

УДК 57.085.23:619:615.37

Стрельчяня И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Полоз С.В., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Минск, Республика Беларусь

К ВОПРОСУ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЯДК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Резюме

Показано, что криоконсервация клеток является перспективным методом в научных исследованиях. Важно соблюдение всех условий процесса размораживания культур клеток для их использования при изготовлении иммунобиологических препаратов. Установлено, что присутствие характерных признаков расплывания клеток на субстрат в течение первых трех суток после посева свидетельствует о завершении процесса пролиферации сохранившихся после криоконсервации клеток. Оптимальные результаты восстановления культуры клеток ЯДК в цикле замораживания-оттаивания были достигнуты при использовании ростовой питательной среды Игла: ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и концентрации клеток $2,2 \times 10^6$. При данных условиях и выбранном нами методе замораживания исследуемая культура клеток ЯДК полностью была восстановлена к 5-му дню культивирования. Испытуемая культура клеток в процессе размораживания по мере увеличения продолжительности культивирования не претерпевала генетических изменений, имела свойственную для данной линии фибробластоподобную морфологию и сохраняла свои биологические свойства.

Ключевые слова: культура клеток, гонады козы, сыворотка крупного рогатого скота, криоконсервация, питательная среда, криопротектор.

Summary

Cell cryopreservation has been shown to be a promising method in scientific research. It is important to comply with all conditions for the process of thawing cell cultures for their use in the manufacture of immunobiological preparations. It has been established that the presence of characteristic signs of cells spreading onto the substrate during the first three days after seeding indicates the completion of the process of proliferation of cells preserved after cryopreservation. Optimal results of restoring a nuclear cell culture in a freeze-thaw cycle were achieved using Eagle growth medium: DMEM with the addition of 10 % cattle blood serum and a cell concentration of $2,2 \times 10^6$. Under these conditions and the freezing method we chose, the studied culture of NDC cells was completely restored by the 5th day of cultivation. The tested cell culture, in the process of thawing as the duration of cultivation increased, did not undergo genetic changes, had a fibroblast-like morphology characteristic of this line, and retained its biological properties.

Keywords: cell culture, gonads of goats, bovine serum, cryoconservation, culture medium, cryoprotector.

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

Метод культур клеток является уникальным и вместе с тем широко применяется в настоящее время как в практических, так и в научных исследованиях. Широкое внедрение метода культур клеток в вирусологию для репродукции вирусов или при изготовлении иммунобиологических компонентов диагностических препаратов требует разработки способов длительного сохранения клеточных линий. Актуальной задачей биотехнологии клеточных культур является необходимость создания запасов полноценного экспериментального матери-

ала для научных и клинических исследований в области медицины и ветеринарии [1, 8].

Техника культивирования клеток и тканей постоянно меняется, а многие методические приемы систематически модернизируются, одновременно с этим совершенствуются методы контроля клеточных культур. Диплоидные и перевиваемые линии клеток в лабораторных условиях используются на протяжении длительного времени, однако поддержание их путем непрерывного пассирования представляет определенные трудности.

В настоящее время криоконсервация является способом, который дает возможность обеспечить длительное сохранение клеток животных, в то время как поддержание культур клеток их постоянным пассированием связано с опасностью потери ценных биологических свойств и контаминации посторонними агентами. Поэтому существенным моментом работы с культурой клеток является предупреждение потери клеточных линий путем их консервации [5, 7]. Одной из актуальных задач современной науки является разработка способов длительного консервирования биологических объектов путем их глубокого замораживания. На сохранность криоконсервируемых клеток влияет большое количество факторов, действию которых они подвергаются в процессе замораживания.

Для обеспечения максимальной сохранности клеточных культур разработано различное количество протоколов криоконсервирования, учитывающих индивидуальные особенности различных видов и типов клеток [3, 4]. Однако даже при оптимальных условиях криоконсервирования в сохранившихся клетках обнаруживаются повреждения, которые существенно снижают биологические свойства культур клеток.

