

УДК: 57.043;578.71; 13:57.013:57.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР НИРКИ ТЕЛЯТИ ТА НИРКИ СВИНІ ЗА ДОВГОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ В УМОВАХ КРІОБАНКУ НАЦІОНАЛЬНОЇ КОЛЕКЦІЇ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР ННЦ «ІЕКВМ»

Стегній М. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

У наукових дослідженнях вивчали збереженість за методом фарбування трипановим синім, морфологію, мітотичний цикл, динаміку формування моношару перещеплюваною культурою клітин нирки теляти (РТ) і нирки свині (РК-15) за довготривалого зберігання в умовах кріобанку національної колекції клітинних культур ННЦ «ІЕКВМ». Встановлено, що збереженість клітинних культур РТ після розморожування складала в середньому 72,4 та 86 %, відповідно, у той час як збереженість (РК-15) після 15 років зберігання у рідкому азоті була майже у три рази нижче за РТ, у середньому – 24 %. Морфологія клітин РТ і РК-15 після довготривалого, упродовж 29 та 15 років збереження відповідно в умовах рідкого азоту починаючи з четвертого пасажу культивування співпадала з паспортними даними і складалася із середніх за розмірами клітин з округлими ядрами, що мають від одного до декількох ядерць різноманітної форми. Після довготривалого зберігання в умовах кріобанку спостерігали значне зниження патологічних форм мітозів, що свідчить про високу стабільність розморожених клітин РТ та РК-15.

Ключові слова: культури клітин нирки теляти, нирки свині, довготривале зберігання, кріобанк, цитогенетичні показники, мітотична активність

Методи культур клітин і тканин на цей час широко використовують у різних галузях ветеринарної вірусології, мікробіології, імунології, цитології та генетики. На сьогодні в біотехнології, вірусології, гуманній та ветеринарній медицині однією з головних проблем є консервування біологічних об'єктів (клітинних культур, вірусів, бактерій, діагностиків, вакцин та інших) без можливості втрати їх властивостей у процесі тривалого зберігання [1;2;3].

Перещеплювані лінії клітин мають високу генетичну варіабельність, яка характеризується різною кількістю та функціональним станом окремих генів, хромосом та їх наборів у клітинах, однак дослідникам треба максимально мінімізувати цей показник для отримання однорідної популяції клітин. Культивовані клітини мають високу мінливість і поступово втрачають свої початкові властивості. Втрата вихідних властивостей і висока ступінь мінливості є наслідком двох основних причин.

Перша причина полягає в тому, що клітини, переведені в культуру, потрапляють в умови, які значно відрізняються від їх існування у складі багатоклітинного організму. Зокрема, вони виходять з-під контролю з боку інших клітин організму. Культивовані клітини тварин не є спільнотою незалежних одиниць.

На цей час одним з найбільш надійних методів, що забезпечують довгострокове зберігання біологічних об'єктів, є кріоконсервування та зберігання їх у рідкому азоті. Успіх кріоконсервування залежить від цілого ряду факторів: виду біологічного об'єкту, концентрації біологічного матеріалу в суспензії, режимів кріоконсервування, складу середовища консервування, типу й концентрації кріопротектора та ін. [1;4]. Дані про успішне тривале зберігання клітин, що перевиваються були показані на культурах Нела, Нер і ВНК упродовж 3–8 місяців і до 1 року [2].

У ННЦ «ІЕКВМ» зібрана Колекція клітинних культур, в якій на даний час нараховується більше 35 перещеплених ліній клітин різних видів тварин (ВРХ, коня, свиней, овець, сайгака, мавп, собак, кішок, кроликів, курей, щурів і миші).

Зміни генетичної варіабельності клітинних ліній під дією різних факторів кріоконсервування та довготривалого зберігання найбільш доцільно досліджувати з використанням цитогенетичних методів. На цей час провідну позицію в Україні з вирішення даної проблеми займає ННЦ «ІЕКВМ», де зібрано єдину в Україні Колекцію клітинних культур для ветеринарної медицини та біотехнології, якій надано статус національного надбання.

На підставі вищевикладеного **метою роботи** було вивчення біологічних властивостей клітинних культур за довготривалого зберігання в умовах кріобанку національної колекції клітинних культур ННЦ «ІЕКВМ».

Дослідження були проведені на базі лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ».

