

••• МЕТОДИКИ •••

УДК: 575.222.75:591.3

Выделение эмбриональных герминативных клеток птиц **М.Т.Тагіров, А.В.Терещенко, А.Б.Артеменко, Л.В.Терещенко**

*Институт птицеводства УААН (п. Борки, Харьковская обл., Украина)
tagirov-m@yandex.ru*

Эмбриональные герминативные клетки (ЭГК) представляют собой недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки. Хотя до настоящего времени ЭГК с доказанной трансмиссией зародышевой линии получены только у мышей, идет интенсивный поиск методов их выделения у человека и различных видов сельскохозяйственных животных, в том числе и у птиц. Первичные зародышевые клетки (ПЗК) выделяли из крови эмбрионов 13–14 стадии и гонад 19 стадии развития. Для культивирования ПЗК из крови использовали питательную среду, в которой предварительно культивировались клетки гонад. При этом ПЗК, находящиеся в крови, прикрепляются к подложке культивирования и делятся, формируя колонии на 7–9 день культивирования. При обработке реактивом Шиффа эти клетки окрашиваются в малиново-красный цвет. Разработан метод выделения и очистки из эмбриональной крови популяции клеток, которые проявляют гистохимические свойства, характерные для ЭГК птиц – положительная реакция на реактив Шиффа.

Ключевые слова: *первичные зародышевые клетки, эмбриональные герминативные клетки, химеры, культивирование клеток.*

Виділення ембріональних гермінативних клітин птахів **М.Т.Тагіров, О.В.Терещенко, О.Б.Артеменко, Л.В.Терещенко**

Ембріональні гермінативні клітини (ЕГК) являють собою недиференційовані плюрипотентні стовбурові клітини. На даний момент ЕГК з доведеною трансмісією зародкової лінії отримані тільки у мишей, йде інтенсивний пошук методів їх виділення у людини та різних видів сільськогосподарських тварин, у тому числі і у птахів. Первинні зародкові клітини (ПЗК) виділяли з крові ембріонів 13–14 стадії й гонад 19 стадії розвитку. Для культивування ПЗК з крові використовували живильне середовище, в якому попередньо культивувалися клітини гонад. При цьому ПЗК, що перебувають у крові, прикріплюються до підложки культивування й діляться, формуючи колонії на 7–9 день культивування. При обробці реактивом Шиффа ці клітини забарвлюються в малиново-червоний колір. Розроблено метод виділення та очищення з ембріональної крові популяції клітин, які проявляють гістохімічні властивості, характерні для ЕГК птахів – позитивна реакція на реактив Шиффа.

Ключові слова: *первинні зародкові клітини, ембріональні гермінативні клітини, химери, культивування клітин.*

Isolation of embryonic germ cells in birds **M.T.Tagirov, A.V.Tereschenko, A.B.Artemenko, L.V.Tereschenko**

Embryonic germ cells (EGCs) are undifferentiated pluripotent stem cells. Nevertheless EG cells with proven germ-line transmission have been established only in mouse, intensive search of methods of their isolation in human and various domestic animals, including birds, is under way. Primary germ cells (PGCs) were isolated from the blood of embryos of 13–14 stage and gonads of 19 stage of development. Nutrition medium, in which gonad cells were previously cultured, was used for the culture of PGCs isolated from the blood. PGCs attached to the culture surface and divided, forming cell colonies on 7–9 days of the culture. The cells in the colonies were stained with Schiff reaction in crimson. A method of specific cell population extraction from embryonic blood showing histochemical properties of EGCs and their purification has been developed.

Key words: *primordial germ cells, embryonic germ cells, chimaeras, cell culture.*

Введение

Эмбриональные клетки, обладающие полипотентными свойствами, в настоящее время являются объектом многочисленных биотехнологических исследований, результаты которых могут быть применены в различных областях медицины, ветеринарии, животноводства, в частности в направлении повышения продуктивных качеств животных и сохранения их генетического разнообразия.

Линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) охарактеризованы у мышей (Evans, Kaufman, 1981), коров (First et al., 1994), свиней (Whiller, 1994), кролей (Giles et al., 1993), хомячков (Doetschman et al., 1988) и людей (Thomson et al., 1998). Однако ЭСК с доказанной трансмиссией зародышевой линии получены только у мышей (Bradley et al., 1984). Таким образом, хотя для многих сельскохозяйственных животных и получены ЭС клетки, они не встраиваются в линию половых клеток должным образом.

Не так давно была доказана плюрипотентность первичных зародышевых клеток (ПЗК), которые являются предшественниками клеток спермы и яйцеклеток. Стволовые клетки, полученные из ПЗК, называются эмбриональными герминативными клетками (ЭГК) (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992).

У птиц, в частности у кур, на X стадии развития (Eyal-Giladi, Kochav, 1976), что соответствует свежеснесенному яйцу, в бластодерме имеется немногочисленная (до 20–30 шт.) популяция ПЗК. Эти клетки локализованы в центральной области бластодермы (рис. 1).

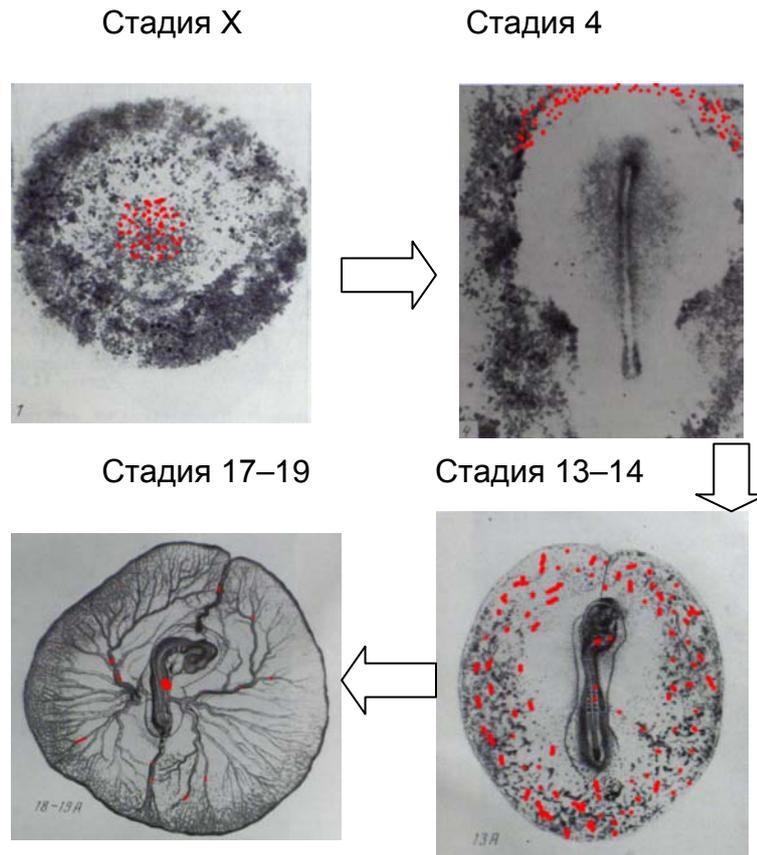


Рис. 1. Миграция первичных зародышевых клеток в раннем эмбриогенезе птиц. Красным цветом обозначена локализация ПЗК. Фотографии взяты из книги «Объекты биологии развития» (под ред. Б.Л.Астаурова, 1975)

На ранних стадиях развития ПЗК сохраняют плюрипотентные свойства и при реинтродукции в эмбрион-реципиент могут участвовать в формировании его половых продуктов. При выборе определенной стадии развития для выделения ПЗК следует принимать во внимание следующие особенности:

1. Количество ПЗК больше в эмбрионах, находящихся на более поздних стадиях развития.
2. Для получения ПЗК на X стадии по Н.Еyal-Giladi и S.Kochav (Eyal-Giladi, Kochav, 1976) используют всю популяцию клеток, составляющих зону пеллюцида бластодермы.
3. Преимущество выделения ПЗК из крови заключается в отсутствии межклеточных связей, в связи с чем отпадает необходимость механической или ферментативной обработки ткани, травмирующей клетки и снижающей их жизнеспособность.