Актуальным остается вопрос оптимизации условий криоконсервации и восстановления клеток животных и человека после оттаивания с максимальным процентом жизнеспособности [7]. Оптимальное замораживание клеток для сохранения максимальной жизнеспособности при восстановлении после размораживания зависит от минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда, а также предотвращения образования очагов высокой концентрации солей, возникающих при замораживании внутриклеточной воды. Это достигается: 1) путем медленного замораживания, так, чтобы позволить воде покинуть клетку, но не настолько медленно, чтобы спровоцировать рост ледяных кристаллов; 2) путем использования криопротекторов для уменьшения содержания воды; 3) путем хранения клеток при самой низкой температуре; 4) путем быстрого размораживания, чтобы максимально снизить рост кристаллов льда и появление градиента солей, образующегося в процессе таяния остаточного внутриклеточного льда [8].

Способность клеток к выживанию в цикле замораживания-оттаивания зависит не только от влияния защитных сред и температурных режимов при криовоздействиях, но и от подготовки клеток перед замораживанием, концентрации клеток перед замораживанием, а также условий внешней среды после замораживания [2, 6].

Целью нашей работы явилось изучение восстановления перевиваемой линии ЯДК (гонады козы) после замораживания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Испытуемая культура клеток сначала была нами криоконсервирована. Культура клеток ЯДК (гонады козы) замораживалась на поздней логарифмической (предконфлюентной) фазе роста, так как именно в этой фазе клетки наиболее жизнеспособны в концентрации $2,5 \times 10^6$. Заморозку проводили на питательной среде Игла: ДМЕМ с добавлением 50 % сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС). В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (10 %), который вводили медленно по каплям в течение 2 мин. Далее клеточную суспензию вносили в специальные стерильные криопробирки, которые затем помещали на 2 ч в холодильник при температуре 4 °С, после чего переносили на 2 ч в морозильную камеру при температуре минус 20 °С, а затем – на 2 ч в низкотемпературный холодильник с температурой минус 86 °С. После этого криопробирки переносили в сосуды Дьюара с жидким азотом с температурой минус 196 °С.

Для оптимального восстановления жизнеспособности клеток необходима высокая скорость их размораживания.

С целью разморозки замороженных образцов перевиваемой культуры клеток ЯДК (гонады козы), криоампулы извлекали и быстро помещали их в теплую водяную баню с температурой +37 °С, постоянно встряхивая 20–60 с, пока клеточная суспензия полностью не оттает. Затем погружали ампулы в 70%-ный этанол при комнатной температуре на 10 с. Далее вскрывали ампулу и переносили ее содержимое в культуральный флакон объемом 175 см³. Для выращивания использовали ростовую

питательную среду Игла: ДМЕМ с добавлением 20%-ной сыворотки КРС и антибиотиков (канамицина сульфата, стрептомицина сульфата и бензилпенициллина натриевой соли) по 100 Ед/мл. Смену среды проводили через 12 и 24 ч после размораживания. В течение следующих 3-4 дней смену среды делали по 20–30 % объема ростовой среды Игла: ДМЕМ, в течение следующих 3-4 дней – до 50–60 %. Свежую ростовую среду непосредственно перед работой прогревали до температуры +37 °С. Посевная концентрация клеток, а также условия культивирования в первые часы в значительной степени определяют оптимальные параметры для процессов пролиферации и максимального накопления клеток.

Известно, что начальным этапом характеристики восстановления криоконсервированных культур является их адгезия к субстрату. Это необходимое условие, которое также отражает функциональное состояние клеток.

Начальным этапом наших исследований восстановления после криоконсервации перевиваемой линии ЯДК было определение начальной адгезии и жизнеспособности клеток.

После размораживания важным этапом явилось определение концентрации сохранившихся клеток, для чего использовали тест с трипановым синим. Живые клетки непроницаемы для данного красителя, мертвые же проницаемы и окрашиваются. Для оценки выхода жизнеспособных клеток используют тест на исключение красителя. Количество живых и мертвых клеток подсчитывают в камере Горяева.

