

## Влияние трансплантации стволовых клеток мышей на регенерацию конечностей аксолотлей

Г.И. Пронина<sup>1</sup>, Н.Ю. Корягина<sup>2</sup>, А.О. Ревякин<sup>1</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>1</sup>,  
О.И. Степанова<sup>1</sup>, Ж.О. Курищенко<sup>1</sup>, Н.В. Петрова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar\_info@mail.ru

Для изучения регенерации была ампутирована часть передней конечности аксолотлей до локтевого сустава. Выявлено, что ксенотрансплантация экспериментальным аксолотлям стволовых клеток мышей-доноров ускоряет регенерацию удаленных конечностей.

**Ключевые слова:** регенерация тканей, стволовые клетки, аксолотли.

### Введение

Клеточная терапия – один из эффективных методов современной медицины. Она основана на лечении различных заболеваний при помощи трансплантации стволовых клеток и тканей.

Стволовые клетки – это структуры, обладающие способностью трансформироваться во взрослые и функционально активные клетки различных органов. Основным свойством любой стволовой клетки является ее потентность, определяемая степенью дифференцировки и пролиферации, на чем основана их классификация [10, 11]:

1) тотипотентные клетки способны формировать все эмбриональные и экстра-эмбриональные типы клеток. К ним относятся только оплодотворенный ооцит и бластомеры 2-8 клеточной стадии.

2) плюрипотентные клетки способны формировать все типы клеток эмбриона. К ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые

клетки и клетки эмбриональных карцином.

3) другие типы стволовых клеток локализуются в сформировавшихся тканях взрослого организма (adult stem cells) и называются взрослыми, регионарными, или тканевыми, стволовыми клетками. Они варьируют по способности к дифференцировке от мульти- до унипотентных.

Однако в последние годы чаще используется классификация стволовых клеток по источникам их выделения: эмбриональные, фетальные (выделенные из абортивного материала) и стволовые клетки взрослого организма.

Для лечения различных заболеваний чаще всего используют аутотрансплантацию или пересадку от особи того же вида стволовых клеток, полученных из костного мозга [9, 13, 15, 18, 21, 22].

Нами показана возможность отдаленной межвидовой трансплантации стволовых клеток мышей-доноров гидробионтам (рыбам и речным ракам) с

искусственно вызванной патологией паренхиматозных органов [3, 4, 5, 8]. Выявлено, что введение стволовых клеток мышцей стимулирует репродуктивную активность половозрелых речных раков, а именно оплодотворение и откладку икры [5].

Т.к. стволовые клетки – это недифференцированные клетки и обладающие способностью к пролиферации и дифференциации, то можно предположить, что в организме реципиента они будут стимулировать регенерацию и ускорять этот процесс.

Если у тритона или аксолотля удалить конечность на любом расстоянии от ее основания, то утраченная часть восстанавливается. На конце культи образуется бугорок из внешне недифференцированных клеток, покрытый эпидермисом, – т.н. «регенерационная бластема». В результате роста и дифференцировки бластемы из нее образуются именно те части конечности, которые должны быть расположены дистально от места ампутации.

На длительность процесса регенерации оказывают сильное влияние температура, кормление и возраст животных. У молодых животных при комнатной температуре и обильном кормлении восстановление утраченных конечностей обычно занимает 3-4 недели.

Процесс регенерации утраченных конечностей во многом сходен с процессом их формирования во время эмбрионального развития. Как выяснилось, это сходство не только внешнее. Оба процесса регулируются одними и теми же генно-регуляторными каскадами – Wnt/beta-catenin и BMP. «Включая» и «выключая» отдельные гены – участники этих каскадов, можно не только

«отключить» регенерацию у животных, способных к ней, но и «включить» ее у тех животных, которые эту способность потеряли. В частности, ученым удалось таким путем «включить» процесс регенерации утраченного крыла у цыпленка [16].

С помощью генно-инженерных экспериментов показано, что регенерация конечностей у позвоночных регулируется теми же ключевыми регуляторными белками, которые управляют развитием конечностей у эмбриона. Эти белки образуют два сигнально-регуляторных каскада, которые называются Wnt/beta-catenin. Был сконструирован вирус, в геном которого был встроен ген белка Axin1. Этот белок блокирует работу Wnt-каскада. Введение вируса аксолотлю снизило способность к регенерации [14, 17].

