

Приживаемость клеток костного мозга мышей у рыб и речных раков

А.О. Ревякин¹, Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², Г.Д. Капанадзе¹,
О.И. Степанова¹, О.В. Баранова¹, Н.В. Касинская¹

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

² – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar_info@mail.ru

Эксперимент показал приживаемость стволовых клеток мышей-доноров в поджелудочной железе карпа и гепатопанкреасе речных раков. Это было подтверждено гистологическими методами и обнаружением гена зеленого белка с помощью полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: стволовые клетки, гидробионты, поджелудочная железа, гепатопанкреас, ген зеленого белка, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение

Стволовые клетки – это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях, способные к делению и дифференцировке. В большинстве своем, они находятся в костном мозге (КМ), но есть и другие источники, такие как периферическая или пуповинная кровь [2].

Родоначальницей всех клеток крови является СКК (стволовая кроветворная клетка), которая может развиваться в различные виды зрелых клеток. Она способна к самоподдержанию, т.е. производству себе подобных клеток. Основными свойствами популяции СКК являются:

1) полипотентность (возможность дифференцироваться по всем росткам кроветворения);

2) способность к самоподдержанию (дифференцировка одной СКК сопровождается делением другой СКК, в связи с чем появляется новая, «дочерняя» СКК, и суммарное количество клеток не

уменьшается).

Направление дифференцировки СКК определяется кроветворным микроокружением.

К ближайшим потомкам СКК относятся миелоидная и лимфоидная СКК, которые могут дифференцироваться, соответственно, в клетки миелоидного и лимфоидного ряда.

Пересадка стволовых клеток в настоящее время считается лучшим решением при лечении многочисленных злокачественных и незлокачественных заболеваний.

Стволовые клетки донора вводятся в кровеносную систему пациента путем инфузии. Эти клетки могут создать новую систему крови в теле пациента и иммунные лимфоциты. В процессе эмбриогенеза эмбриональные стволовые клетки способны сохранять плюрипотентность и свойство самообновления очень недолго, после чего переходят в мульти- и по-

липотентные клетки коммитированных зародышевых линий [3].

Целью нашей работы являлось изучение приживаемости стволовых клеток мышей-доноров у гидробионтов-реципиентов.

Материалы и методы

Объектами настоящего исследования являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio L.*) зеркальной и чешуйчатой групп и длиннопалые речные раки (*Pontastacus leptodactylus*).

Патология поджелудочной железы рыб была вызвана внутрибрюшинным введением аллоксана в дозах 100, 200 и 300 мг/кг. Гепатопанкреас речных раков разрушался введением аллоксана в дозах 50 и 100 мг/кг, а также кормлением комбикормом с содержанием жира свыше 17% (комбикорм для форели и сига «craft soft light»). При кормлении личинками хируномид патологии гепатопанкреаса не происходило.

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

Культура ККМ вводилась рыбам внутривенно, речным ракам – в вентральный синус. Доза введения составила 8-10 млн культивированных ККМ. Вскрытие опытных объектов производилось на 7-й, 14-й и 21-й день после введения ККМ.

Забор ККМ, содержащих ген зеленого белка (GFP), проводили у мышей-доноров под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с сустава-

ми и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% этаноле, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца (1 и 2 мл), вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали при 1500 об./мин вместе с лизирующим раствором (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:4 в течение 5 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 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_2 -инкубаторе, атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности в течение 3-х суток [1].

ПЦР, со своей высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет гарантированно быстро и надежно получить результат.

Эксперимент проводился в три этапа:

1. Выделение ДНК из пробы печени мышей при помощи набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Компания Биокор», Россия), по инструкции фирмы-производителя.

2. Амплификация геномной ДНК (в термоциклере «Терцик», компания «ДНК-Технология», Россия).

3. Идентификация ПЦР продуктов методом горизонтального электрофореза. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США). Наличие в геле полоски ДНК соответствующей

щего размера свидетельствует о наличии в образце искомого гена.

Результаты и их обсуждение

Через 3 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых неприкрепившихся к пластику гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся распластанных фибробластоподобных клеток – мультипотентных мезенхимальных стромальных ККМ. Полученная смешанная культура из гемопоэтических и стромальных ККМ от мышей-доноров была готова для трансплантации (рис. 1).

Гибели экспериментальных гидробионтов не отмечалось. Эксперимент показал успешную трансплантацию стволовых клеток мышей-доноров у всех реципиентов.

При микроскопии внутренних органов наблюдалось зеленое свечение ККМ с геном GFP (рис. 2).