На стадии X ПЗК обнаруживаются с помощью иммуногистохимического анализа с использованием моноклональных антител SSEA-1 (stage-specific embryonic antigens) и EMA-1 (epithelial membrane antigens). Из вентральной поверхности зоны пеллюцида они постепенно переходят в дорсальную область зоны гипобласта на стадиях XI–XIV (Karagenc et al., 1996).

К 18 часам инкубации (стадия 4 по Гамбургеру и Гамильтону (Объекты биологии развития, 1975)) ПЗК перемещаются вперед в район зародышевого полумесяца. Оттуда они попадают в кровоток, некоторое время находятся в кровотоке и проникают в гонады. На этапе миграции из зародышевого полумесяца в половые бугорки гонад морфологические и гистохимические характеристики ПЗК не претерпевают заметных изменений. Специфической реакцией на ПЗК птиц на этом этапе развития является йодная кислота–Шифф реакция (PAS-реакция) (Meyer, 1958; Clawson, Dorn, 1969). PAS-реакция используется для обнаружения 1-2-гликолей и является важным гистохимическим методом обнаружения углеводов. Присутствие значительных цитоплазматических отложений гликогена в ПЗК птиц на стадиях развития 7–27 позволяет легко идентифицировать их с помощью специфического окрашивания. В основе механизма данной реакции лежит окисление йодной кислотой 1-2-гликолей в составе гликогена до альдегидных групп и последующее их связывание реактивом Шиффа, что дает светло-красное или малиново-красное окрашивание.

ПЗК, проникшие в гонады, в случае самца, начинают активно делиться после 13 дней инкубации и дифференцироваться в сперматогонии (Howarth, 1995).

В случае, когда генетическая структура особи соответствует конституции самки, ПЗК, попавшие в левый яичник эмбриона, дифференцируются для формирования оогоний после 8 дней инкубации и начинают активно делиться в процессе дифференциации в первичные ооциты. К 16 дням инкубации первичные ооциты входят в профазу мейоза (Ukeshima, 1994).

Возобновление развития первичного ооцита происходит при достижении половозрелости.

Основная проблема, возникающая на пути интенсивного использования ПЗК в программах по сохранению генофонда и получению трансгенной птицы, – это малое их количество при выделении. Для решения данной проблемы необходимо разработать способы их выделения и культивирования при отсутствии включений других типов клеток. Целью наших исследований была разработка метода выделения ПЗК из эмбриональной крови.

Материалы и методы

Выделение ПЗК для культивирования

Исследования проводились в лаборатории репродукции птицы Института птицеводства УААН на яйцах кур породы род-айланд. Для получения первичных зародышевых клеток из крови использовали эмбрионы 13–14 стадии, для чего яйца инкубировали на протяжении 48–52 часов при 37,8°C и относительной влажности 80%. От каждого эмбриона было получено по 2–4 мкл крови. Для выделения клеток крови в чашку Петри с питательной средой переносили кровь от 7–10 эмбрионов. Суспензию клеток отмывали путем центрифугирования (1000 об/мин) в течение 2 мин, а затем переносили в 2–3 лунки 24-луночного планшета для культивирования (Kawashima et al., 2002).

Для выделения ПЗК из гонад использовали эмбрионы 27 стадии развития (Song et al., 2005). Для этого яйца инкубировали на протяжении 6 суток в стандартных условиях. Гонады 6-суточных эмбрионов выделяли и переносили в фосфатно-солевой буфер (pH 7,2) без ионов кальция и магния. В одном эксперименте выделяли гонады от 10–12 эмбрионов, которые помещали в центрифужную пробирку с теплым раствором трипсина (0,25%) и ЭДТА (0,05%). После инкубации в растворе в течение 5 мин пипетировали пастеровской пипеткой до получения гомогенной суспензии. Действие трипсина инактивировали добавлением питательной среды с сывороткой. После отмывания полученную суспензию использовали для культивирования.

