

УДК

ОТРИМАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН РИБ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

Ю.М. ГЛУШКО, О.Ю. БЕЛКОВА, Л.П. СУХОВЕРСЬКА,
Ю.С. АЛЕКСЄЄВА

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Стовбурові клітини риб володіють величезним потенціалом для вивчення процесів диференціації клітин і дають можливість відслідкувати зв'язок між *in vitro* та *in vivo* маніпуляціями з геномом. Використання стовбурових клітин риб дає можливість об'єднати ембріологічні та молекулярно-генетичні дослідження розвитку хребетних. Стаття присвячена порівняльному аналізу сучасних біотехнологій отримання стовбурових клітин риб та оцінці перспектив їх використання в медичній генетиці та інших сферах наукових досліджень.*

Ключові слова: *стовбурові клітини риб, тотипотентність, плюрипотентність, проліферація, диференціація, регенерація.*

Вступ. Стовбурові клітини – це недиференційовані клітинами попередники клітинних ліній, які мають потенціал для самовідновлення і диференціації в більш зрілі клітини і забезпечують постійну швидкість клітинного оновлення [1].

Використання ембріональних стовбурових клітин у світовій медицині робить можливим лікування летальних спадкових захворювань. Завдяки своїм унікальним властивостям, стовбурові клітини дають можливість експериментального аналізу основних процесів розвитку, таких як контроль плюрипотентності, диференціації клітин, та використання в регенеративній медицині терапії стовбуровими клітинами. На сьогоднішній день стовбурові клітини найкраще вивчені на трьох видах хребетних, таких як людина,

лабораторні миші та деякі види риб. Дослідженням стовбурових клітин риб активно ведуться останні 20 років, оскільки вони мають високий потенціал використання в різних біотехнологіях. Використання ембріональних стовбурових (ЕС) клітин риб дає можливість об'єднати ембріологічні та молекулярно-генетичні дослідження розвитку хребетних. Плюрипотентні ембріональні стовбурові клітини володіють величезним потенціалом для вивчення процесів розвитку та диференціації клітин і дають можливість відслідкувати зв'язок між *in vitro* та *in vivo* маніпуляціями з геномом. Пошук шляхів успішного культивування стовбурових клітин поза організмом є пріоритетом завданням в сучасних дослідженнях стовбурових клітин. Тому основна мета роботи полягає в порівняльному аналізі сучасних біотехнологій стовбурових клітин риб та оцінка перспектив їх використання.

Основна частина. Перші культури стовбурових клітин були отримані 30 років тому з ембріонів миші. Це були плюрипотентні ембріональні стовбурові (ЕС) клітини [2]. Роботи присвячені культивуванню стовбурових клітин риб розпочалися 20 років тому на акваріумних видах, зокрема, даніо реріо (*Danio rerio*) та медака. Медака є другим організмом, з якого отримали (ЕС) клітини, і перший, який дав початок лінії сперматогоніальних стовбурових клітин, здатної до розвитку зрілих сперматозоїдів. Останні дослідження свідчать, що з даного виду риб були отримані перші гаплоїдні стовбурові клітини, придатні до використання в репродуктивному процесі.

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) широко використовувалися як модель об'єкти в біології стовбурових клітин. За здатністю до самооновлюватися та диференціації дані клітини поділяють на кілька типів клітин та використовують для регенерації тканин або замісної терапії. Застосування технології стовбурових клітин обмежені нашими знаннями про молекулярні механізми, які контролюють їх проліферацію та диференціацію, тому для заповнення цих прогалин використовують легкодоступні модельні організми, зокрема риб. Дослідження проведені на даніо реріо (*Danio rerio*) були цінними для виявлення нових генетичних та сигнальних факторів, які

впливають на формування та розвиток ГСК, їх міграцію та приживлення в організмі реципієнті.

Початок кровотворення в ранніх ембріонах характеризується індукцією чітких попередників різних анатомічних ділянок. У данію періоду формування кровотворних клітин відбувається у дві основні хвилі. Перша – складається з утворення первинних еритроцитів із задньої латеральної мезодерми [3] і виникнення первинних мієлоїдних клітин із передня латеральна мезодерма [4]. Дана початкова хвиля кровотворення еквівалентна утворенню крові інших хребетних. Основна функція первинного гемопоезу полягає в забезпеченні ембріона, що швидко розвивається червоними кров'яними клітинами для перенесення кисню. Дослідження на рибах мутагенезу клітин крові дають можливість використати їх як модельні об'єкт, оскільки ранні дефекти крові у більшості інших хребетних є ембріональними.

