

Влияние стволовых клеток на репродуктивную функцию речных раков

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹, О.И. Степанова¹,
Н.В. Петрова¹

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

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства (ФГБУН ВНИИР)

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

Научный интерес в плане обнаружения эволюционных закономерностей, а также практический интерес в области медицины представляет изучение влияния ксенотрансплантации стволовых клеток на репродуктивную функцию реципиентов. В качестве альтернативных биомоделей для эксперимента были выбраны беспозвоночные гидробионты – речные раки, так как они являются пойкилотермными организмами с внешним оплодотворением, у них легче проследить процесс оплодотворения и развития зародышей и по этическим соображениям. Половозрелым речным ракам вводились стволовые клетки костного мозга мышей-доноров в дозе 8-10 млн. Обнаружено, что введение стволовых клеток речным ракам инициирует у них активацию репродуктивной функции, а именно: спаривание, выход икры у самок и её оплодотворение.

Ключевые слова: речные раки *Pontastacus leptodactylus*, стволовые клетки, репродуктивная активность.

Введение

В настоящее время новое направление по применению стволовых клеток находит широкое применение в медицинской практике. Известно, что стволовые клетки обладают мощным регенеративным действием, направленным на восстановление паренхиматозных органов [4-6; 9].

В эволюционном аспекте значительный интерес представляет изучение влияния трансплантации стволовых клеток на воспроизводство многоклеточных организмов, особенно находящихся на относительно низких ступенях систематической классификации.

Данных по влиянию стволовых клеток на репродуктивную активность крайне мало. Известно, что первичные

половые клетки появляются вдали от будущей гонады, затем мигрируют в ее соматическую часть и становятся зрелыми половыми клетками [8, 11].

Предполагается эволюционное родство тотипотентных стволовых клеток и клеток половой линии и эволюционный консерватизм их структурной и функциональной организации, общие для представителей различных таксонов многоклеточных животных: кишечнополостные, турбеллярии, корнеголовые ракообразные и млекопитающие [1, 2, 7, 10, 12].

Целью настоящих исследований было изучение влияния трансплантации клеток костного мозга (ККМ) на репродуктивную активность беспозвоночных гидробионтов.

Материалы и методы

Объектами исследований мы выбрали длиннопалых речных раков (*Pontastacus leptodactylus*) в качестве альтернативных биомоделей.

В эксперименте было сформировано 2 группы: интактный контроль и опытная группа. В каждую группу было отобрано по 12 особей обоего пола.

Ракам опытной группы в вентральный синус были введены стволовые клетки, однократно в дозе 8-10 млн ККМ.

Экспериментальные объекты содержались в аквариальных условиях с искусственной аэрацией и водоочисткой. Время опыта составляло 30 дней.

Стволовые клетки готовились следующим образом. У мышей-доноров проводили забор клеток костного мозга (содержащих ген зеленого белка (GFP)) под эфирным наркозом. Стерильно отсекали 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.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали 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 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 NEPES, 0,58 г/л глутамина, 100мкг/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 [3].

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 от мышей-доноров была готова для трансплантации.

Результаты и их обсуждение

Через две недели после введения стволовых клеток у самок опытной группы (3 особи) произошло выметывание, оплодотворение и прикрепление икры. На их вентральной стороне между головогрудью и абдоменом хорошо заметны приклеившиеся сперматофоры самца (рис.).

Оплодотворения самок в контрольной группе на всем протяжении эксперимента не отмечено.



Рис. 1. Самки речного рака *Pontastacus leptodactylus* с икрой.



Рис. 2. Отбор проб икры для анализа.

Были отобраны образцы икры для анализов (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют об инициации половой активности.

С помощью проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выяснено, что в икру эти клетки не попадают: ген зеленого белка в ней не обнаружен.

Заключение

Таким образом, впервые получены данные о влиянии клеток костного мозга на репродуктивные функции гидробионтов. Введение стволовых клеток стимулирует выход и оплодотворение икры у половозрелых особей речных раков.

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. *Исаева В.В., Шукалюк А.И., Кизилова Е.А.* Выявление стволовых клеток в колониальной интерне корнеголовых ракообразных *Peltogasterella gracilis* и *Sacculina polygenea* на паразитической стадии жизненного цикла // Цитология. 2003. Т. 45. № 8. С. 758-763.
3. *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.

4. *Маслюков А.К., Сугачевская Е.В.* Стволовые клетки и их применение в практической медицине // www.transplantology.com. 2004.
5. *Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Ревякин А.О., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Баранова О.В.* Гидробионты – альтернативные биомодели // Биомедицина. 2014. № 3. 102 с.
6. *Ревякин А.О., Пронина Г.И., Корягина Н.Ю., Капанадзе 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.
7. *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.). 752 p.
8. *Kunwar P.S., Lehmann R.* Developmental biology: germ-cell at-traction // Nature. 2003. Vol. 421. P. 226-227.
9. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration after partial hepatectomy critical analysis of mechanistic dilemmas // The American Journal of Pathology. 2010. Vol. 176. № 1. P. 2-13.
10. *Rybakov A.V., Shukalyuk A.I.* Thylacoplethus isaevae sp. n., 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.
11. *Saffman E.E., Lasko F.* Germline development in vertebrates and invertebrates // Cell Mol. Life Sci. 1999. Vol. 55. P. 1141-1163.
12. *Shukalyuk A.I., Isaeva V.V., Golovnina K.A., et al.* Vasa-related genes and their expression in stem cells of colonial *Polyascus polygenea* (Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala) // Abstracts. Int. Soc. Stem Cell Res. 3rd Annu. Meet. (San Francisco, June 2005). 2005. P. 215.

Influence of stem cells on reproductive function of crawfishes

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova,
N.V. Petrova

Scientific interest in respect of detection of evolutionary regularities, and also practical interest in the field of medicine represents studying of influence of a xenotransplantation of stem cells on reproductive function of recipients. As alternative biomodels for experiment invertebrate hydrobionts – crawfishes as they are poikilothermic organisms with external fertilization were chosen, at them it is easier to track process of fertilization and development of germs and in ethical reasons. To sexual maturity crawfishes stem cells of marrow of donor mice in a dose of 8-10 million KKM were entered. It is revealed that introduction of stem cells to crawfishes initiates at them activation of reproductive function. Namely pairing, a caviar exit at females and its fertilization.

Key words: crawfishes *Pontastacus leptodactylus*, stem cells, reproductive activity.