

Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда

А.А. Чиркин*, М.М. Зафранская, Т.А. Толкачева

**Учреждение образования «Витебский государственный
университет им. П.М. Машерова»*

***Учреждение образования «Международный государственный экологический
университет им. А.Д. Сахарова»*

Реакция изолированных клеток на действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда зависит от типа клеток и дозы действующих веществ: малые дозы стимулируют антиоксидантный эффект нейтрофильных лейкоцитов, а относительно высокие дозы активируют фагоцитоз макрофагами и модулируют метаболизм и функции тканевых лимфоцитов. Гидрофильные компоненты куколок дубового шелкопряда были получены в первые два месяца диапаузы. Они включали три группы веществ: биополимеры (белки и нуклеопротеиды), пептиды и низкомолекулярные биорегуляторы. Гемолимфа куколок в этом периоде обогащается продуктами гистолитиз тканей, поскольку выявлена интенсивная гибель резидентных и циркулирующих клеток по механизмам апоптоза. Пептиды такой гемолимфы обладают способностью подавлять жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток. Таким образом, в первой четверти диапаузы куколок дубового шелкопряда продолжается гистолитиз тканей и цитолитиз клеток, что может быть использовано в биотехнологии для получения фармацевтических субстанций.

Ключевые слова: дубовый шелкопряд, гистолитиз, культивирование клеток, стволовые клетки, апоптоз, жизнеспособность клеток.

Cell viability of oak silkworm pupae

A.A. Chirkin*, M.M. Zafranskaya, T.A. Tolkacheva

** Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»*

***Educational establishment «International State Ecological University named
after Andrei Sakharov»*

Reaction of isolated cells on the effect of hydrophilic oak silkworm pupae components depends on the cell type and dose of active ingredients: low doses stimulate the antioxidant effect of neutrophil leukocytes, but relatively high doses activate phagocytosis by macrophages and modulate the metabolism and function of tissue lymphocytes. Hydrophilic components of the oak silkworm pupae were obtained in the first two months of diapause. They included three groups of substances: biopolymers (proteins, nucleoproteins), peptides and low molecular weight bioregulators. Hemolymph of pupae during this period is enriched by products of tissue histolysis, since intense destruction of resident and circulating cells of the apoptosis mechanisms was revealed. Peptides of such hemolymph have the ability to inhibit the viability of mesenchymal stem cells. Thus, in the first quarter of the diapause of pupae of *A. pernyi* histolysis of tissues and cytolysis of cells continues which can be used in biotechnology to produce pharmaceutical substances.

Key words: oak silkworm, histolysis, culturing cells, stem cells, apoptosis, cell viability.

Голометаболические насекомые с полным превращением характеризуются тем, что у них между личиночной и взрослой стадиями происходит внезапная и резкая трансформация. Ювенильная личинка (гусеница) по мере роста претерпевает серию линек. Процесс линьки инициируется в мозге, нейросекреторные клетки которого в ответ на нервный, гормональный или средовый сигналы выделяют проторакотропный гормон (ПТТГ) – пептидный гормон с молекулярной массой 40 кДа, стимулирующий образование экдизона клетками проторакальной железы. С участием гидроксилазной системы

периферических тканей экдизон превращается в активную форму – экдистерон. Развитие личинок до метаморфозной линьки контролирует ювенильный гормон, образуемый в прилежащих телах. В присутствии ювенильного гормона стимулированная экдизоном линька завершается переходом личинки в новый возраст. У личинок последнего возраста синтез ювенильного гормона постепенно прекращается и его содержание падает ниже порогового уровня. Это событие индуцирует выделение ПТТГ, который стимулирует синтез экдизона и его превращение в экдистерон. Такой гормональный

фон переводит клетки на путь, ведущий к окукливанию.

