Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Средняя общеобразовательная школа № 3»
города-курорта Железноводска Ставропольского края

номинация «Биотехнология»

Инъекционная трансплантация клеток от трансгенных рыбок Glofish *α-actin-RFP* диким данио-рерио в качестве биомаркеров

Автор:
Ким Ангелина
обучающиеся 11 класса
Руководитель:
Щербатюк Михаил Валерьевич
учитель биологии

Железноводск
2020

Оглавление

Введение……..…..3
Историческая справка…….……...……4
Анализ и противоречия…….....6
1.Описание метода инъекционной аллотрансплантации…….....……..…….6
2.Схема манипуляций…….……...……8
3.Постановка эксперимента……....…9
3.1. Приготовление клеточной суспензии…….9
3.2. Внутримышечная трансплантация клеток скелетных мышц
взрослому дикому данио……...12
3.3. Наблюдение за трансплантатном «In vivo»…….....13
4.Обсуждение результатов эксперимента……...……13
Вывод…….…14
Список литературы……15
Фотоальбом…….....16

Введение

Понятие биомаркера было предложено в 2001 году Национальным институтом здоровья США. Оно формулировалось как характеристика, которую можно объективно измерить, и которая может служить в качестве индикатора физиологических и патологических биологических процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство.

К наиболее известным биомаркерам относятся, видимо, такие давно используемые характеристики, как температура тела, кровяное давление, частота пульса.

В настоящее время понятие биомаркеров достаточно широко. В генетике, например, это последовательности ДНК или РНК, которые ассоциированы с развитием заболевания (связаны с восприимчивостью к болезни или вызывают заболевание). Биомаркерами являются все результаты медицинских анализов. Иллюстрацией последнего могут быть исследования плазмы крови на наличие белков-биомаркеров аутизма. Биомаркеры могут представлять собой вещество, чьё обнаружение указывает на конкретное болезненное состояние или присутствие чужеродных организмов. Так, специфические антитела указывают на конкретную инфекцию.

Биомаркером может быть вещество, которое специально вводят в организм. Например, изотоп хлорида рубидия для оценки кровотока при рентгеноскопии.

Несмотря на обилие существующих биомаркеров для диагностики состояния здоровья, постоянно существует потребность в разработке их новых видов, которые могли бы применяться в наблюдении, изучении, диагностике и лечении сложных заболеваний различной природы. (Рубанович, Сальникова, 2012).

Наша исследовательская группа решила применить в качестве биомаркеров принципиально новый подход. В котором используются клетки трансгенных организмов с флуоресцентными генами, такими как ген коралла RFP и ген медузы GFP, которые ярко светятся под лучами ультрафиолетового спектра.

Актуальность работы:

Такие свойства раскрывают колоссальный диапазон возможностей позволяя использовать их в качестве биомаркеров различной направленности. Одной из которых является изучение развития, а также влияния различных химических и физических воздействий на патологические опухолевые клетки онкологической природы.

Использование таких биомаркеров дает возможность производить мониторинг продолжительное время так как они трансплантируются в организм реципиента с последующим приживлением.

В качестве доноров мы использовали генномодифицированных рыбок GloFish.

Объект исследования: Трансплантация клеток от трансгенных рыбок Glofish диким данио-рерио.

Предмет исследования: Эффективность использования клеток трансгенных данио α-actin-RFP в качестве биомаркеров.

Цель: Изучение различных биомаркеров, трансгенных технологий и методов трансплантации для создания биофлуоресцентных маркеров с последующим их вживлением в организм дикой рыбки данио-рерио.

Выявление преимуществ таких биомаркеров и способа инъекционной трансплантации. над ранее изученными способами биоиндикации in-Vivo.

Задачи:

1. Создать клеточную суспензию из трансгенных Glofish.
2. Произвести трансплантацию трансгенных α-actin-RFP клеток диким формам данио-рерио методом инъекции.
3. Провести качественный эксперимент трансплантации трансгенных α-actin-RFP клеток в качестве биомаркера.

Гипотеза:

Мы предположили, что донорские клетки, полученные от трансгенной Glofish могут быть успешно трансплантированы в организм дикой данио-рерио в качестве флуоресцентного биомаркера.