Матеріали та методи. Вивчали збереженість за методом фарбування трипановим синім, морфологію, мітотичний цикл, динаміку формування моношару перещеплюваною культурою клітин нирки теляти (РТ) і нирки свині (РК-15) за довготривалого зберігання в умовах кріобанку національної колекції клітинних культур ННЦ «ІЕКВМ».

Розморожування клітин культур нирки теляти (РТ) і нирки свині (РК-15) здійснювали за допомогою водяної бані за температури 37–38 °С, після чого вони були піддані центрифугуванню за 800 об./хв. упродовж 10 хвилин для видалення кріозахисного середовища. Ресуспендування клітин здійснювали у ростовому середовищі, яке включало суміш поживних середовищ Ігла - DMEM та 199 (1:1) з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) до концентрації 130–150 тис. кл./см³ [5].

Потім було підраховано загальну концентрацію клітин в усіх квадратах камери Горяєва при малому збільшенні та концентрацію збережених клітин, за виключенням пофарбованих 0,2 % трипанової сині. Для чого до 1 см³ клітинної суспензії додавали у рівний об'єм 0,2 % розчину трипанової сині, старанно перемішували і заправляли камеру Горяєва. Кількість клітин в 1 см³ суспензії визначали за формулою (1.1):

$$X=A \times B \times 1000 / 0,9 \quad (1.1)$$

де X – кількість клітин у 1 см³ досліджуваної суспензії;
A – кількість підрахованих живих клітин у камері Горяєва;
B – коефіцієнт розведення (наприклад, 20);
1000 – кількість кубічних міліметрів в 1 см³;
0,9 – об'єм рахункової камери Горяєва у кубічних міліметрах.

Далі культуру ресуспендували у ростовому живильному середовищі з розрахунку, щоб посівна концентрація клітин становила 1×10⁵–1,2×10⁵ клітин/см³ і висівали у культуральні посудини. Ростове живильне середовище складалося з рівних об'ємів середовищ Ігла та 199 з 10 % сироватки крові ВРХ.

Крім того були вивчені адгезивні властивості клітин після деконсервування методом підрахунку клітин, які розморожували, а також клітин, які не прикріпились у культуральному посуді протягом доби після посіву. Були вивчені морфофункціональні властивості перещеплюваних клітин, що зберігалися у кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» у рідкому азоті з 1987 та 2001 років. Після чого для вивчення мітотичного режиму культури клітин вирощували на накривних скельцях у пеніцилінових флаконах за температури 37 °С впродовж чотирьох діб. Вирощений моношар клітин було зафіксовано у спирт-оцтовому розчині упродовж 10 хвилин, проведено через спирти з підвищеною концентрацією, промито дистильованою водою, пофарбовано барвником Карачі впродовж 10 хв. Після фарбування препарати було промито, зневоднено спиртом з підвищеною концентрацією, наприкінці – спирт-кислотом з підвищеною концентрацією, а потім – чистим кислотом на протязі 3 хв. Після висушування на повітрі препарати клітин були покриті канадським бальзамом чи полістиролом, з наступним вивченням за допомогою імерсійного світлового мікроскопу («Методичні рекомендації щодо цитогенетичного контролю якості культур клітин тваринного походження», Х., 2010).

У процесі росту клітин визначали зміни мітотичного режиму (мітотична активність, процент патологічних мітозів та ін.), цитогенетичних показників та морфологічного стану клітин. Мітотичну активність було визначено за числом клітин, які діляться, віднесеному до загальної кількості клітин із розрахунку на 1000 облікованих, і виражено у проміле (‰).

Патологічні мітози було враховано одночасно з проведенням аналізу мітотичної активності. Процентну кількість патологічних мітозів було визначено за відношенням виявленої кількості мітозів, а окремих форм патології мітозів – за відношенням до загальної кількості патологічних мітозів, які приймали за 100 %. Особлива увага приділялась підвищенню патологій мітозу, які за загальноприйнятою класифікацією характеризують ушкодження хромосом («мікроядра» та ін.) [1;6].

Перевірка на контамінацію перещеплюваних культур клітин грибовою та бактеріальною мікрофлорою здійснювалась згідно з ДСТУ 4483:2005 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибною контамінації». З цією метою були відібрані зразки суспензії клітин, що пересівали, і по 0,2 см³ досліджуваної проби вносили у пробірки з тіогліколевим середовищем та Сабуро. Посіви на баксередовищах витримували в термостаті за температури 37 °С, а на середовищі Сабуро – за кімнатної (21–22) °С протягом 7 і 14 діб відповідно. Посіви щоденно візуально контролювали на ріст бактеріальної чи грибової мікрофлори. Відсутність проростів на бактеріальних середовищах свідчить про можливість подальшого використання цих культур клітин для напрацювання біомаси, необхідної для консервування. Після виключення контамінації передбачалося накопичення біомаси клітин і закладки для подальшого зберігання в рідкому азоті.