Личинка последнего возраста трансформируется в куколку. Куколка не питается, а живет за счет энергии пищи, потребляемой личинкой. В куколке происходят процессы гистоллиза и гистогенеза. Гистоллиз – разрушение подлежащих замене в ходе метаморфоза тканей и органов личинки, которое осуществляется при помощи *автолиза*, *лиоцитоза* и *фагоцитоза*. Содержимое куколки как бы возвращается к недифференцированному состоянию яйца. Гистоллизу подвергаются все системы организма личинки, кроме нервной, половой, а также спинного сосуда. В дальнейшем гистоллиз сменяется гистогенезом, конечной целью которого является построение из образовавшейся жидкой массы новых, имагинальных органов. Важную роль при гистогенезе также играют имагинальные зачатки – группы клеток, из которых возникают те или иные ткани и органы. Таким образом, в голометаболических личинках имеются две популяции клеток: личиночные клетки, функционирующие на ювенильных стадиях, и имагинальные клетки, собранные в кластеры, ждущие сигнала, чтобы приступить к дифференцировке [1]. Кроме того в гемолимфе обнаруживаются 5 типов циркулирующих гемоцитов: прогематоциты (стволовые клетки), плазматоциты и три типа специализированных клеток [2–3].

Ранее было показано, что реакции изолированных клеток на действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда зависят от типа клеток и дозы экстракта: малые дозы стимулируют антиоксидантный эффект нейтрофилов, а относительно высокие дозы активируют фагоцитоз макрофагами и модулируют метаболизм и функции тканевых лимфоцитов [4]. Поскольку экстракт куколок получался в сентябре-октябре месяцах года, т.е. в первой четверти диапаузы, целью нашей работы было – оценить жизнеспособность клеток (включая стволовые клетки) содержимого куколок и выявить особенности влияния гидрофильных компонентов куколок на культивирование стволовых клеток.

Материал и методы. На первом этапе работы исследовали жизнеспособность клеток жирового тела и гемолимфы методом культивирования.

Для культивирования клеток жирового тела использовали следующие среды:

1) модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 4,5 г/л с добавкой 10% эмбриональной телячьей сыворотки; pH доведен до 6,3 добавкой NaH_2CO_3 0,2М;

2) модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 1 г/л с добавкой 20% эмбриональной телячьей сыворотки; pH доведен до 6,3 добавкой HCl;

3) среда 199 с добавкой 20% эмбриональной телячьей сыворотки; pH доведен до 6,3 добавкой HCl.

Для культивирования клеток жирового тела и гемолимфы использовали модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM) с содержанием глюкозы 1 г/л с добавкой 10% эмбриональной телячьей сыворотки; pH 8.

Получение гемолимфы: куколку анестезировали выдерживанием кокона на льду. Скальпелем срезали каудальный конец (≈ 5 мм) и собирали вытекающую гемолимфу в стерильную пробирку эппендорф. В работе использовали гемолимфу куколок, разведенную 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:3.

Получение клеток жирового тела: после сбора гемолимфы хитиновый покров куколки разрезали продольно, извлекали жировое тело, измельчали ножницами и инкубировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с коллагеназой (0,075%) при 37°C 1 час. Клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали ФСБ и переводили в питательную среду.

Культивирование: клетки ($3,2 \cdot 10^7$ клеток жирового тела или $2 \cdot 10^5$ клеток гемолимфы) высевали в чашки Петри (21 см²) в 4 мл среды и инкубировали во влажном эксикаторе при 27°C. По истечении 1 суток проводили смену среды для удаления неприкрепившихся клеток.

Окраска ядер: клетки инкубировали 15 минут в ФСБ с добавкой флуоресцентного красителя Хехст-33342 (по 10^{-5} М) или красителей Хехст-33342 и йодистого пропидия (по 10^{-5} М).

На втором этапе исследования изучали влияние фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащих пептиды, на культивирование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани крыс (ЖТК).

Окраска CFSE: МСК ЖТК крысы, полученные трипсинизацией 3-го пассажа при конфлюэнтности $\approx 75\%$, дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добавкой 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (РНПЦ ЭиМ, РБ), ресуспендировали до концентрации 10^6 клеток/мл в ФСБ с добавкой 10% ЭТС и 7мМ CFSE. Инкубировали 10 минут (37°C, атмосфера 5% CO_2 , влажность 99%) и дважды отмывали в ФСБ с добавкой 5% ЭТС.