З моменту успішного культивування перших ембріональних стовбурових (ЕС) клітин у мишей, вони опинилися в центрі досліджень завдяки їх величезному потенціалу для фундаментальних досліджень в медицині та біотехнології тварин [4]. Зокрема у 1996 році була розроблена успішна біотехнологія ембріональних стовбурових клітин з риб медака [5]. У даній культурі важливою складовою середовища, що сприяє розвитку ембріональних стовбурових клітин, є екстракт ембріонів риби, який разом з основним фактором росту фібробластів і сироваткою крові риб здатний підтримувати самовідновлення (ЕСК) на желатиновому твердому середовищі в чашках Петрі (рис.1) [5].

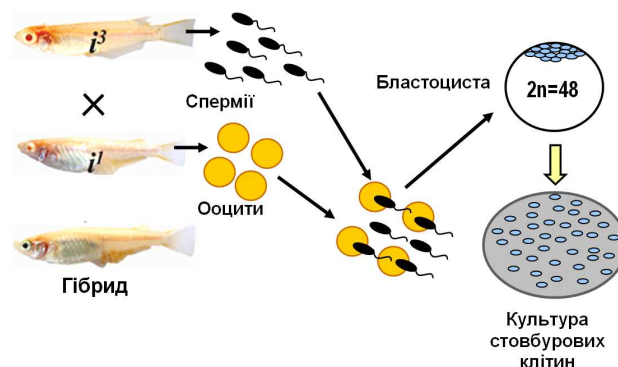


Рис. 1. Біотехнологія диплоїдних ембріональних стовбурових клітин риб

Протягом одного року було проведено понад 100 пасажів і виявлено, що дана культура характеризується аналогічним ростом, що і ЕС клітини мишей. До них відносяться стабільний ріст, типовий фенотип клітин (кругла / полігональна форма, невеликий розмір, великі ядра), висока активність лужної фосфатази (загальний маркер ЕС клітин мишей), нормальний каріотип і здатність до спонтанної диференціації в різні типи клітин, включаючи пігментні, м'язові, нервові клітини та фібробласти [5]. Важливо, що ЕС клітини риб медака можуть піддаватися клональному росту, утворюючи колонії ущільнених недиференційованих клітин, здатних до експансії в клони ЕС клітин. Клітини розділяли на невеликі колонії або окремі клітини і переносили у нову культуральну чашку для вирощування великої кількості колоній ембріональних стовбурових клітин, кожен цикл субкультивованих клітинних ліній заморожували для подальшого порівняльного генетичного аналізу.

На сьогоднішній день також розроблена біотехнологія гаплоїдних стовбурових клітин риб. Для виявлення диференціації на рівні однієї клітини, ЕС клітини підлягають суспензійній культурі. Після декількох днів культивування суспензії ЕС клітини перетворюються на адгезивну культуру, і окремі клітини стають чітко видимими. Після фіксації ці клітини виявляються *in situ* за допомогою антитіл, специфічних для конкретного типу клітин. Багато антитіл для ссавців є комерційно доступними, проте для використання у риб, ці антитіла повинні бути перевірені на перехресну активність та специфічність фарбування. Плюрипотентність *in vivo* оцінюється за допомогою трансплантації ЕС клітин на ранніх етапах розвитку ембріону для утворення химери. Вакамацу та колеги спочатку встановили умови для утворення химери на основі методики, розробленої для пересадки некультивованих бластомерів медака [6].

В результаті було отримано дві клітинні лінії, перша з яких продукувала меланоцити, а друга альбіноштам. Отже, для утворення химер за допомогою пігментації як маркера диференціювання ЕС клітин необхідно перевірити різні штами-господарів. Задовільні показники химеризму та передачі зародкової лінії були отримані з усіма генотипами ЕС клітин, що наглядно демонструє, що

вибір генотипу бластоцисти є очевидним для ефективності химеризму та передачі зародкової лінії [2].