Результати досліджень. Термін зберігання перещеплюваних клітинних культур РТ в умовах кріобанку Національної Колекції клітинних культур ННЦ «ІЕКВМ» складав 29 років та 28 років 7 місяців, а (РК-15) – 15 років відповідно. Збереженість клітинних культур РТ після розморожування за методом трипанового синього складала у середньому 72,4 та 86 % (Таблиця 1), а (РК-15) була майже у три рази нижче за РТ, у середньому – 24 % (Таблиця 2) відповідно.

Поступове зростання кількості збережених клітин (РТ) спостерігали на третьому пасажі культивування після розморожування – до 92 %, на сьомому – до 95 %, на десятому – до 97 %. Різке зростання кількості збережених клітин (РК-15) спостерігали з 24 % після розморожування до 82 % на другому та до 94 % на третьому пасажах культивування.

З четвертого по десятий пасажі збереженість клітин різко не коливалася і для лінії клітин РТ складала (95–97) %, а для РК-15 – від 93 до 95 %.

Формування повного моношару клітин РТ після довготривалого зберігання у рідкому азоті в середньому виконувалося впродовж чотирьох діб, а (РК-15) на нульовому пасажі після розморожування – упродовж шести діб, надалі – упродовж п'яти.

Тип росту обох ліній спостерігали як епітеліоподібний, формування моношару починалося з острівкового росту. Для клітин РК-15 на нульовому пасажі після острівкового росту у перші три доби в наступному (з четвертої по шосту доби) спостерігали зливний ріст клітин. На перших пасажах культивування після довготривалого зберігання та розморожування в обох культурах клітин була підвищена зернистість.

Морфологія клітин РТ і РК-15 після довготривалого, упродовж 29 та 15 років збереження відповідно в умовах рідкого азоту кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» починаючи з четвертого пасажу культивування відповідала паспортним даним і складалася із середніх за розмірами клітин, з округлими ядрами, що мають від одного до декількох ядерець різноманітної форми (Рис. 1, 2).

Таблиця 1 – Збереженість клітинної культури РТ за методом фарбування трипановим синім після тривалого зберігання в умовах рідкого азоту

№ пасажу	Кріоконсервування від 29.01.1987	Кріоконсервування від 12.06.1987
після розморожування	72,4 %	86 %
на 2 пасажі	88,6 %	85,7 %
на 3 пасажі	91,5 %	92 %
на 4 пасажі	95 %	94,5 %
на 7 пасажі	95 %	95 %
на 10 пасажі	97 %	–
на 12 пасажі	–	97 %

Таблиця 2 – Збереженість клітинної культури (РК-15) за методом фарбування трипановим синім після тривалого (упродовж 15 років) зберігання в умовах кріобанку

№ пасажу	Кріоконсервування від 15.02.2001
після розморожування	24,035 %
на 2 пасажі	82 %
на 3 пасажі	94 %
на 4 пасажі	95 %
на 7 пасажі	94 %
на 10 пасажі	93 %

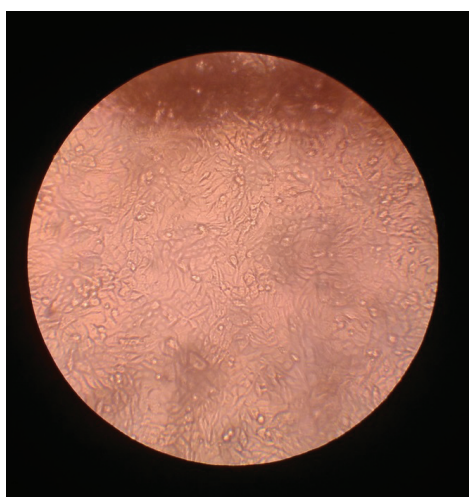


Рис. 1. Морфологія клітинної культури РТ на четвертому пасажі культивування після розморожування (збільшення ×80)