Посев и инкубация: окрашенные МСК разводили до концентрации 10^4 клеток/мл в среде DMEM (Sigma) с содержанием глюкозы 1 г/л

с добавками 10% ЭТС, 1% глутамина и 1% антибиотика (Sigma). Суспензию клеток разливали по 1 мл в лунки 24-луночного планшета (10^4 клеток/лунку, или $\approx 5 \cdot 10^3$ клеток/см²). В опытные лунки добавляли по 10 или 100 мкл фракции гемолимфы (получали разведения гемолимфы 1:100 и 1:10, соответственно), в контрольные – по 10 или 100 мкл дистиллированной воды и перемешивали. Опыт с каждой из фракций и контроль для каждого планшета ставили в дуплетах. Инкубировали 5 дней (37°C, атмосфера 5% CO₂, влажность 99%). Использовали фракции гемолимфы, полученные методом гель-хроматографии на Сефадексе G25 fine, содержащие пептиды (№ 10–29). Перед посевом для снижения риска бактериальной контаминации размороженные фракции гемолимфы подвергали центрифугированию и отбирали для опыта жидкость из верхних слоев.

Регистрация результатов: из лунок удаляли среду, осторожно ополаскивали лунки ФСБ, добавляли 0,5 мл/лунку 0,25% раствора трипсина/ЭДТА (Sigma), инкубировали 10 минут (37°C, атмосфера 5% CO₂, влажность 99%), пипетировали, переносили в пробирку эппендорф и дважды отмывали в ФСБ. Измерения и анализ полученных результатов проводился на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500. Дуплеты образцов объединяли (смешивали).

Результаты и их обсуждение. При выполнении первого этапа работы установлено, что в культуре клеток жирового тела после смены среды через 1 сутки после посева наблюдались многочисленные округлые слабо распластанные клетки с везикулами в цитоплазме и единичные неправильной формы сильно распластанные (рис. 1–2). К 6-м суткам сильно распластанных клеток не наблюдалось.

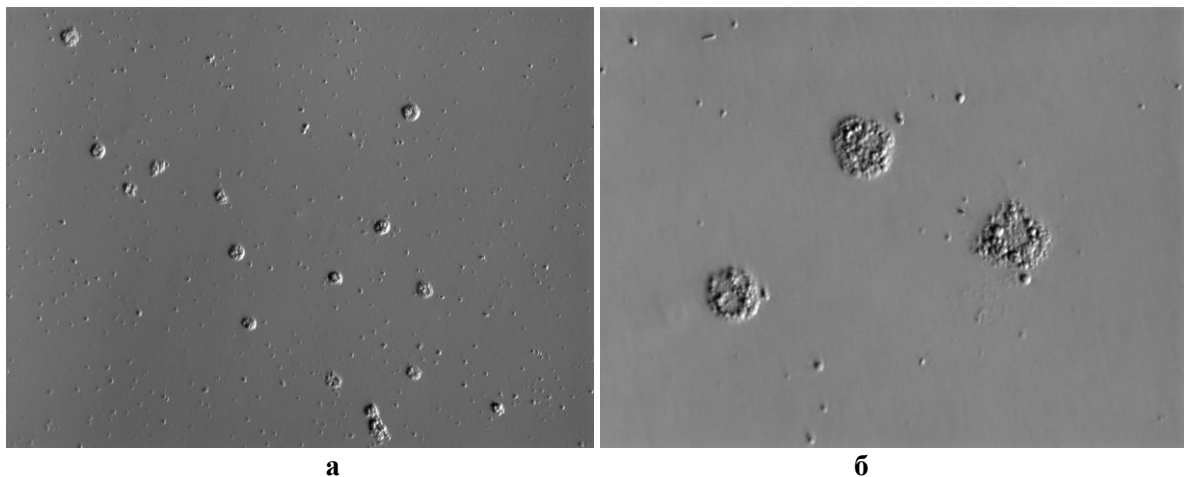


Рис. 1. Клетки ЖТ в среде 1, 1-е сутки культивирования:
а) увеличение 100х, б) увеличение 400х.