Обнаружено, что клетки бластоцели неидентичны, хотя ещё и не являются клетками тех или иных тканей. Поэтому, например, бывшие клетки мышечной ткани производят только мышцы, клетки нервных волокон – новые нервы, клетки кожи – кожу, и т.д. Кроме того, клетки некоторых тканей (например, хряща, мышц, паренхиматозных органов и др.) «помнят» не только свою идентичность, но и положение в организме. Однако имеются клетки (в частности, шванновские), которые перемещаются в любое место, где они нужны [20].

**Цель** настоящей работы – изучить влияние трансплантации стволовых клеток мышцей на регенерацию конечностей реципиентов.

### **Материалы и методы**

В качестве реципиента-объекта исследования выбраны аксолотли (рис. 1),



Рис. 1. Аксолотли.

т.к. у них относительно быстро происходит регенерация утраченных конечностей. Аксолотли – это личинки амбистом, относятся к классу Амфибий, отряд Хвостатые земноводные. Аксолотли (масса – 15-16 г, длина – 12,0-12,5 см) содержались в 160-литровых аквариумах с водоочисткой и принудительной аэрацией. Кормление осуществлялось личинками хирономид по поедаемости.

У экспериментальных объектов (10 особей) была удалена передняя конечность до плечевого сустава (рис. 2).

Группе № 2 (опытной) – 6 особей – внутрибрюшинно ввели стволовые клетки в дозе 10 млн культивированных клеток костного мозга (ККМ); контрольным объектам (группа № 1) препараты не вводились.

Работы по выделению ККМ 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 клеток костного мозга 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 вымывали ККМ раствором Хенкса (без  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ ) из костномозгового канала.

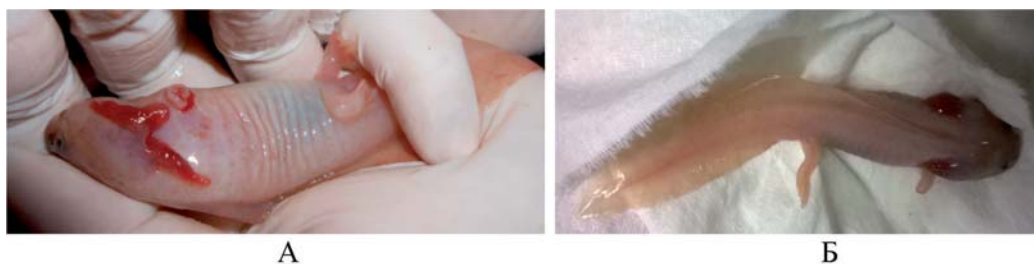


Рис. 2. Аксолотли с культей правой передней конечности: А – сразу; Б – на вторые сутки после ампутации.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали вместе с лизирующим раствором (114 mM NH<sub>4</sub>Cl; 7,5 mM KHCO<sub>3</sub>; 100 мкМ EDTA) из расчета 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 25 mM NEPER, 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 CO<sub>2</sub>-инкубаторе, атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности в течение 3-х суток. Через 3-е 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.

Процесс регенерации оценивали по скорости роста культуры ампутированной конечности по стадиям.

Основные стадии регенерации на примере конечности личинки мексиканской амбистомы [1, 2]:

Первая стадия – заживление раны. Наружный слой лап составляют клетки эпидермиса – поверхностного слоя кожи. И определенная часть клеток начинает перемещаться с культуры на поверхность раны, постепенно закрывая ее. После нескольких делений на поверхности возникает образование, которое состоит из многих слоев и именуется апикальной шапочкой.

Вторая стадия – «демонтажное». Постепенно рассасываются ткани, непосредственно прилежащие к поверхности раны. Конец культуры становится отечным и выпячивается наружу.

Третья стадия – под апикальной шапочкой начинают накапливаться клетки, утратившие свою специализацию. На поверхности культуры образуется холмик.

Четвертая стадия – «рост». Лапа начинает интенсивно расти. Образуются пальцы. К концу стадии формируется уменьшенная копия нормальной лапы.

У экспериментальных гидробионтов делали мазки крови, по 2 шт. от каждого: один – для лейкограммы, второй – для цитохимической реакции определения катионного белка [19].