Количество живых клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной определяют по формуле 1:

$$x = \frac{A \times 1000 \times 2}{0,9}, \quad (1)$$

где x – количество клеток;
 A – среднее арифметическое значение количества клеток трех проб;
 1000 – коэффициент пересчета, см³;
 2 – коэффициент разведения клеточной культуры красителем;
 0,9 – объем счетной камеры Горяева, мм³.

Индекс пролиферации клеток определяют по формуле 2:

$$ИП = \frac{x}{y}, \quad (2)$$

где $ИП$ – индекс пролиферации;

x – количество клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраца) после культивирования культуры клеток;

y – количество засеянных клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраца).

Сравнительное изучение клеток проводилось на одной стадии роста и одинаковой клеточной плотности, на одной и той же среде, и субстрате.

Контроль микробиологической стерильности клеточной суспензии на отсутствие бактерий, грибов проводили путем посева на селективные питательные среды МПА (мясопептонный агар), МПБ (мясопептонный бульон), тиогликолевая среда. Для этого в стерильных условиях пипеткой в пробирки вносили по 0,5 мл клеточной суспензии и инкубировали при температуре +37 °С для выявления грамположительных и грамотрицательных бактерий. Учет результатов контроля на стерильность проводили путем микроскопических исследований всех посевов через 14 суток после внесения клеточного материала для контроля. Для выявления грибов использовали плотную питательную среду Сабуро. Вносили по 0,2 мл суспензии клеток в пробирки. Инкубировали при температуре 22 °С. Учет результатов контроля на наличие грибов проводили путем макро- и микроскопических исследований через 24 ч. Скорость и качество формирования монослоя определяли на 1-, 2-, 3-, 4-, 5-е сутки визуально и с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив ×10).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первостепенно оценивали физиологическое состояние и рост клеток, их морфофункциональные свойства. На 1-е сутки лаг-фазы, которая длится от 2 до 24 ч, наблюдали прикрепление клеток к субстрату и их начальный рост. При просмотре культуральных флаконов под микроскопом установлено, что конфлюэнтность монослоя составляла 20 % (рисунок 1).

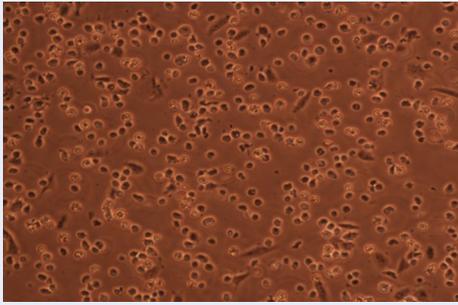


Рисунок 1. – Клеточный монослой перевиваемой культура клеток ЯДК через 12–24 ч культивирования (объектив ×10)

На 2-е сутки степень расплывания монослоя удвоилась, так как это период самого быстрого роста и размножения, когда число клеток возросло во времени по экспоненте. При просмотре культуральных флаконов под микроскопом установлено, что клеточный монослой составил 40 % конфлюэнтности (рисунок 2).

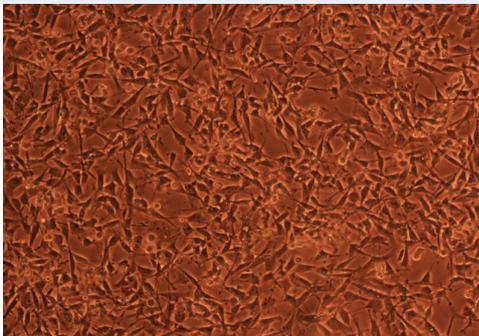


Рисунок 2. – Перевиваемая культура клеток ЯДК на 2-е сутки (объектив ×10)

На 3-и сутки (период стационарной фазы), через 48–72 ч культивирования, клеточный монослой составил 80 % конфлюэнтности (рисунок 3).



Рисунок 3. – Перевиваемая культура клеток ЯДК на 3-и сутки (объектив ×10)

Нами установлено, что продолжительность пребывания культуры в стационарной фазе роста является самостоятельным фактором контроля скорости размножения клеток, действие которого проявляется независимо от плотности клеточной популяции.