Йодная кислота–Шифф окрашивание

Первичные зародышевые клетки идентифицировали с помощью йодная кислота–Шифф реакции (Лимм, 1969).

Суспензию окрашиваемых клеток переносили на предметные стекла и распределяли тонким слоем. После высушивания стекла переносили в метанол на 3 мин для фиксации. Затем клетки окисляли водным раствором йодной кислоты (1%) в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего промывали в проточной воде в течение 10 мин, а затем – в дистиллированной воде (2 раза по 2 мин). Окрашивание реактивом Шиффа проводили при комнатной температуре в течение 20–25 мин. После окраски образцы промывали SO₂-водой (600 мл дистиллированной воды + 30 мл 10% K₂S₂O₅ + 30 мл 1N HCL) 3 раза по 2 мин (SO₂-вода готовится непосредственно перед использованием). После обработки SO₂-водой препараты промывали в проточной, затем в дистиллированной воде. После высушивания образцы исследовали под оптическим микроскопом.

Культивирование клеток

Культивирование клеток крови из эмбрионов 13–14 стадии развития и клеток гонад проводили при 38°C в атмосфере 5% CO₂ в питательной среде следующего состава: DMEM+F12(HAM) (1:1) (производитель Sigma-Aldrich) + 12% сыворотки плода коровы (Пан-Эко, Москва) + 56 мкМ

меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich). (DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium, F12(HAM) – Nutrient mixture). Для контроля микробного заражения в среду культивирования добавляли антибиотик-антимикотик согласно прописи фирмы Sigma-Aldrich. В другом варианте клетки крови культивировали в среде, кондиционированной первичными клетками гонад. Для приготовления кондиционированной среды клетки гонад культивировали в питательной среде вышеуказанного состава до достижения монослоя (3–4 суток культивирования), после чего среду частично заменяли свежим питательным раствором. Полученный супернатант очищали от клеточных включений путем центрифугирования при 3000 об/мин 15 мин. Кондиционированную среду перед использованием разбавляли свежим питательным раствором в соотношении 1:3.

Клетки культивировали в лунках 24-луночного планшета в течение 10–15 суток.

Результаты

Морфология ПЗК.

ПЗК, выделенные вместе с кровью, отличаются от клеток крови большими размерами. ПЗК круглой формы с большим количеством гранулярных включений. Ядро занимает большую часть цитоплазмы. При окрашивании реактивом Шиффа они дают малиново-красный цвет (рис. 2).

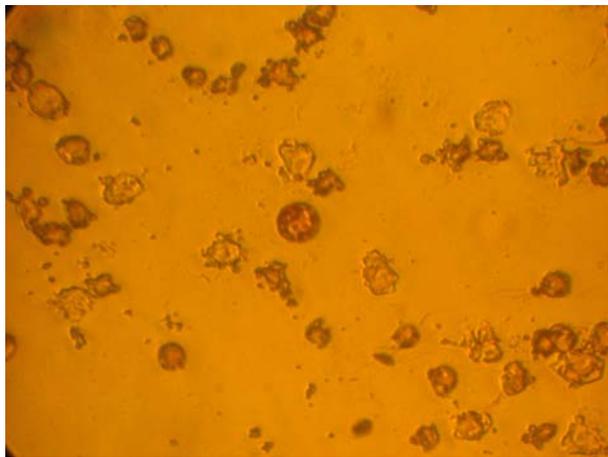


Рис. 2. Первичная зародышевая клетка (в центре) в препарате крови (×240)

Культивирование ПЗК из гонад.

При культивировании общей популяции клеток, приготовленных из гонад 6-суточных эмбрионов, характер культуры зависел от концентрации высеянных на культивирование клеток. Если плотность клеток обеспечивала формирование монослоя в течение 2–3 суток культивирования, то в течение последующих 7–8 суток заметных изменений с культурой не происходило (рис. 3). При этом первичные зародышевые клетки, находящиеся в гонадах, не проявляют признаков роста.