Результаты исследования подтверждены проведением ПЦР, в результате

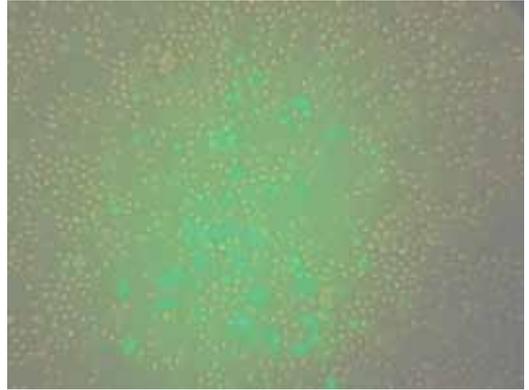
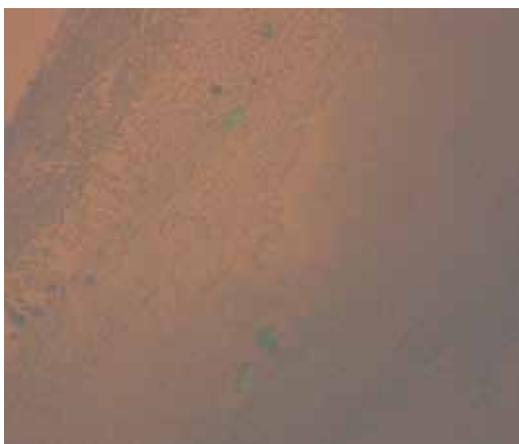


Рис. 1. Культура клеток на третьей сутки культивирования.

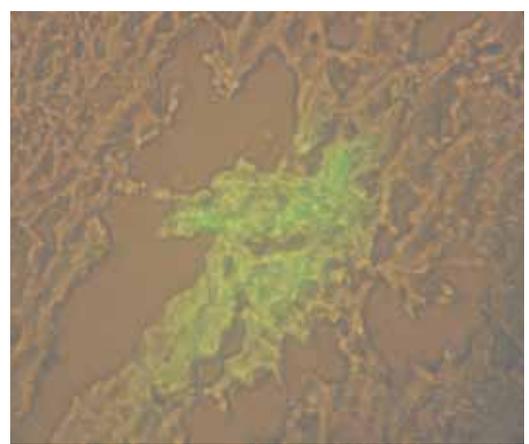
которого были получены электрофоретические спектры продуктов амплификации и во всех опытных образцах идентифицирован ген GFP (рис. 3).

Выводы

Таким образом, впервые показано, что клетки костного мозга мышей успешно приживаются в организме рыб и речных раков.



А



Б

Рис. 2. Клетки мышши-донора: А – в поджелудочной железе карпа на 21-е сутки; Б – в гепатопанкреасе длиннопалого речного рака на 14-е сутки после введения.

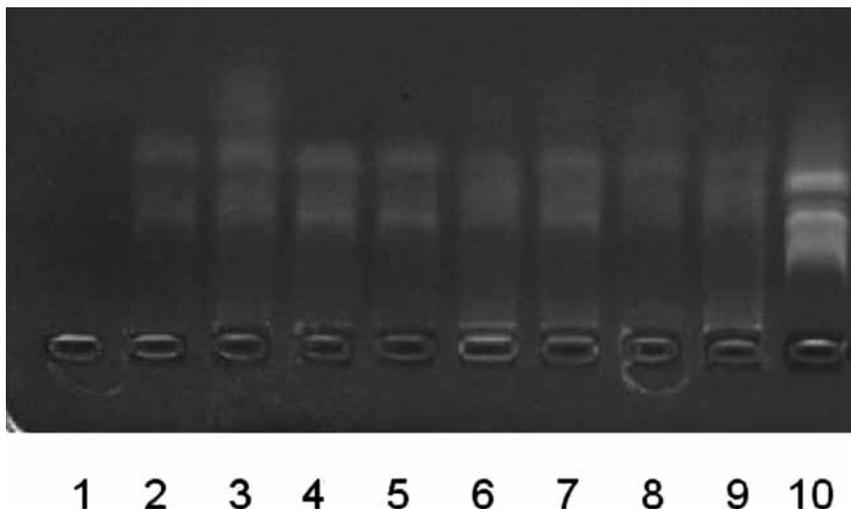


Рис. 3. Результаты ПЦР в образцах ткани от экспериментальных гидробионтов.
1 – контроль (вода); 2, 3, 4, 5 – карпы; 6, 7, 8, 9, 10 – речные раки.

Список литературы

1. Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Деньгина С.Е. Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.
2. Шахов В.П., Попов С.В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. - Томск: STT. 2004. 170 с.
3. Bianco P., Cossu G. Uno nesstmo e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors // Exp. Cell. Res. 1999. № 251. P. 257-263.

Survival of mice marrow cells at fishes and river crayfish

A.O. Revyakin, G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, G.D. Kapanadze,
O.I. Stepanova, O.V. Baranova, N.V. Kasinskaya

The experiment showed survival of stem cells donor mice in the carp pancreas and river crayfish hepatopancreas. It was confirmed with histologic methods and detection of green fluorescent protein gene by polymerase chain reaction.

Key words: stem cells, hydrobionts, pancreas, hepatopancreas, green fluorescent protein gene, polymerase chain reaction (PCR).