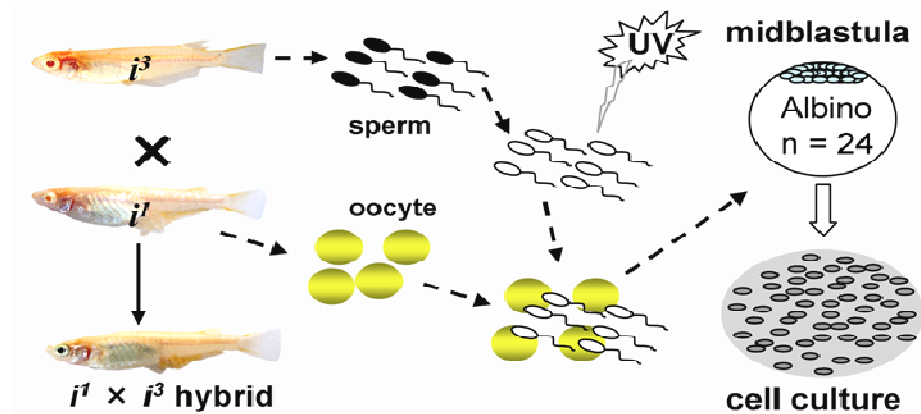


Рис. 2 Біотехнологія гаплоїдних ембріональних стовбурових клітин медака

Групою авторів було показано, що УФ-опромінення руйнує генетичний матеріал сперміїв без шкоди для їх здатності викликати активацію яйцеклітини для гаплоїдного гінгенезу. Гаплоїдні ембріони дисоціюють на стадії мідбластули в окремі клітини для ініціації клітинної культури [7].

Умова для виведення лінії гаплоїдних ЕС клітин медаки аналогічні як і для диплоїдних, але включають етап обробки сперміїв контрольованою дозою ультрафіолетового опромінення, яка руйнує їхні ядра, але зберігає здатність викликати активацію яйцеклітин. Дані генетично інактивовані спермії змішуються зі зрілими ооцитами для штучного запліднення, в результаті чого отримують яйцеклітини тільки з гаплоїдним жіночим ядром. Такі ембріони піддаються загально-жіночому ембріогенезу – гінгенезу [8].

Також, на сьогоднішній день розроблена біотехнологія рекомбінантних стовбурових клітин риб з метою їх застосування у виробництві трансгенних риб. Той факт, що ембріони риб розвиваються поза материнським організмом, є великою перевагою для ініціювання ембріональних культур з риб порівняно з мишами. Основною метою розвитку культури ЕС клітин риб було створення умов, які підтримували б ріст ембріональних клітин, уникаючи спонтанної диференціації та здешевлення умов культивування [9,10]. Щоб уникнути

диференціації, стратегії, що використовуються на мишах, такі як фідерні клітини [11], кондиціонуючі середовища та інгібуючий фактор лінкоцину лейкемії працювали для короточасних культур в обох модельних видів, хоча результати не були задовільними для довготривалих культур. Внаслідок цього для медака були встановлені вільні від фідер умови [12]. Незалежність клітин ЕС клітин риб від поживного середовища та інгібуючих факторів диференціювання є важливою перевагою в маніпуляціях з СК клітинами риб порівняно з іншими видами.

Завдяки своїм унікальним особливостям, стовбурові клітини дають можливість експериментального аналізу основних процесів розвитку, таких як контроль плюрипотентності, а також для регенеративної медицини шляхом терапії на основі стовбурових клітин. Культури стовбурових клітин найкраще вивчалися на трьох видах хребетних (людина, лабораторні миші та риби). Стовбурові клітини риб мають потенціал для використання в різних біотехнологіях. Серед них, спрямованість генів, трансплантація клітин зародків та клонування шляхом перенесення ядер [13]. Також ведуться розробки з використання стовбурових клітин риб для відродження зору людини. клітини риб. Дослідники університету Альберті виявили, що стовбурові клітини даніо реріо можуть селективно регенерувати пошкоджені фоторецепторні клітини [14].

ВИСНОВКИ

У роботі дано загальну характеристику стовбурових клітин. Проведено аналіз наукових робіт присвячених методам культивування та використання стовбурових клітин риб.