Показатели эритропоза и дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкоформула) в окрашенных по Паппенгейму мазках периферической крови осуществлялся микроскопически на цифровом микроскопе «Optika DM 15». Уровень гемопоэза оценивался по доле незрелых форм эритроцитов.

Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась цитохимическим методом в реакции с бромфеноловым синим по М.Г. Шубичу [12], адаптированным для гидробионтов Г.И. Прониной [5, 6, 7]. Определялся средний цитохимический коэффициент (СЦК) содержания неферментного катионного белка в нейтрофилах крови.

При определении неферментного лизосомального катионного белка в нейтрофилах исследуемые клетки делили на четыре группы (0-3 балла) по степени их фагоцитарной активности: 0 – гранулы катионного белка отсутствуют, 1 – единичные гранулы, 2 – гранулы занимают примерно 1/3 цитоплазмы, 3 – гранулы занимают 1/2 цитоплазмы и более.

СЦК по Каплоу рассчитывали по формуле:

$$\text{СЦК} = (0 \times H_0 + 1 \times H_1 + 2 \times H_2 + 3 \times H_3) / 100,$$

где  $H_0, H_1, H_2, H_3$  – число нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики с помощью программы Microsoft Office Excel, результаты оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p \geq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

При исследовании выявлено, что через 3 недели у аксолотлей контрольной

группы наблюдалась 2-я стадия регенерации: апикальная шапочка (рис. 3А) – около 2 мм (в опыте апикальная шапочка составляла около 3 мм), в ростовой части культи образовался бугорок размером с просыаное зерно (рис. 3Б) – 3-я стадия регенерации.

Через 6 недель наблюдается формирование пальцев у экспериментальных гидробионтов (4-я стадия регенерации); апикальная часть культи в контрольной группе составила  $4,0 \pm 0,1$  мм (рис. 4А). В опытной группе размер апикальной части культи колебался в пределах  $5,7 \pm 0,4$  мм (рис. 4Б). Таким образом, длина апикальной части культи аксолот-



Рис. 3. Аксолотли через 3 недели после ампутации: А – контрольная группа, Б – опытная группа.

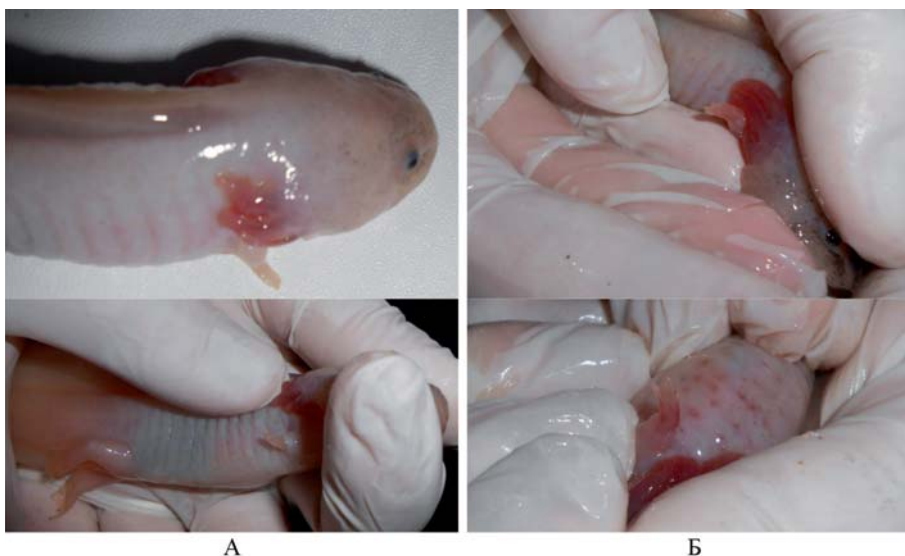


Рис. 4. Аксолотли через 6 недель после ампутации: А – контрольная группа, Б – опытная группа.



лей опытной группы превышает контроль, в среднем, на 50%, различия статистически достоверны.

Лейкограммы крови мазков-отпечатков иссеченной части культи экспериментальных аксолотлей представлены в табл. Для всех экспериментальных особей характерна большая доля бластных клеток в крови (сдвиг ядра влево). Вероятно, это связано с тем, что аксолотли являются личинками, и у них происходит интенсивное деление клеток крови.