Методы исследования: качественный эксперимент, наблюдение

Историческая справка

Природный данио рерио, из которого был выращен GloFish, обитает в реках Индии и Бангладеш. Он имеет размер порядка трёх сантиметров в длину и золотые и синие полосы, расположенные вдоль тела. За последние 50 лет на рынке декоративных рыб в США этих рыбок было продано на сумму свыше 200 млн долл., однако несмотря на это, их воспроизводством в США никто не занимался, в первую очередь потому, что они являются тропическими рыбками и не могут существовать в условиях умеренного североамериканского климата.

В 1999 году доктор Чжиюань Гун и его коллеги из Национального университета Сингапура работали с геном зелёного флуоресцентного белка (GFP), который в природе встречается лишь у некоторых тихоокеанских медуз. Этот ген несёт ответственность за синтез белка-люминофора, который в темноте испускает лучи приятного зеленоватого цвета. Они вставили этот ген в эмбрион данио рерио, что позволило создать геном, который давал рыбам яркую флуоресцентную окраску как от природного белого света, так и от ультрафиолетового излучения.

Первоначальной целью генетических инженеров было облегчить наблюдение за внутренними органами этих полупрозрачных рыб. Но фотографию светящейся зеленоватым светом рыбки, показанную на научной конференции, увидел представитель компании, занимающейся разведением и продажей аквариумных рыб. По заказу фирмы в геном данио добавили ещё ген красного свечения, выделенный из морского коралла. Полученную

породу назвали «Ночная жемчужина». Особи, получившие гены ДНК медузы и коралла светятся жёлтым цветом.

В США светящиеся данио первоначально были получены с целью создания живых индикаторов загрязнения: при наличии в воде определённых токсических веществ рыбки должны были изменять окраску. Но в 2003 году бизнесмены и учёные заключили контракт, по которому на рынке появилась первая генетически модифицированная рыбка GloFish (Красовский, 2014).

В дополнение к красным флуоресцентным данио-рерио, продаваемым под торговой маркой «Красная звёздная рыбка» (англ. Starfire Red), к середине 2006 года были выведены зеленые и оранжево-желтый флуоресцентный данио, а в 2011 году, — синие и фиолетовые. Эти генетические линии рыб получили торговое наименование «Электрически-зелёная» (англ. Electric Green), «Солнечно-оранжевая» (англ. Sunburst Orange), «Космически-синяя» (англ. Cosmic Blue) и «Галактически-пурпурная» (англ. Galactic Purple). Все эти рыбки были выведены при помощи генной инженерии с использованием рекомбинантной ДНК от различных морских кораллов.

Рыбки данио являются отличной моделью для регенеративных исследований, поскольку они могут регенерировать ампутированные плавники, а также поврежденный мозг, сетчатку, спинной мозг, сердце, скелетные мышцы и другие ткани. Исследования стволовых клеток и регенерации у взрослых рыбок данио в основном сосредоточены на характеристике регенерации в ответ на травму, тогда как идентификация стволовых клеток и клеток-предшественников из различных тканей с помощью трансплантации клеток была изучена только недавно. Рерио также становится все шире используется для изучения рака путем генерации трансгенных моделей рака, которые имитируют человеческие болезни. В условиях рака подходы трансплантации клеток получили широкое распространение и позволяют делать динамическую оценку важных раковых процессов, включая самообновление, функциональную гетерогенность, пролиферацию, терапевтические реакции и инвазию. Однако привитые клетки часто отторгаются у рыб-реципиентов из-за иммунной защиты хозяина, которая атакует и убивает трансплантат . Несколько методов были использованы для преодоления отторжения прижившихся клеток. Например, перед трансплантацией иммунная система животного-реципиента может быть временно ослаблена низкими дозами гамма-излучения. Однако иммунная система реципиента восстановится через 10 дней после облучения и убьет донорские клетки . В качестве альтернативы лечение дексаметазоном использовалось для подавления функции Т- и В-клеток, обеспечивая более длительное иммуносупрессивное кондиционирование и облегчая приживление широкого спектра клеток на срок до 30 дней.