При просмотре культуральных флаконов под микроскопом на 4-е и 5-е сутки наблюдали выравнивание клеточного монослоя (рисунки 4 и 5). При этом на 5-е сутки происходило повышение плотности клеточной популяции. Перевиваемая клеточная линия ЯДК имела типичную для данной линии фибробластоподобную морфологию, клетки приобрели выраженную веретенообразную, вытянутую форму с прозрачной цитоплазмой и сохраняли стабильность своих биологических свойств в течение всего срока культивирования.

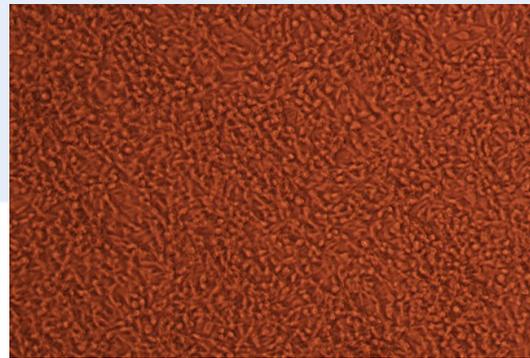


Рисунок 4. – Клеточный монослой перевиваемой культуры клеток ЯДК на 4-е сутки культивирования (объектив ×10)



Рисунок 5. – Клеточный монослой перевиваемой культуры клеток ЯДК на 5-е сутки культивирования (объектив ×10)

Результаты исследований показали, что на 5-е сутки скорость роста культуры клеток ЯДК (гонады козы) замедлилась и количество клеток в культуре достигло насыщения (конечная плотность клеток). Культивируемые клетки полностью покрыли поверхность культурального флакона, достигнув 100%-ной конfluence.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами установлено, что наличие характерных признаков распластывания клеток на субстрате в течение первых трех суток после посева свидетельствует о завершении процесса пролиферации сохранившихся после криоконсервации клеток. Оптимальные результаты восстановления культуры клеток ЯДК в цикле замораживания-оттаивания были достигнуты при использовании ростовой питательной среды Игла: ДМЕМ с добавлением 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота и кон-

центрации клеток $2,5 \times 10^6$. При данных условиях и выбранном нами методе замораживания исследуемая культура клеток ЯДК (гонады козы) полностью была восстановлена к 5-му дню культивирования. Испытуемая культура клеток в процессе размораживания по мере увеличения продолжительности культивирования соответствовала своим паспортным данным (видовая принадлежность донора), по истории происхождения, не претерпевала генетических изменений, имела свойственную для данной линии фибробластоподобную морфологию и сохранила свои биологические свойства.

Таким образом, криоконсервация клеток является перспективным в научных исследованиях методом. Важным является соблюдение всех условий процесса размораживания культур клеток для их использования при изготовлении иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Блажевич, О. В. *Культивирование клеток: курс лекций* / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с.
2. Горохова, Н. А. *Криоконсервация культивированных фибробластоподобных клеток шляхом повільного заморожування і вітрифікації* : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.19 / Н. А. Горохова. – ИПКиК НАНУ. – 2005. – 26 с.
3. *Криоконсервирование клеточных суспензий* : сб. науч. тр. ; под общ. ред. А. А. Цуцаевой. – К. : Наук. думка, 1983. – 240 с.
4. *Методы культивирования клеток* : сб. науч. тр. ; под ред. Г. П. Пинаева. – Л. : Наука, 1988. – 319 с.
5. Стегній, Б. Т. *Біологічні властивості і проблемі стабілізації культур клітин, які використовуються в біотехнології* : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.03 / Б. Т. Стегній. – ЕКВМУААН, 1995. – 40 с.
6. Фрешни, Р. Я. *Культура животных клеток: практическое руководство* / Р. Я. Фрешни ; пер. 5-го англ. изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с.
7. Фуллер, Б. *Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия* / Б. Фуллер, К. Грин, В. И. Грищенко // *Проблемы криобиологии*. – 2003. – № 2. – С. 62–83.
8. Spier, R. *Continuous cell lines as substrates for biologicals: report of a joint meeting of WHO, IABS (cell Culture Committee Subsection), and ESACT* / R. Spier // *Mol. Biother.* – 1988. – V. 1, № 2. – P. 114–115.

наша продукция