В группе с введенными стволовыми клетками сначала (через 3 недели после ампутации) происходит усиление эритропоэза, затем (через 6 недель) – снижение, по доле незрелых клеток эритроидного ряда. Аналогичная тенденция прослеживается в отношении лейкопоза, по содержанию промиелоцитов.

Удаление конечностей и, следовательно, процесс регенерации аксо-

лотлей сопровождается уменьшением процента нейтрофилов в лейкоцитарной формуле, в основном за счет сегментоядерных форм. В нейтрофилах опытной группы (группа № 2) отмечено достоверное повышение потенциала кислороднезависимых факторов клеточного иммунитета (по СЦК лизосомального катионного белка по сравнению с контрольными группами). Видимому, введение стволовых клеток вызвало активацию фагоцитарной активности – накопление неферментного катионного белка в лизосомах микрофагов.

Гистологические исследования иссеченных конечностей на разных стадиях регенерации показали отсутствие патологии у всех экспериментальных гидробионтов. Различий в гистологической картине между контрольными и опытными группами аксолотлей не обнаружено (рис. 5).

Таблица  
Гематологические показатели экспериментальных аксолотлей

Показатели	Интактный контроль	Через 3 недели		Через 6 недель	
		Группа № 1	Группа № 2	Группа № 1	Группа № 2
	а	б	в	г	д
Эритропоэз, %					
Гемоцитобласты, эритробласты	3,8±0,4	4,5±0,5	7,3±0,8 <sup>аб</sup>	4,5±0,5 <sup>б</sup>	1,7±0,3 <sup>абвг</sup>
Лейкоцитарная формула, %					
Миелобласты	2,5±0,9	-	-	-	-
Промиелоциты	0,8±0,5	2,5±0,5	3,7±0,7 <sup>а</sup>	1,5±0,5	-
Сегментоядерные	3,8±0,6	-	1,3±0,7	0,5±0,5 <sup>а</sup>	-
Всего нейтрофилов	4,3±0,3	-	1,3±0,7 <sup>а</sup>	0,5±0,5 <sup>а</sup>	-
Базофилы	0,8±0,5	-	-	0,5±0,5	2,0±0,1
Моноциты	2,5±0,3	2,0±0,1	4,1±0,5 <sup>б</sup>	2,5±0,5	3,0±0,5
Лимфоциты	83,8±1,6	89,5±0,5 <sup>а</sup>	82,9±1,8 <sup>б</sup>	90,0±0,9 <sup>аб</sup>	87,3±1,7
Фагоцитарная активность					
СЦК, ед.	2,12±0,04	2,08±0,06	2,22±0,05	2,32±0,04 <sup>аб</sup>	2,31±0,03 <sup>аб</sup>

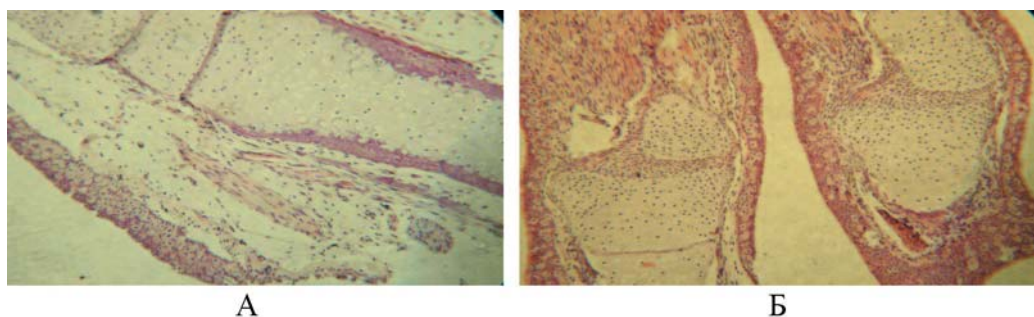


Рис. 5. Гистологическая картина тканей иссеченной конечности: А – контрольная группа, Б – опытная группа.

Во всех препаратах обнаруживается хрящевая ткань с отложением незначительного количества солей кальция, снаружи которой находится поперечнополосатая мышечная ткань и соединительно-тканые волокна. Между последними – концевые отделы простых альвеолярных желез. Разволокнение соединительно-тканной прослойки между эпителием и мышечной тканью различной степени выраженности. Вышеописанные ткани снаружи выстланы многослойным плоским эпителием с белковыми включениями в цитоплазме.