Анализ и противоречия

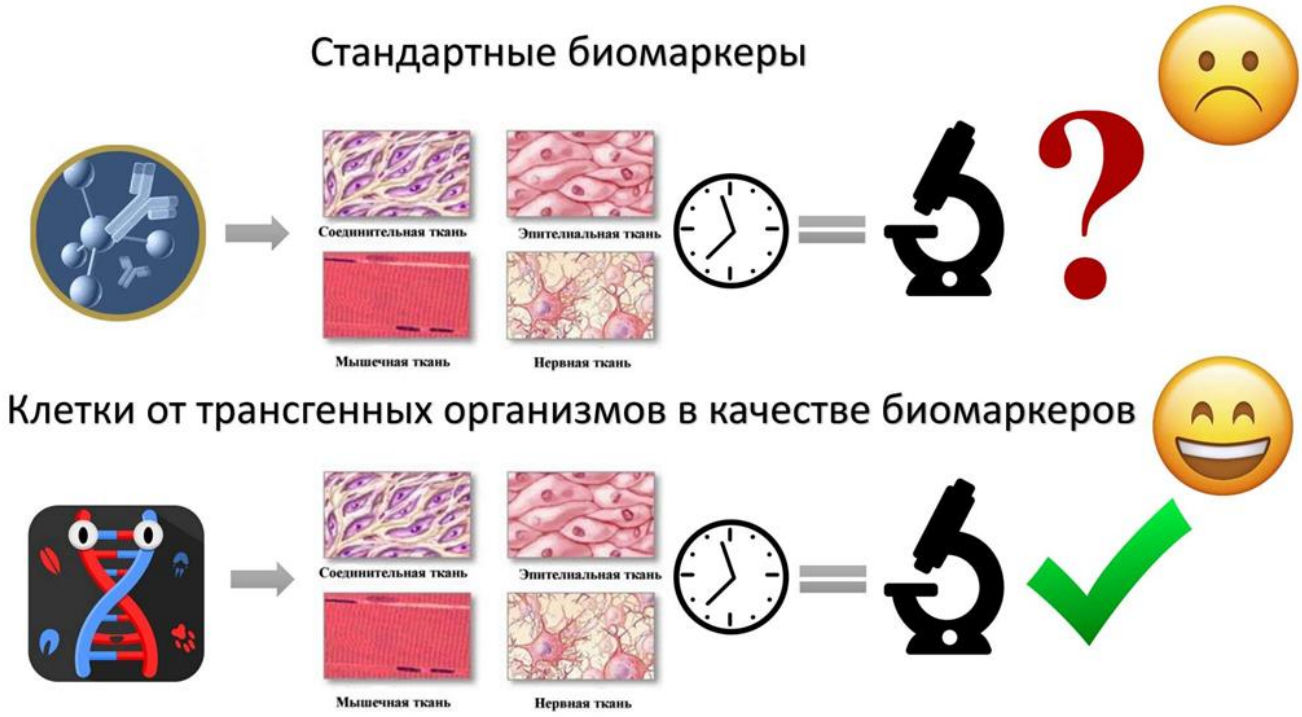

Рисунок 1 Сравнение биомаркеров

Противоречия:

В условиях развития современной генной инженерии и биомедицины сохраняется недостаток надежных биомаркеров направленных на длительное изучение динамики развития онкологических опухолей.

1.Описание метода инъекционной аллотрансплантации

Наша исследовательская группа решила применить в качестве биомаркеров принципиально новый подход. В котором используются клетки трансгенных организмов с флуоресцентными генами, такими как ген коралла RFP и ген медузы GFP, которые ярко светятся под лучами ультрафиолетового спектра.

В организм реципиента трансплантируют как чистую культуру стволовых клеток, так и суспензию, состоящую из клеток различных тканей в составе, которых по-прежнему присутствует титр стволовых клеток. Помимо клеточного материала в состав препарата входит вспомогательный буферный раствор для придания необходимых механических свойств таких как вязкость и текучесть, что даст возможность ввести его донору при помощи инъекции. После введения препарата в организм донора, трансплантируемые клетки локализуются главным образом в месте инъекции и приживаются в пределах той же области.