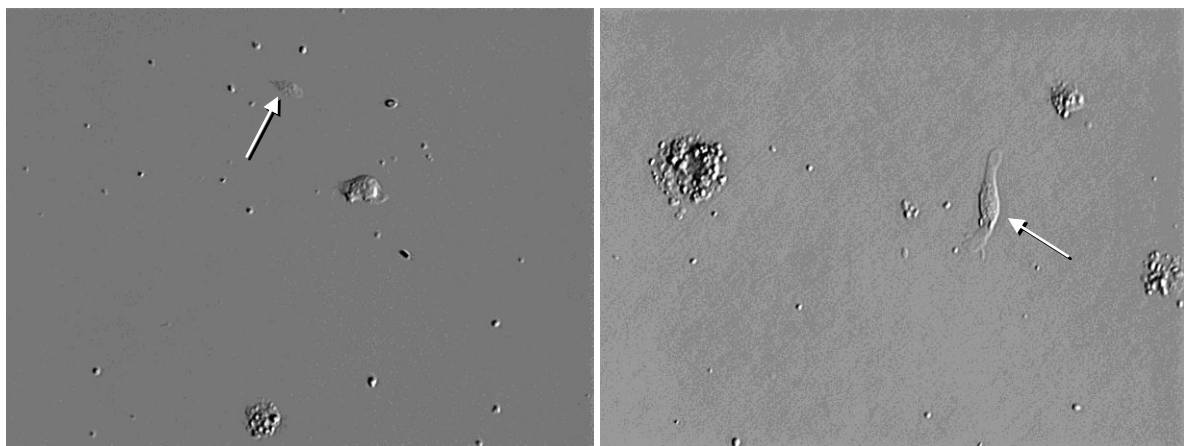


Рис. 2. Клетки ЖТ в среде 3, 1-е сутки культивирования.
Увеличение 400х. Стрелками отмечены распластанные.

В культуре гемолимфы наблюдались округлые клетки разного размера с менее выраженной зернистостью цитоплазмы по сравнению с преобладающим типом клеток жирового тела (ЖТ) (рис. 3).

Окраска Хехстом-33342 клеток гемолимфы, инкубировавшихся 6 суток в среде 2, выявила в большинстве клеток картину апоптоза (пикнотические или фрагментированные ядра) (рис. 4).

При окраске комбинацией красителей (Хехст-33342 и йодистый пропиций – стандартный метод оценки жизнеспособности) клеток гемолимфы, инкубировавшихся 2 суток, обнаружено красное (характерное для нежизнеспособных) свечение ядер у всех наблюдавшихся клеток, при этом морфология ядра у большинства была апоптотической. Значительная часть клеток находилась в составе агрегатов.

Таким образом, из гемолимфы и жирового тела куколок дубового шелкопряда удастся выделить клетки, прикрепляющиеся к культуральному пластику. Однако состояние большинства из этих клеток характеризуется гибелью по механизмам апоптоза. Применявшиеся среды не поддерживают их рост и не обеспечивают сохранение жизнеспособности клеток более 1 суток. Следовательно, в первой четверти диапаузы куколок дубового шелкопряда выявляются признаки продолжающегося гистолиза, что может обогащать гемолимфу продуктами распада клеток.

На втором этапе исследования изучали влияние среднемолекулярных (пептидных) фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда в разведениях 1:10 и 1:100 на пролиферацию и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы.

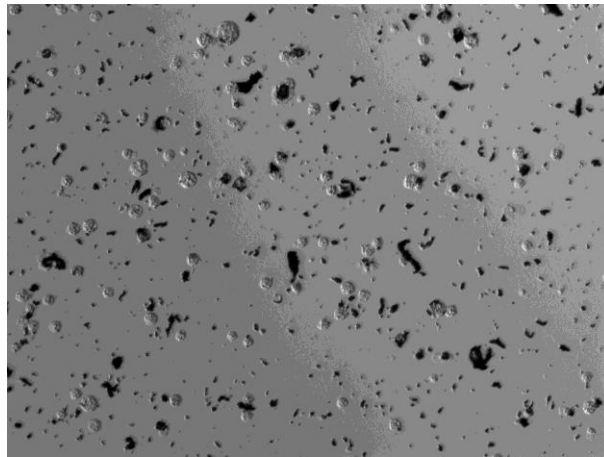


Рис. 3. Клетки гемолимфы на 2-е сутки культивирования. Увеличение 100х.