### Заключение

Таким образом, введенные стволовые клетки мышей аксолотлям с ампутированными конечностями ускоряют процесс регенерации. При этом, по результатам клинического осмотра, физиологических и гистологических исследований, патологических изменений не отмечается.

### Список литературы

1. Карлсон Б.М. Регенерация. - М.: Наука. 1986. 191 с.
2. Короткова Г.П. Регенерация животных. - СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета. 1997. 480 с.
3. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В. Гидробионты – альтернативные биомодели // Биомедицина. 2014. № 3. С. 102.
4. Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В., Касинская Н.В. Трансплантация клеток костного мозга мышей рыбам и речным ракам // Research Journal of International Studies: сб. по результатам VII заочной науч. конф. - Екатеринбург: МНИЖ, 2014. № 1(20). Ч. 1. С. 17-18.
5. Пронина Г.И., Ревякин А.О., Корягина Н.Ю., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Курященко Ж.О. Регенерация патологически измененной печени карпа после межвидовой трансплантации стволовых клеток // Биомедицина. 2015. № 1. С. 85-89.
6. Пронина Г.И. О возможностях повышения иммунной устойчивости гидробионтов в аквакультуре // Известия ОГАУ. 2014. № 3. С. 180-183.
7. Пронина Г.И. Использование цитохимических методов для определения фагоцитарной активности клеток крови или гемолимфы разных видов гидробионтов для оценки состояния их здоровья // Известия ОГАУ. № 4(20). - Оренбург. 2008. С. 160-163.
8. Ревякин А.О., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Капаназде Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В., Касинская Н.В. Приживаемость клеток костного мозга у рыб и речных раков // Биомедицина. 2013. № 3. С. 63-66.
9. Трахтман П.Е. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в лечении врожденных и приобретенных незло-

- качественных заболеваний у детей: Дис...  
докт. мед. наук. - М., 2011. 281 с.
10. **Фриденштейн А.Я., Лолыкина К.С.** Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. - М.: Медицина. 1973. 224 с.
  11. **Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я.** Клеточные основы кроветворения (Кроветворные клетки-предшественники). - М.: Медицина. 1977. 272 с.
  12. **Шубич М.Г.** Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. № 10. С. 1321-22.
  13. **Bianco P., Cossu G.** Uno nesstmo e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors // Exp. cell res. 1999. № 251. P. 257-266.
  14. **Bischoff M., Schnabel R.** A Posterior centre establishes and maintains polarity of the caenorhabditis elegans embryo by a Wnt-dependent relay mechanism // PLoS Biology. 2006. No. 4(12): 396.
  15. **Friedrich W., Muller S.** Allogeneic stem cell transplantation for treatment of immunodeficiency // Springer semin. Immunol., 2004; No. 26: 109-9.
  16. **Hopfield J.J., Nank D.W.** «Neural» computation of decision in optimization problems // Biological cybernetics. 1985. Vol. 52. Pp. 141-152.
  17. **Kawakami Y., Esteban R., Raya M., Kawakami H., Martí M., Dubova I., Belmonte J.C.** Izpisúa Concepción Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration // Genes & Development, 2006; No. 20(23): 3232-37.
  18. **Malatack J., Consolini D., Bayever E.** The Status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease // Pediatr. neurol. 2003. No. 29. Pp. 391-412.
  19. **Pronina G.I., Revyakin A.O.** Changes of the morphophysiological parameters of carp *Cyprinus carpio* at food limitation in aquaculture conditions // J. of Ichthyology. 2015. Vol. 55. No. 2. Pp. 297-301.
  20. **Tanaka E.M.** Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration // Curr. opin. genet. dev., 2003; No. 13(5): 497-501.
  21. **Tolar J., Greval S., Bjoraker K., et al.** Combination of enzyme replacement and hematopoietic stem cell transplantation as therapy for Hurler syndrome // Bone marrow transpl., 2008; No. 41: 531-534.
  22. **Zeng W., Chen A., Kajigaya S., et al.** Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers // Blood, 2004; No. 103: 325-7.

## Effect of transplantation of stem cells from mice to regenerate limbs axolotls

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

To study the regeneration of amputated limbs of the axolotl front limb was amputated to the elbow joint. It was revealed that xenotransplantation axolotls experimental stem cell donor mice accelerates the regeneration of the remote end.

**Key words:** tissue regeneration, stem cells, axolotls.