Рис. 3. Монослой, сформированный клетками гонад (8 сутки культивирования) (×240)

В случае более редкой плотности посева клеток в культуре, начиная с 3 суток, появлялись плотно упакованные группы клеток. Размеры этих колоний увеличивались в течение последующих 15 суток культивирования. При окрашивании с реактивом Шиффа они дают яркую малиновую окраску, характерную для ЭГК (рис. 4). ЭГК формируют колонии округлой формы, где клетки располагаются в несколько слоев.

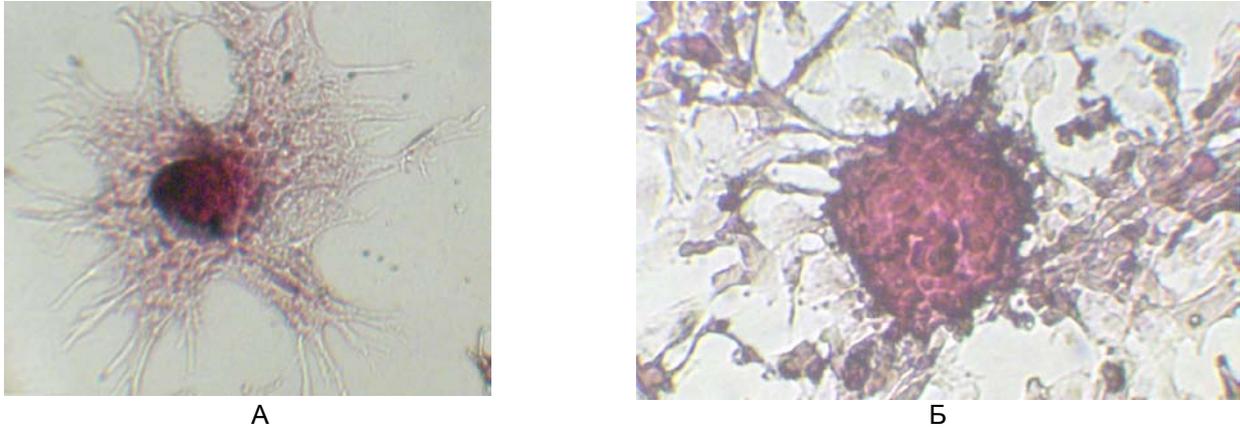


Рис. 4. Колонии эмбриональных зародышевых клеток, появляющиеся в культуре клеток гонад на 6–7 (А) и 15 (Б) сутки культивирования (×240)

Культивирование ПЗК из эмбриональной крови.

При культивировании клеток крови с питательной средой без кондиционирования практически все клетки на 2–3 сутки приобретают веретенообразную форму и очень слабо прикрепляются к подложке культивирования (рис. 5А). На 4–5 сутки культивирования довольно слабое взбалтывание чашек приводило к тому, что все клетки откреплялись от подложки и переходили в суспензию. С 5–6 суток клетки в такой культуре начинают деградировать, а на 7–8 день в культуре не остается практически ни одной живой клетки (рис. 5Б).