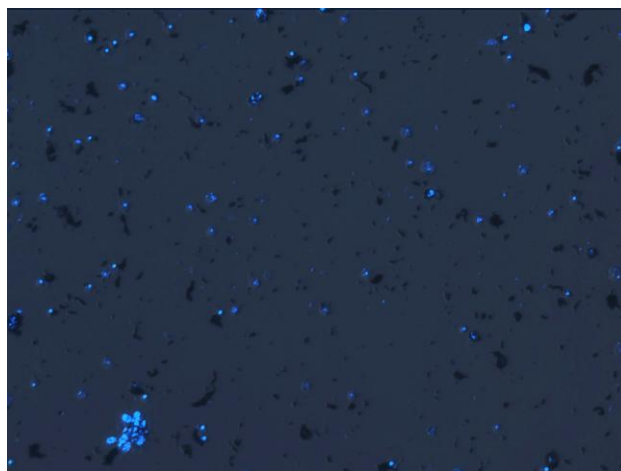


Рис. 4. Клетки гемолимфы в среде 2, 6-е сутки культивирования, окраска Хехстом-33342. Увеличение 100х.

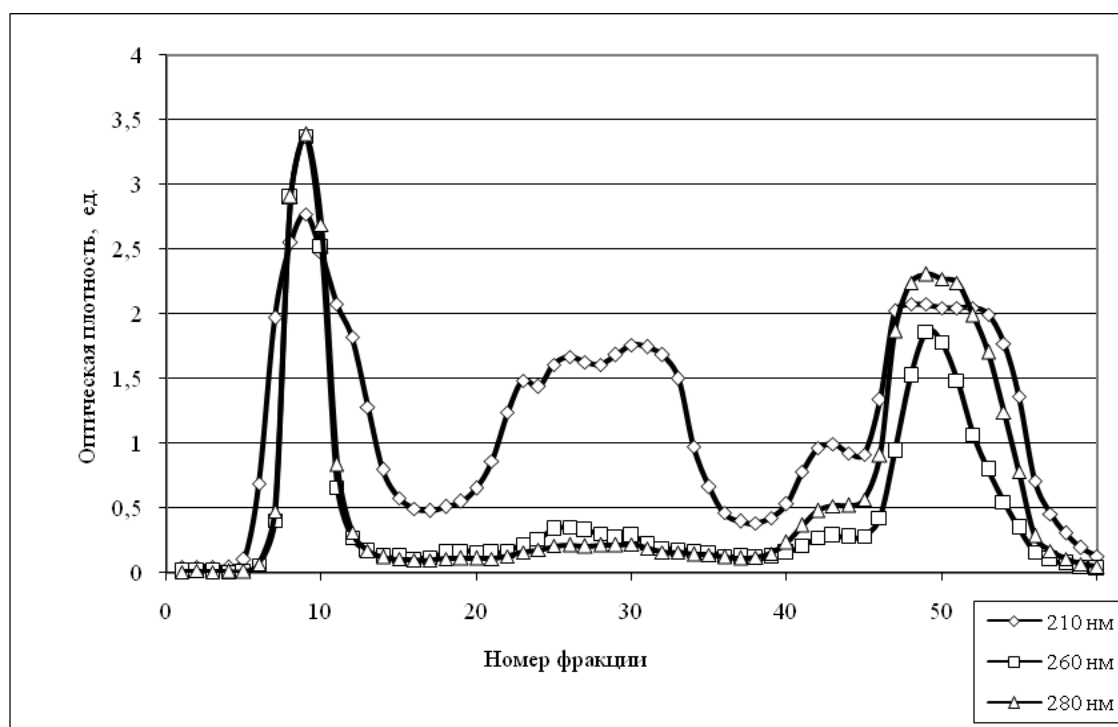


Рис. 5. Относительное распределение оптических плотностей фракций гемолимфы при трех длинах волн. Хроматографическая колонка, заполненная Sephadex G25 fine. Высота колонки 25 см, диаметр – 2,5 см, объем – 125 см³. Использовали для элюции 0,01 М NH₄HCO₃. Анализ элюатов (пробирки 1–60) проводили путем спектрофотометрии при 210, 260 и 280 нм.

Установлено, что в гомогенате гемолимфы находятся 3 группы веществ: макромолекулы (белки и нуклеиновые кислоты, фракции 7–13), вероятно пептиды и нуклеотиды (фракции 15–30) и низкомолекулярные биорегуляторы (фракции 34–52) (рис. 5). Белок регистрируется в первом пике (фракции 7–13). Следы белка находятся также во фракциях 22–29. Сульфгидрильные группы, восстановленный глутатион и мочевая кислота выявляются в области локализации белка (фракции 8–11, 8–11 и 7–12, соответственно) и в области пептидов (фракции 23–29, 25–27 и 25–28, соответственно).