Описано та проведено порівняльний аналіз переваг та недоліків сучасних біотехнологій отримання різних типів стовбурових клітин риб. Показано переваги використання ембріональних стовбурових клітин риб для біотестування, встановлення функції генів під час ембріонального розвитку та аналізу аномалії розвитку, порівняно з людськими. Результати наукових розробок свідчать, що стовбурових клітин риб мають високий потенціал використання в медицині та лабораторній діагностиці різних мутацій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Радиационная цитогенетика : русско-английский словарь-справочник / Э. Д. Демина, М. А. Пилинская, Ю. И. Петунин, Д. А. Ключин; [ред. Н. А. Дружина]. — К. : Здоровье, 2009. — 360 с
2. Brook F.A. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse / Brook F.A., Gardner R.L. // Proc Natl Acad Sci. — U.S.A. — 1997.— Vol. 94. — P. 5709—5712.
3. Detrich III H.W. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development / Detrich III H.W., Kieran M.W., Chan F.Y., Barone L.M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1995. — N 92. — P. 10713—10717.
4. Hong Y. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*oryzias latipes*) / Hong Y., Winkler C., Scharl M. // Mech Dev. — 1996. — Vol. 60. — P.33—44.
5. Wakamatsu Y. Generation of germ-line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*) / Wakamatsu Y., Ozato K., Hashimoto H., Kinoshita M. et al. // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. — 1993. — № 2. — P.13.
6. Wakamatsu Y. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*oryzias latipes*) blastula embryo / Wakamatsu Y., Ozato K., Sasado T. // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. — 1994. — №3. — P.185—191.
7. Yi M. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells / Yi M., Hong N., Hong Y. // Science. — 2009. — N. 326. — P.430—433.
8. Yi M. Derivation and characterization of haploid embryonic stem cell cultures in medaka fish / Yi M., Hong N., Hong Y. // Nat Protoc. — 2010. — №5. — P.1418—1430.
9. Be' jar J. Towards obtaining ES cells in the marine fish species *Sparus aurata*; multipassage maintenance, characterization and transfection / Be' jar J., Hong Y., Alvarez M.C. // Genetic Anal. Biomol. Eng. — 1999. — № 15. — P. 125–129.
10. Collodi P. Fish embryo cell cultures for derivation of stem cells and transgenic chimeras / Collodi P., Kamei Y., Sharps A. [et al.] // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. — 1992. — № 1. — P. 257—265.

11. Evans M.J. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos / Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. — 1981. — №292. — P. 154–156.

12. Hong Y. Establishment and growth responses of early medakafish (*Oryzias latipes*) embryonic cells in feeder layer-free cultures / Hong Y., Scharl M. // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. — 1996. — №5. — P. 93–104.

13. Fish stem cells may restore human vision. Biotech. Bulletin. – 2013. – Vol. XIV. № 1. – P. 23–24

14. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction / Lacerda S. M, Costa G. M [et al.] // Fish Physiol. Biochemistry. – 2013. T. 39. № 1. – P. 3–11.

ПОЛУЧЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РЫБ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Ю. ГЛУШКО, А.Ю. БЕЛИКОВА, Л.П. СУХОВЕРСКАЯ, Ю.С. АЛЕКСЕЕВА

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Стволовые клетки рыб обладают огромным потенциалом для изучения процессов дифференциации клеток и дают возможность проследить связь между *in vitro* и *in vivo* манипуляциями с геномом. Использование стволовых клеток рыб дает возможность объединить эмбриологические и молекулярно-генетические исследования развития позвоночных. Статья посвящена сравнительному анализу современных биотехнологий получения стволовых клеток рыб и оценке перспектив их использования в медицинской генетике и других сферах научных исследований.*

Ключевые слова: *стволовые клетки рыб, тотипотентность, плюрипотентность, пролиферация, дифференциация, регенерация.*

CULTIVATION AND USES OF FISH STEM CELLS

Y.M. GLUSHKO, O.Y. BELIKOVA, L.P. SUKHOVERSKA,

Y.S. ALIEKSIEIEVA

National Aviation University, Kyiv

Stem cells have great potential for studying the processes of cells differentiation and provide the opportunity to find the relationship between in vitro and in vivo manipulation with genome. Application of fish embryonic stem cells provides the opportunity to combine embryological and molecular-genetic studies of vertebrate's development. The article is dedicated to comparative analysis of modern biotechnologies fish stem cells and valuation of the prospects for using these cells in medical genetics and other areas of scientific activity.

Key words: *stem cells of fish, totipotency, pluripotency, proliferation, differentiation, regeneration.*