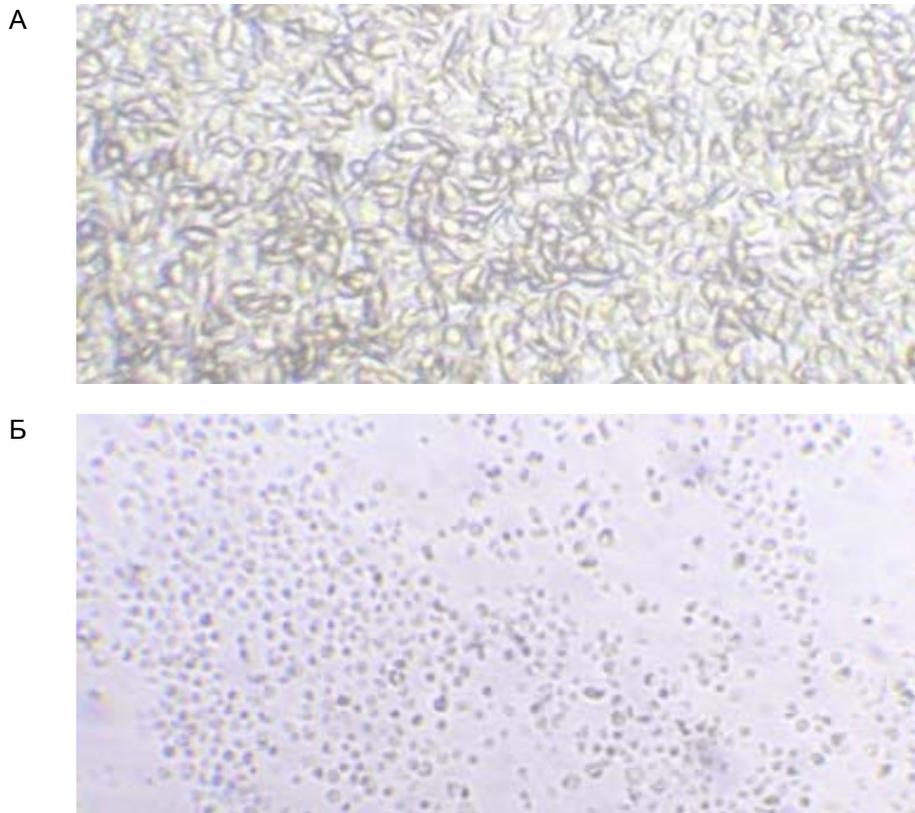
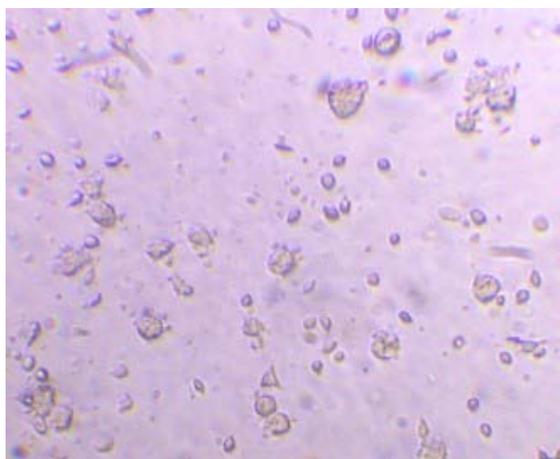
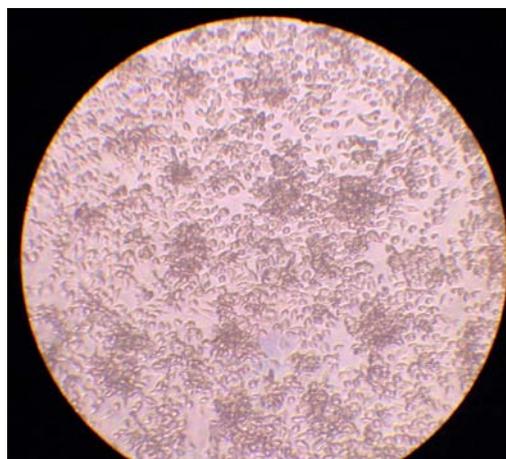


Рис. 5. А. Клетки крови на 2–3 сутки культивирования приобретают веретенообразную форму. Б. Дегенерация клеток крови на 7 сутки культивирования (×240)

При культивировании клеток крови с питательной средой, предварительно кондиционированной с клетками гонад, на 4–5 сутки в чашках появляются отдельные прикрепленные к подложке клетки (рис. 6А), а на 7–9 сутки колонии этих клеток значительно разрастаются в размерах (рис. 6В).