Ожидалось, что при выраженном стимулирующем либо ингибирующем пролиферацию МСК действии фракций гемолимфы будут отмечены: 1) различия в среднем количестве циклов деления (индикатор количества циклов деления – «ступенчатое» разделение клеток на субпопуляции по степени окрашенности CFSE: меньшее количество красителя соответствует большему количеству делений); 2) различия по жизнеспособности; 3) различия по общему количеству клеток; 4) различия будут дозозависимыми, т.е. более выражены в образцах, инкубировавшихся с фракциями в разведении 1:10, чем 1:100.

Однако четкого разделения клеток по степени окрашенности CFSE в соответствии с количеством циклов деления обнаружить не удалось (из-за разнообразия размеров клеток и, возможно, неодинаковой степени окрашивания в начале опыта). Выявленное деление клеток на 2 четкие популяции по окрашенности CFSE отражает скорее жизнеспособность клеток: в более яркую область группируются некротические и апоптотические клетки, в менее яркую – жизнеспособные. Часть яркоокрашенных клеток по соотношению прямого и бокового рассеяния относится к популяции жизнеспособных клеток (возможно, это ранние стадии апоптоза; мелкий размер этих клеток заставляет исключить предположение, что они представляют неделяющуюся часть основной жизнеспособной популяции). Доля этих клеток изображена на рис. 6, из которого видно, что четких отличий от контроля и выраженной дозовой зависимости процента яркоокрашенных клеток от количества гемолимфы в культуре не наблюдается. Однако имеется существенное различие в соотношении клеток, обработанных фракциями 10–24 и 24–29. По всей видимости, в заключительных порциях пептидной фракции гемолимфы (фракции

25–28) имеются факторы проапоптогенного действия, которые не содержатся во фракциях высокомолекулярных пептидов и белков (10–24). Не случайно именно в этих фракциях выявлены восстановленный глутатион и мочевая кислота, обладающие антиоксидантными эффектами.

Жизнеспособность МСК в большинстве образцов, инкубировавшихся с фракциями гемолимфы, была ниже, чем в контроле, однако снижение не было дозозависимым (рис. 7). Следует обратить внимание на два факта: 1) гемолимфа в разведении 1:10 фракций 15 и 25 оказывает противоположное действие на жизнеспособность МСК; 2) количество жизне-

способных клеток МСК существенно уменьшается после добавления заключительных порций пептидной фракции гемолимфы (фракции 25–28), в которых, возможно, имеются факторы (олигопептиды) проапоптогенного действия.

Полученные результаты позволяют думать о том, что во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда содержатся пептиды, подавляющие жизнедеятельность стволовых клеток.

Общее количество клеток (учтенное в одинаковых объемах) в образцах, инкубировавшихся с фракциями гемолимфы, было меньше, чем в контроле, но дозовой зависимости от содержания гемолимфы не выявлено (рис. 8).



Рис. 6. Яркоокрашенная CFSE популяция МСК в образцах, % от жизнеспособных окрашенных CFSE клеток.

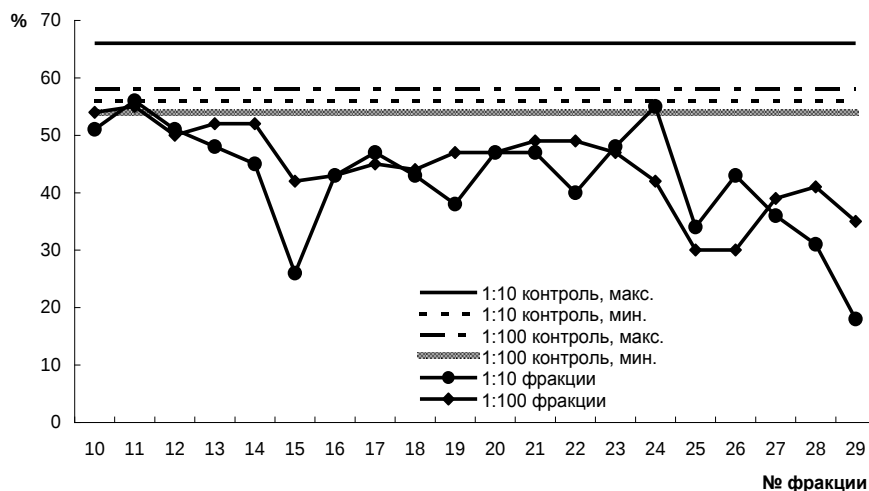


Рис. 7. Жизнеспособность МСК в образцах, % от общего числа окрашенных CFSE клеток.