Выделяют:

- близкородственную аллотрансплантацию (донором трансплантата является близкий генетический родственник, первой линии родства);
- дальнеродственную аллотрансплантацию (донор является дальним генетическим родственником, второй или третьей линии родства);
- неродственную аллотрансплантацию (донором является чужой организм, вообще не находящийся в генетическом родстве с реципиентом).

Для успешной аллотрансплантации, необходимо совпадение реципиента и донора по так называемым антигенам главного комплекса тканевой совместимости (MHC), или, по крайней мере, совпадение хотя бы по пяти из шести основных антигенов MHC. Несовпадение по двум антигенам MHC не исключает возможность трансплантации в принципе, но сильно повышает вероятность отторжения трансплантата. Несовпадение по трём и более антигенам MHC исключает саму возможность трансплантации от данного донора данному реципиенту.

РТПХ (реакция «трансплантат против хозяина») представляет угрозу только при пересадке стволовых клеток от другого организма того же вида. Это реакция, при которой пересаженные клетки от неподходящего донора начинают атаковать организм нового хозяина. Реакция может быть, как незначительно выраженной, так и смертельно опасной. РТПХ может развиться вскоре после трансплантации. Для предотвращения РТПХ, иммунная система донора подавляется с помощью иммунодепрессантов еще до начала трансплантации.

Иммуносупрессиия (угнетения иммунной системы) организма реципиента, необходима чтобы подавить возможное отторжение трансплантата и обеспечить его приживаемость. При неполном совпадении по MHC или при неродственной трансплантации требования к уровню обеспечиваемой иммуносупрессии ещё выше.

Состояние подавленного иммунитета поддерживается до окончания периода реабилитации.

Сложность приживаемости компенсируется простотой манипуляций и не требует высокотехнологических технических оснащений. Метод широко используется в терапевтической, диагностической и экспериментальный медицине.

2.Схема манипуляций

Рисунок 2. Схема манипуляций.

Здесь мы представляем метод трансплантации клеток скелетных мышц взрослых рыбок данио, с иммунитетом временно ослабленным препаратами циклоспорина и дексаметазана. Флуоресцентно меченные препараты мышечных клеток из трансгенных рыбок данио α-actin-RFP приживаются при имплантации в спинную мускулатуру диких видов Данио-рерио.

3.Постановка эксперимента

3.1 Приготовление клеточной суспензии

Приготовление клеток скелетных мышц взрослых данио-доноров.

В этом эксперименте 30 *рыб*- доноров α- *актин-RFP* [25] использовали для трансплантации клеток каждой рыбе-реципиенту.

Рисунок 3. Донорские рыбки данио в 1,6 мг / мл метансульфоната трикаина в течение 10 мин или до тех пор, пока жаберные крышки не перестанут двигаться.

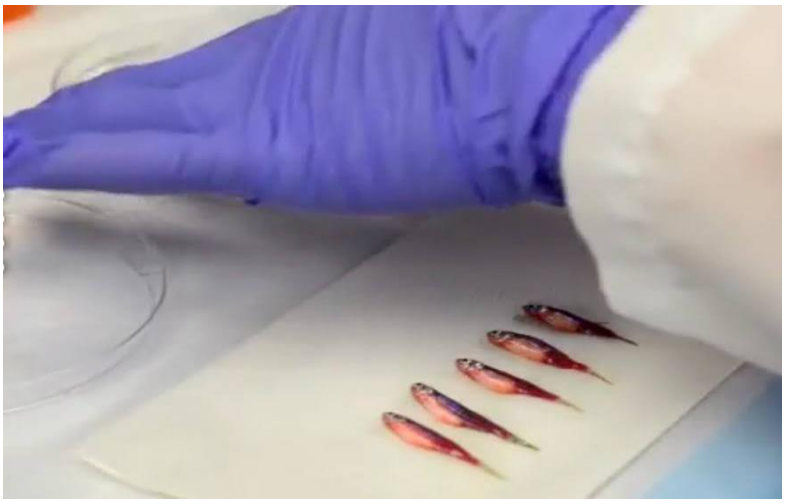

Рисунок 4. Помещение рыбы-донора на впитывающую бумажную салфетку.