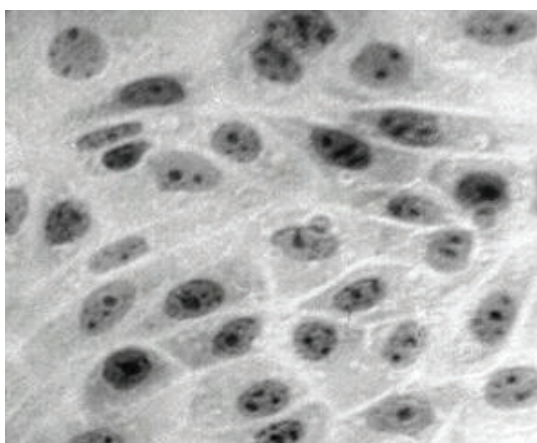


Рис. 2. Морфологія клітинної культури РК-15 на четвертому пасажі культивування після розморожування (збільшення ×90)

Рівень мітотичної активності (МА) клітинної культури РТ на 4-му пасажі після розморожування складав (25,25± 0,75) % у першу добу та (35,00± 2,00) % на четверту добу росту (Таблиця 3).

Таблиця 3 – Сумарна мітотична активність клітинної культури РТ на різних пасажах культивування після довготривалого зберігання та розморожування (M±m, n=4)

Пасаж	Час росту клітин (години)							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів
4 пасаж	25,25±0,75	3,90±1,51	35,25±0,48	3,50±0,70	37,00±1,63	2,13±0,71	35,00±2,00	0,85±0,85
7 пасаж	37,50±1,26 ***	3,50±1,68	37,00±1,08	1,33±0,77	20,50±1,44 ***	-	11,50±0,29 ***	-
10 пасаж	30,25±0,25 ***	4,10±0,83	26,50±1,85 **	-	19,25±2,5 ***	-	10,25±1,11 ***	-

Примітка: Порівняно з клітинами на четвертому пасажі культивування: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

На сьомому пасажі після розморожування МА перещеплюваних культур клітин РТ складала у першу добу (37,50±1,26) % та різко знижувалася (11,50±0,29) % на четверту добу росту.

Показники МА клітин РТ на 10-му пасажі після розморожування були достовірно нижчі, починаючи з другої доби росту, ніж у попередніх пасажах та складали (26,50±1,85) ‰, (10,25±1,11) ‰ відповідно.

Слід відмітити, що максимальний рівень МА розморожених клітин РТ складав (37±1,63) % на четвертому пасажі культивування після розморожування та (37,5±1,26) % на сьомому пасажі, але не досягав максимуму за паспортних даних (48 %) для клітин РТ. Найбільша кількість патологічних форм мітозів спостерігалася у першу добу культивування впродовж усіх пасажів та не перевищувала (4,10±0,83) %, у той час як за паспортних даних вона досягає 40 % мітозів.

Максимальну МА розморожених клітин РК-15 (43,0±0,41) ‰ спостерігали, як і за паспортних даних, на другу добу росту (Таблиця 4), на третьому, четвертому та десятому пасажах культивування після розморожування, але рівень МА дослідних клітин на третьому – четвертому пасажах (42,0±1,08) ‰ після розморожування значно перевищував паспортні (до 30 %) дані.

Показники МА клітин РК-15 на 10-му пасажі після розморожування, як і у клітин РТ, були достовірно нижчі, ніж у попередніх пасажах і складали відповідно (21,5±0,65) ‰ на другу добу, та (7,25±0,25) ‰ на четверту добу росту.

Таблиця 4 – Сумарна мітотична активність клітинної культури РК-15 на різних пасажах культивування після довготривалого зберігання та розморожування (M±m, n=4)

Пасаж	Час росту клітин (годин)							
	24		48		72		96	
	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів	Мітотична активність, ‰	% патологічних мітозів
3 пасаж	35,25±0,85	2,05±0,68	42,00±1,08	1,72±0,58	27,25±0,75	5,43±1,04	12,00±0,71	-
4 пасаж	35,00±0,41	2,15±0,72	43,00±0,41	1,70±0,57	34,25±0,75 ***	-	12,50±0,29	-
7 пасаж	22,50±0,65 ***	5,45±0,95	16,75±1,11 ***	-	15,75±0,85 ***	-	9,75±0,63	-
10 пасаж	19,75±0,63 ***	-	21,5±0,65 ***	-	12,25±0,63 ***	-	7,25±0,25 ***	-

Примітка: Порівняно з клітинами на третьому пасажі культивування: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Найбільша кількість патологічних форм мітозів як для клітин РТ, так і РК-15 спостерігалася в першу добу культивування і складала для РК-15 на третьому пасажі після розморожування ($5,45 \pm 0,95$) % на третю добу культивування. Кількість патологічних форм мітозів для РК-15 за паспортних даних досягає до 20 % від числа клітин, що діляться.