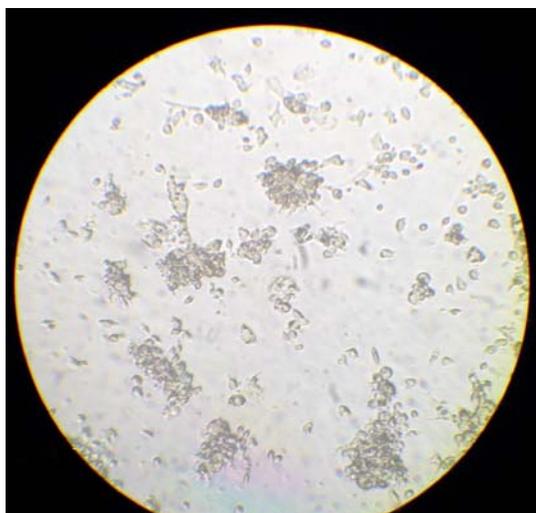
А



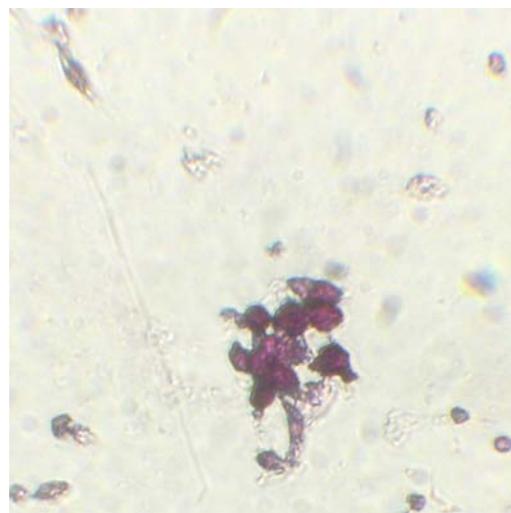
Б

Рис. 6. А. На 4–5 сутки культивирования с кондиционированной средой в чашках появляются отдельные прикрепленные к подложке клетки ($\times 150$). **Б.** На 7–9 сутки количество клеток в колониях значительно увеличивается ($\times 120$)

Небольшое взбалтывание такой культуры позволяет перевести клетки крови в суспензию, а некоторая часть циркулирующих с кровью клеток остается прикрепленной к подложке (рис. 7А). При обработке реактивом Шиффа прикрепленные клетки окрашиваются в яркий малиново-красный цвет, характерный для ЭГК (рис. 7Б).



А



Б

Рис. 7. А. После удаления клеток крови в чашке остаются прикрепленные к подложке эмбриональные зародышевые клетки ($\times 120$). **Б.** Культивированные эмбриональные зародышевые клетки, окрашенные реактивом Шиффа ($\times 240$)

Обсуждение и выводы

T.Park и J.Nap сообщают о возможности культивирования ПЗК вместе со стромальными клетками гонад (Park, Nap, 2000), при условии обогащения среды ростовыми факторами. Возможно, для такого роста требуется добавка в среду культивирования специфических факторов, стимулирующих рост и ингибирующих дифференцировку клеток. Результаты, полученные в наших экспериментах, показывают, что в монослойной культуре клеток гонад ЭГК не проявляют тенденции к формированию колоний. Но, в то же время, при более редкой плотности посева наблюдается интенсивный рост отдельных групп клеток, окрашивающихся в характерный для ЭГК малиново-красный цвет.

Появление в культурах клеток, выделенных из гонад, разрастающихся колоний ЭГК свидетельствует о том, что они обеспечиваются необходимыми факторами роста стромальными клетками, находящимися в культуре. Поэтому можно предположить, что кондиционированная среда будет способна поддерживать рост и развитие ПЗК, находящихся в крови. Использование такого подхода, на самом деле, показало возможность выделения ПЗК из популяции клеток, циркулирующих в кровеносной системе. Эти клетки прикрепляются к подложке культивирования и делятся. При обработке реактивом Шиффа они окрашиваются в малиново-красный цвет, характерный для ПЗК. Преимущество использования ПЗК из крови в том, что на 13–14 стадиях развития существует меньшая вероятность начала дифференцировки ПЗК, чем на более поздних стадиях.