Вырезание спинной мышцы, используя чистое лезвие. Разрез делали около ануса под углом 45°, чтобы максимально увеличить сбор ткани. Поместили рассеченную ткань в чистую чашку Петри диаметром 10 см.

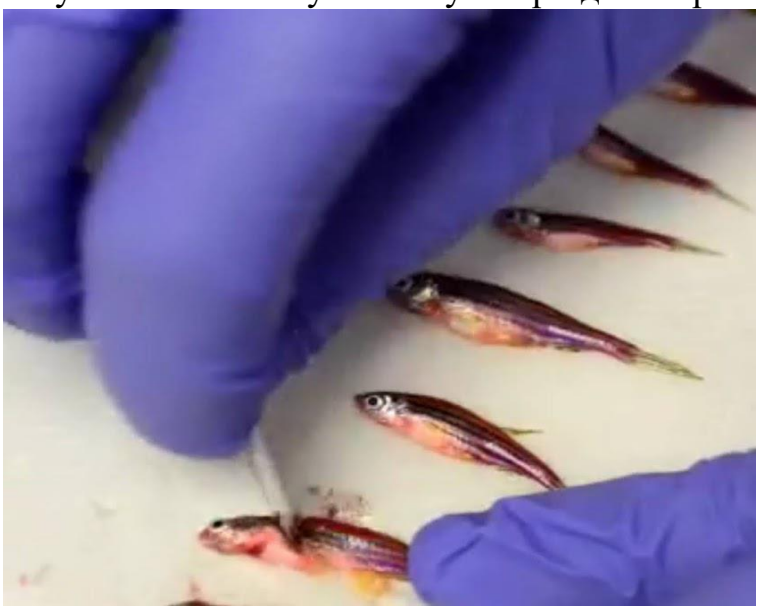

Рисунок 5. Забор тканей.

Добавили 500 мкл буфера для суспензии (предварительно охлажденный 0,9% фосфатный буферный раствор с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки к рассеченной ткани. В этот объем можно поместить до 10 рыб-доноров данио.

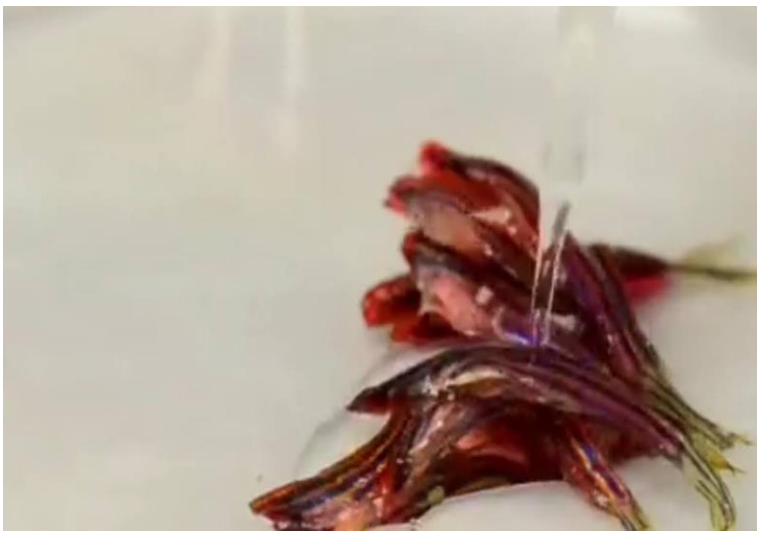

Рисунок 6. Подготовка к измельчению

Измельчили ткань лезвием пока клетки не станут однородной суспензией. Вся мускулатура спины гомогенизирована, включая кожу, кости и плавники. Добавили 2 мл суспензионного буфера. С помощью пипетки на 5 мл растерли клеточную суспензию ≥20 раз для диссоциации клеток.

Рисунок 7. Измельчение тканей.

Отфильтровали суспензию клеток через сетчатый фильтр с размером ячеек 40 мкм в коническую трубку объемом 50 мл, помещенную на лед.