Висновки. За результатами вивчення біологічних властивостей клітинних культур за довготривалого (упродовж 29 років та 28 років 7 місяців зберігання в умовах кріобанку збереженість клітинних культур РТ після розморожування за методом трипанового синього складала в середньому 72,4 % та 86 %, відповідно, у той час як збереженість (РК-15) після 15 років зберігання у рідкому азоті була майже у три рази нижче за РТ, у середньому – 24 %.

Зростання кількості збережених клітин (РК-15) спостерігали з 24 % після розморожування до 82 % на другому, та до 94 % на третьому пасажах культивування, а зростання кількості збережених клітин РТ спостерігали на третьому пасажі культивування після розморожування – до 92 %, на сьомому – до 95 %, на десятому – до 97 %.

Морфологія клітин РТ і РК-15 після довготривалого, упродовж 29 та 15 років збереження відповідно в умовах рідкого азоту кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» починаючи з четвертого пасажу культивування співпадала з паспортними даними і складалася із середніх за розмірами клітин, з округлими ядрами, що мають від одного до декількох ядерців різноманітної форми.

Максимальний рівень МА розморожених клітин РТ спостерігали з четвертого по сьомий пасажі після довготривалого зберігання та розморожування ($37 \pm 1,63$) ‰, який не досягав максимуму за паспортних даних (48 ‰), у той час як рівень МА дослідних клітин РК-15 на третьому – четвертому пасажах після розморожування значно перевищував ($42,0 \pm 1,08$) ‰ паспортні (до 30 ‰) дані.

У досліджених культурах клітин після довготривалого зберігання в умовах рідкого азоту кріобанку ННЦ «ІЕКВМ» спостерігали значне зниження патологічних форм мітозів, що свідчить про високу стабільність розморожених клітин РТ та РК-15.

Список літератури

1. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) [Текст] / Под общ. ред. проф. Дьяконова Л. П. – М.: Издательство «Спутник+», 2009. – 656 с.
2. Крiоконсервирование клеточных суспензий [Текст] / Под общ. ред. проф. А.А. Цуцаевой – Киев.: Наукова думка 1983. – 240 с.
3. Дьяконов Л. П. Основные достижения и перспективы развития клеточной биотехнологии. Труды ВИЭВ, 1998, т. 71. С. 149-161.
4. Стегній, М. Ю. Крiоконсервування штаму перещеплюваних клітин нирки вівці FLK-SBBL, який продукує вірус лейкозу великої рогатої худоби [Текст] / М. Ю. Стегній, Б. Т. Стегній, А. М. Гольцев // Проблеми крiобіології. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 254.
5. Методические рекомендации по консервированию клеточных культур и тканей в условиях низкотемпературных банков [Текст] / В.С. Белоконов, П.Т. Берус, Б.Т. Стегний, Р.И. Кульбит. – 1990 – 19 с.
6. Мамаева С.Е. Цитогенетика клеток в культуре. В кн.: Биология клеток в культуре. Отв. Ред. А.С. Трошин., Л., «Наука», 1984, 280 с.

BIOLOGICAL PROPERTIES CALVE'S AND SWINE KIDNEY CELL CULTURES FOR LONG-TERM STORAGE UNDER CONDITIONS OF THE NATIONAL CRYOBANK OF CELL CULTURE COLLECTION OF NSC «IECVM»

Stegniy M. Yu.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

We studied the survival culture kidney cells calf (PT) and kidney pigs (PK-15) using the method of staining with trypan blue, morphology, mitotic cycle, dynamics of forming monolayer under long-term storage conditions of cryobank of National collection of cell cultures of NSC «IECVM». It was established that survival of PT cell cultures after thawing was on average 72.4 % and 86 %, respectively, whereas survival (PK-15) after 15 years of storage in liquid nitrogen was almost three times lower than PT, on average – 24 %. The morphology of cells PT and PK-15 after long-term (over 29 and 15 years of conservation under in terms of liquid nitrogen) from the fourth passage culture coincided with the passport data and consisted of medium-sized cells with round nuclei, having from one to several nucleoli various form. After long-term storage conditions cryobank significant reduction of pathological forms of mitosis, indicating a high stability of the thawed cells PT and PK-15 were observed.

Keywords: *culture of calf kidney cells, kidney, pork, long-term storage, cryobanks, cytogenetic indicators of mitotic activity*