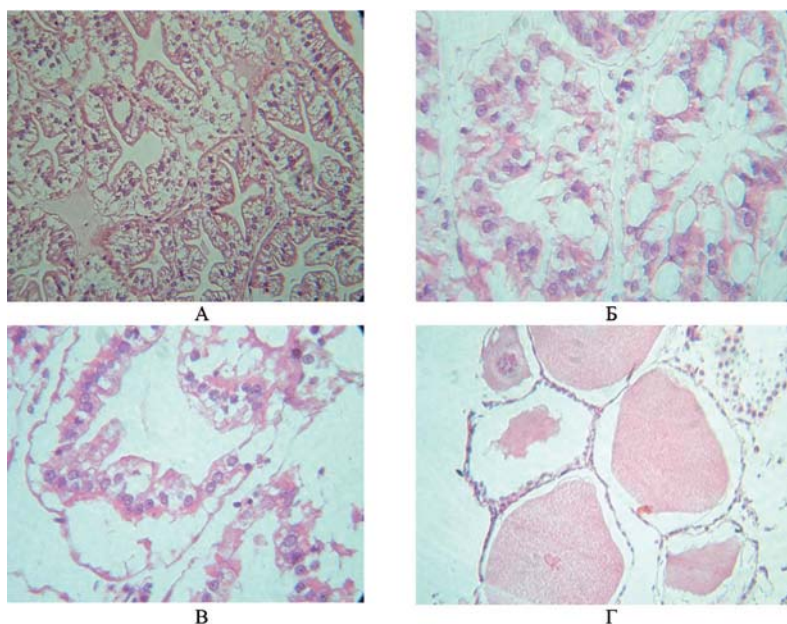


Рис. 3. Гистологические исследования.

А – выраженная вакуолизация R-клеток, снижение количества B-клеток, отек интратубулярной стромы. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x200.

Б – вакуолизация R-клеток, местами разрушение стенок B-клеток. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

В – выраженная вакуолизация R-клеток, B-клетки единичные, отек интратубулярной стромы. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

Г – гепатопанкреас рака на 14-е сутки после введения аллоксана. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x200.

Регенерация

После введения стволовых клеток речным ракам (через 14 суток) мы наблюдали картину восстановления гепатопанкреаса: вакуолизация цитоплазмы R-клеток уменьшалась (большинство вакуолей мелкие). Форма и положение ядра не изменены. Местами отек (от незначительного до умеренного) интертубулярной стромы с неравномерно выраженной, преимущественно незначительной инфильтрацией рыхло расположенными гемоцитами. F-клетки просматриваются плохо. Просветы трубочек в большинстве полей зрения свободны (рис. 4).

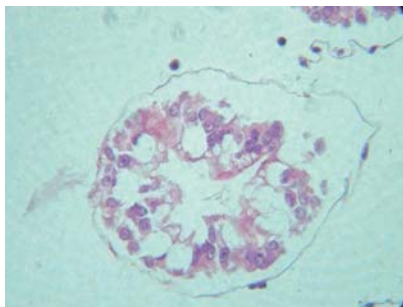


Рис. 4. Признаки регенерации патологически измененного гепатопанкреаса речного рака. Снижение вакуолизации R-клеток (снижение как количества, так и величины вакуолей). В-клетки хорошо просматриваются, их количество не уменьшено. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

Заключение

Таким образом, после введения клеток костного мозга мышей в организме речных раков с искусственно вызванной аллоксаном патологией происходит восстановление гепатопанкреаса.

Список литературы

1. *Исаева В.В., Шукалюк А.И., Ахмадиева А.В.* Стволовые клетки беспозвоночных животных с репродуктивной стратегией, включающей бесполое размножение // Биология моря. 2007. Т. 33. № 1. С. 3-1.
2. *Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Кapanадзе Г.Д., Ревякин А.О., Денгина С.Е.* Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.
3. *Прыжкова М.В., Лагарькова М.А.* Стволовые клетки: современные тенденции исследований // Онтогенез. 2004. № 6. Т. 35. С. 473-475.
4. *Akhmadieva A.V., Shulalyuk A.I., Isaeva V.V.* Interstitial cells in reproductive strategy of colonial hydroid *Obelia longissima* // Amer. Soc. Cell Biol. 45th Annu. Meet. (San Francisco, December, 2005): Molecular Biology of the Cell. 2005. Vol. 16. No. 11 (suppl.). P. 752.
5. *Federico Quaini M.D., Konrad Urbanek M.D., Antonio P., Beltrami M.D., Nicoletta Finato M.D., Carlo A. Beltrami M.D., Bernardo Nadal-Ginard M.D., Ph.D. Jan Kajstura Ph.D. Annarosa Leri M.D., Piero Anversa M.D.* Chimerism of the Transplanted Heart // N. Engl. J. Med. 2002; 346:5-15.
6. *Laird D.J., Weissman I.L.* Telomerase maintained in self-renewing tissues during serial regeneration of the urochordate *Botryllus schlosseri* // Develop. Biol. 2004. Vol. 273. P. 185-194.
7. *Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001. 414: 105-111.
8. *Rybakov A.V., Shukalyuk A.I.* Thylacoplethus a new species of colonial rhizocephalans (Crustacea: Rhizocephala: Thompsoniidae) parasitic on a northwest Pacific hermit crab *Pagurus trigonocheirus* (Stimpson) // J. Mar. Biol. Assoc. UK. 2004. Vol. 84. P. 1009-1017.
9. *Stojkovic M., Lako M., Strachan T., Murdoch A.* Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells // Reproduction. 2004. N. 128. P. 259-267.
10. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. 1998. N. 282. P. 1145-1147.

Regeneration hepatopancreas of crayfish after transplantation of stem cells from mice-donors

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze,
O.I. Stepanova, Zh.O. Kurischenko, N.V. Petrova

The experiment showed successful regeneration of hepatopancreas of crayfishes after a xenotransplantation of stem cells from mice-donors.

Key words: stem cells, hydrobionts, crayfishes, hepatopancreas.