Рисунок 8. Клеточная суспензия.

Вымыли чашку Петри дополнительными 2,5 мл буфера для суспензии, чтобы собрать оставшуюся ткань, и профильтровали через тот же фильтр и коническую пробирку до конечного объема 5 мл (для каждого изолята можно использовать 10 рыб-доноров).

ПРИМЕЧАНИЕ. Кожа, кости и плавники будут исключены после фильтрации.

Объединили одинаковые суспензии в одну коническую трубку.

Рисунок 9. Клеточная суспензия в «ледяном» контейнере.

ПРИМЕЧАНИЕ. Клетки следует постоянно держать на льду. Общая жизнеспособность клеток может быть повторно оценена перед трансплантацией с использованием красителя трипанового синего и гемоцитометра.

3.2. Внутримышечная трансплантация клеток скелетных мышц взрослому *дикому* данио.

Анестезировали 2-4-месячных рыб- реципиентов *дикого типа* (в качестве контроля), добавляя отдельные капли трикаинметансульфоната в чашку Петри, содержащую рыбу в системной воде, до тех пор, пока движение жаберной крышки не замедлится.

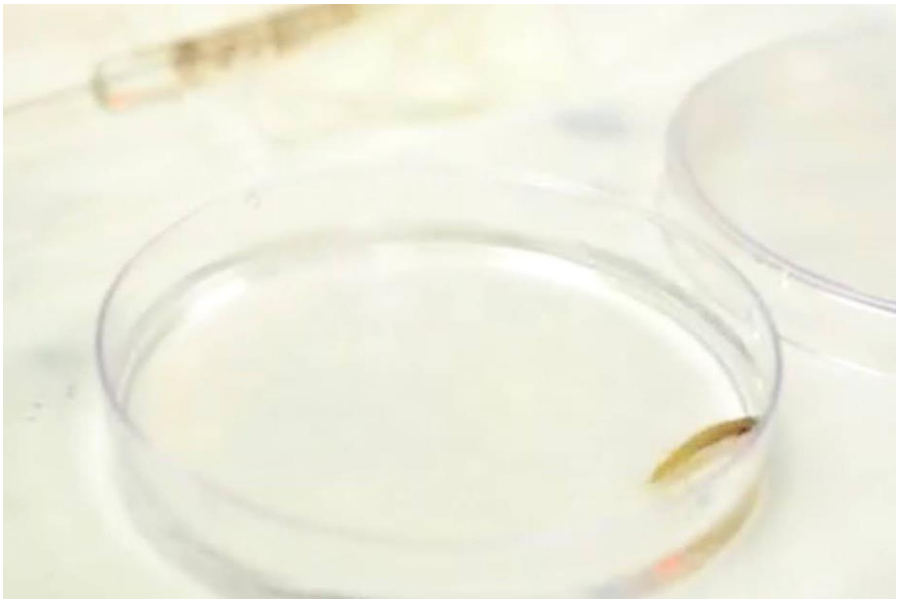

Рисунок 10. Реципиент (дикий данио).

ПРИМЕЧАНИЕ: Доза анестезии трикаином будет зависеть от возраста и размера рерио-рерио.

Поместили под наркозом реципиента данио на влажное бумажное полотенце левой стороной вверх.

Рисунок 11. Данио под действием анестезии.

Вставили иглу шприца в латеро-дорсальную мускулатуру. Убедились, что инъекции выполняются под углом 45 °. Ввели 3 МКл суспензии клеток на рыбу, всего 1 x 10^{6} клеток на реципиент.

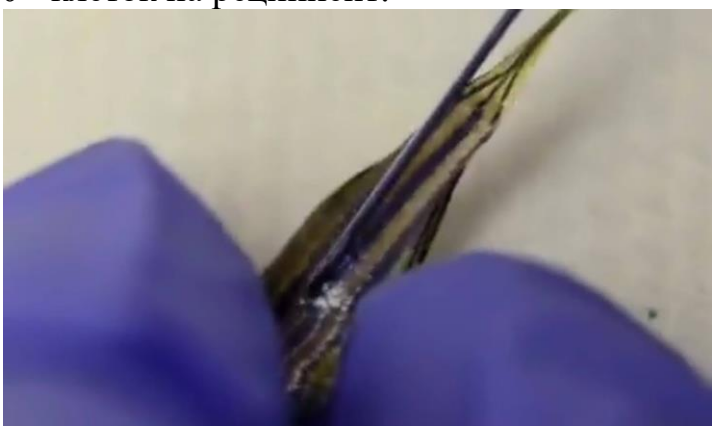

Рисунок 12. Инъекция анестезии.