Использование кондиционированной среды для культивирования клеток крови эмбрионов после 50 часов инкубации способствует избирательному прикреплению первичных зародышевых клеток к подложке культивирования. ПЗК начинают прикрепляться на 4 день, а на 7 сутки формируют хорошо заметные колонии, в то время как клетки крови начинают дегенерировать, начиная с 5 суток культивирования. Данный метод позволяет провести отделение первичных зародышевых клеток от клеток крови и их культивирование. При использовании той же самой среды без кондиционирования с клетками гонад первичные зародышевые клетки, находящиеся в эмбриональной крови, не обнаруживают тенденции к прикреплению к подложке.

Таким образом, в результате наших исследований разработан метод выделения и очистки из эмбриональной крови популяции клеток, которые проявляют гистохимические свойства, характерные для ЭГК птиц, – положительная реакция на реактив Шиффа на данной стадии развития. Следует, однако, отметить, что главный вопрос о том, сохраняют ли они при этом плюрипотентные свойства, остается открытым. Окончательный ответ на этот вопрос можно получить лишь после получения химерных цыплят с использованием культивированных ЭГК и анализа их потомства.

Список литературы

- Лимм Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М: Мир, 1969. – С.645.
- Объекты биологии развития / Под редакцией Б.Л.Астаурова. – Москва: Наука, 1975. – 579с.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.N., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // *Nature*. – 1984. – Vol.302. – P. 255–256.
- Clawson R.C., Domm L.V. Origin and early migration of primordial germ cells in the chick embryo: A study of the stages definitive primitive streak through eight somites // *American Journal of Anatomy*. – 1969. – Vol.125. – P. 87–112.
- Doetschman T.C., Williams P., Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells // *Dev. Biol.* – 1988. – Vol.127. – P. 224–227.
- Evans M.J., Kaufman M.N. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. – 1981. – Vol.292. – P. 154–156.
- Eyal-Giladi H., Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick I. General morphology // *Developmental Biology*. – 1976. – Vol.49. – P. 321–337.
- First N.L., Sims M.M., Park A.P., Kent-First M.J. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1994. – Vol.6. – P. 553–562.
- Giles J.R., Yang X., Mark W., Foote R.H. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocyst or morulae // *Mol. Reprod. Dev.* – 1993. – Vol.36. – P. 130–138.
- Howarth B. Physiology of reproduction: the male // In: *Poultry Production* (edited by P.Hunton). – Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science B.V., 1995. – P. 243–270.
- Karagenc L., Cinnamon Y., Ginsburg M., Petite J.N. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo // *Developmental Genetics*. – 1996. – Vol.19. – P. 290–301.
- Kawashima T., Kano K., Kannan Y. et al. Embryonic fibroblast-conditioned medium enhances viability and proliferation of chick circulating primordial germ cells (cPGCs) in suspension culture // *Journal of Reproduction and Development*. – 2002. – Vol.48. – P. 143–150.
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B.L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture // *Cell*. – 1992 – Vol.70. – P. 841–847.
- Meyer D.B. The application of histochemical reactions to whole chick embryos // *Anatomical Record*. – 1958. – Vol.130. – P.339.
- Park T.S., Han J.Y. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken // *Molecular reproduction and development*. – 2000. – Vol.56. – P. 475–482.
- Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture // *Nature*. – 1992. – Vol.359. – P. 550–551.

Song Y., D`Costa S., Pardue S.L., Petite J.N. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion // *Molecular Reproduction and Development.* – 2005. – Vol.70. – P. 438–444.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science.* – 1998. – Vol.282. – P. 1145–1147.

Ukeshima A. Abandonment of germ cells in the embryonic chick ovary: TEM and SEM studies // *Anatomical Record.* – 1994. – Vol.240. – P. 261–266.

Whiller N.B. Development and validation of swine embryonic stem cells // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1994. – Vol.6. – P. 563–568.

Представлено: С.І.Ковтун

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським

© М.Т.Тагіров, О.В.Терещенко, О.Б.Артеменко, Л.В.Терещенко, 2009