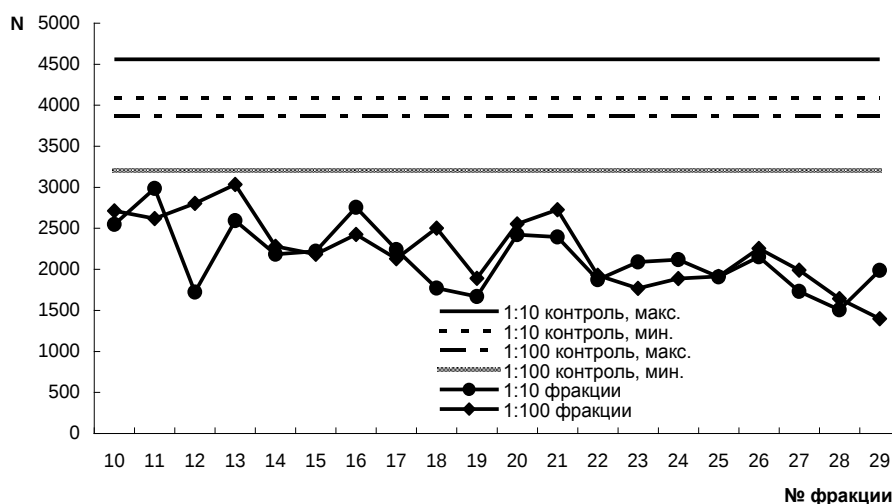


Рис. 8. Общее количество окрашенных CFSE клеток.

Итак, в результате проведенных исследований было показано, что в первой четверти диапаузы куколок дубового шелкопряда продолжается разрушение оставшихся тканей и клеток гусеницы пятого возраста, перешедшей в фазу окукливания. Основной механизм гибели клеток в этом периоде – это апоптоз. Такой сценарий оправдан, поскольку, в отличие от некроза, в этих условиях не развивается воспалительная реакция. В результате гистолиза тканей и цитолиза клеток формируются три основные группы веществ, причем во фракции олигопептидов выявляется активность, подавляющая развитие мезенхимальных стволовых клеток. Можно предположить, что такая ситуация будет поддерживаться этими и другими механизмами до периода начала гистогенеза, т.е. формирования тканей и органов бабочки.

Наряду с теоретической значимостью, выявленные особенности ранней диапаузы куколок дубового шелкопряда имеют очевидное практическое значение, поскольку в процессе гистолиза формируется жидкое содержимое куколок, включающее строительные и энергетические материалы для построения эукариотических клеток, а также формируются системы антиоксидантной защиты содержимого куколок от

окислительного стресса и способы подавления функционирования стволовых клеток. Молекулы, обеспечивающие эти процессы, представляют интерес для биотехнологии фармацевтических субстанций в связи с их оптимизированным соотношением и биосовместимостью с эукариотическими клетками.

Вывод. Гистолиз продолжается в первой четверти диапаузы куколок дубового шелкопряда и включает два основных процесса: 1) интенсивную гибель резидентных и циркулирующих клеток по механизмам апоптоза и 2) действие веществ пептидной природы, подавляющих жизнеспособность стволовых клеток.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант БР09-154).

ЛИТЕРАТУРА

1. Белошапкин, С.П. Словарь-справочник энтомолога / С.П. Белошапкин [и др.], сост. Ю.А. Захваткин, В.В. Исаичев. – М.: Нива России, 1992. – 334 с.
2. Гилберт, С. Биология развития: в 3 т. / С. Гилберт; пер. с англ. – М.: Мир, 1995. – Т. 3. – 352 с.
3. Радкевич, В.А. Экология листогрызущих насекомых / В.А. Радкевич. – Минск: Наука и техника, 1980. – 240 с.
4. Чиркин, А.А. Реакции изолированных клеток на действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2009. – Т. 8. – С. 278–298.

Поступила в редакцию 17.02.2011. Принята в печать 26.02.2011

Адрес для корреспонденции: 210038, г. Витебск, Московский пр-т, 33, ВГУ, кафедра химии, e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.