Осторожно перенесли рыбок данио в чистый резервуар с помощью пластиковой ложки для восстановления.

Рисунок 13. Реанимация данио в отдельном аквариуме.

3.3. Наблюдение за трансплантатном «In vivo»

Оценили реципиента данио для скорости приживления через 10, 20, 30 дней после трансплантации путем визуализации анестезированных рыб в ярком поле и эпифлуоресцентной микроскопии.

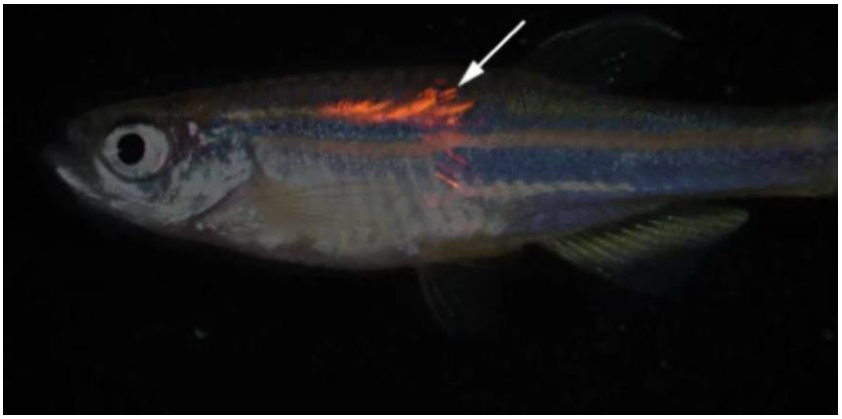

Рисунок 14. Флуоресценция трансплантатов.

Наблюдали за рыбками данио через 10–30 дней после инъекции на предмет появления внешне видимых флуоресцирующих α- *актин-RFP клеток.*

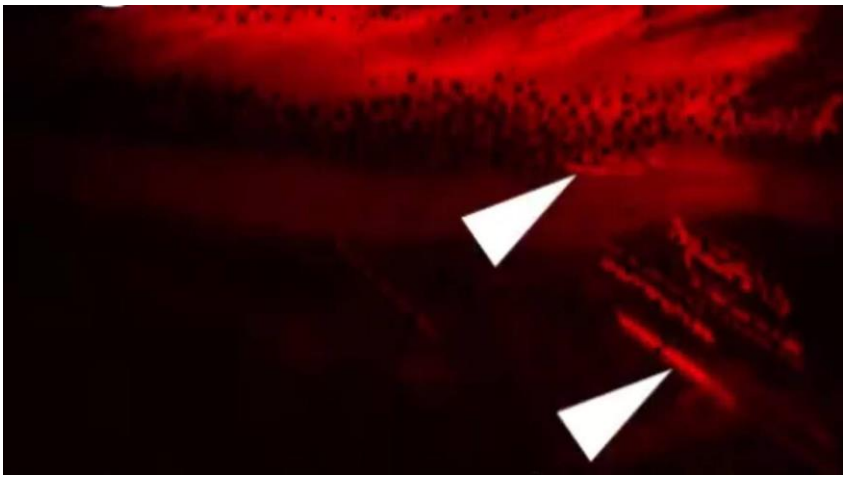

Рисунок 15. Флуоресценция трансплантатов при 80 кратном увеличении.

4.Обсуждение результатов эксперимента

Эффективное и надежное приживление было достигнуто с помощью очень простого метода подготовки клеток с последующей инъекцией клеток в дорсальную мускулатуру рыб. В целом процедуры внутримышечной инъекции были очень надежными, с некоторой сопутствующей смертностью сразу после процедуры трансплантации, в диапазоне от 10% до 35% в зависимости от эксперимента. Дополнительная оптимизация, вероятно, будет сосредоточена на использовании игл меньшего диаметра для инъекций и разработке стационарного инъекционного аппарата с использованием микроскопа и микроманипулятора, что упростит имплантацию клеток.

В нашем подходе также использовались несортированные мышечные клетки животных-доноров, и они содержали только около 30% мышечных клеток-предшественников. Использование трансгенных репортерных линий, которые маркируют стволовые клетки, вероятно, обеспечат обогащенные клеточные суспензии, которые приведут к увеличению приживления клеток рыб-реципиентов. Клетки скелетных мышц также можно было обогащать и культивировать перед трансплантацией. Примечательно, что наши результаты также показывают, что этапы создания ниши и дифференциации донорской мышечной ткани происходят до 10 дней после трансплантации, что делает эту модель надежной и быстрой экспериментальной платформой для оценки приживления и регенерации мышц. Вероятно, что повреждение иглой, полученное во время процедуры трансплантации, потенцирует приживление трансплантата, стимулируя выработку регенеративной среды внутри животного-реципиента.

Наша работа показала, что подходы к трансплантации клеток предоставляют новые экспериментальные модели для оценки чувствительности к лекарствам *in vivo*. Заглядывая в будущее, мы предполагаем, что эти биомаркеры будут полезны для оценки важных функциональных свойств рака *in vivo,* включая оценку внутриопухолевой гетерогенности, инвазии, метастазирования, ангиогенеза и устойчивости к терапии.

Вывод

1. Нами создана клеточная суспензия из трансгенных Glofish.
2. Используемый прием инъекционной трансплантации клеток, позволяет быстро оценить функцию стволовых клеток, регенерацию после травмы и рак. С помощью данного метода флуоресцентно меченые препараты мышечных клеток взрослых трансгенных рыбок данио α-actin-RFP надежно приживаются в диких Данио-рерио после инъекции в спинную мускулатуру. Кроме того, метод демонстрирует приживление и расширение первичного GFP трансгенной после инъекции в данио. Считаем нашу гипотезу полностью доказанной.
3. Мы пронаблюдали приживление флуоресцентно-трансгенных клеток где флуоресценция ограничивается клетками в зависимости от статуса дифференцировки. Полезность этих методов распространяется на приживление широкого спектра нормальных и злокачественных донорских клеток, которые могут быть имплантированы в спинную мускулатуру или брюшину взрослых рыбок данио.

Список литературы

1. Балиев А. Генетика спасет от голода. Но продлит ли она жизнь? // Молодая гвардия, 2001, №4, с.48–50.

2. Красовский О.А. Генетически модифицированные организмы: возможности и риски // Человек, 2014, № 5, с. 158–164.

3. Поморцев А. Мутации и мутанты // Факел, 2003, № 1, с. 12-15.

4. Рогачев В. Генетическая революция, первые шаги. // Эхо планеты, 2010, № 28, с. 6–9.

5. Свердлов Е. Что может генная инженерия. // Здоровье, 2012, № 1, с.51–54.

6. Вельков В.В., Опасны ли опыты с рекомбинантными ДНК. Природа, 1982, N 4, с.18-26.

7. Зеленин А.В., Генная терапия: этические аспекты и проблемы генетической безопасности. Генетика, 1999, т.35, N 12, с.1605-1612.

8. Пешков М.Н., Шарова Е.И., Клабуков И.Д. Использование постгеномных технологий для диагностики онкологических заболеваний на примере рака предстательной железы // Российский онкологический журнал. — 2015. — Т. 20, № 2. — С. 29—32. — ISSN 1028-9984.

9. Рубанович А. В., Сальникова Л. Е. Классификация биомаркеров: маркеры-диагносты и маркеры-классификаторы // Современные проблемы науки и образования — 2012. — № 6. (приложение «Биологические науки»). — С. 24

10. Биомаркеры — индикаторы состояния здоровья // Сайт Medinteres.ru, 2 Марта, 2014, https://medinteres.ru/interesnyie-faktyi/biomarkeryi.html 14.

Фотоальбом