

## ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

**Савинова Ирина Витальевна**

аспирант

Институт ветеринарной медицины НААН Украины

г. Киев, Украина

### **ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ АФРИКАНСКОЙ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ (XENOPUS LAEVIS)**

***Аннотация:** в данной работе приводятся данные относительно особенностей роста клеточной культуры фибробластов лягушки шпорцевой при разных температурных режимах культивирования. Автором представлена оценка влияния различных температур инкубации на интенсивность пролиферации клеток, морфологические особенности культуры и скорость образования конфлюэнтного монослоя. Сделаны выводы относительно выбора оптимальных температурных режимов выращивания данной клеточной линии *Xenopus laevis*.*

***Ключевые слова:** культура клеток, амфибии, лягушка шпорцевая.*

***Актуальность вопроса.** Температура инкубации клеточных культур холоднокровных животных отличается от температуры, используемой для выращивания клеток млекопитающих и птиц. У пойкилотермных животных температура тела зависит от температуры окружающей среды. Следовательно, их клетки функционируют в достаточно широком диапазоне температур, в отличие от клеток большинства теплокровных животных, у которых почти все обменные процессы останавливаются уже при температуре 10–15°C – митозы в клетках холоднокровных могут происходить даже при 9°C. Считается, что в основе данного феномена лежат молекулярные механизмы мембранной адаптации, которые связаны с особенностями липидного состава мембран и работой ионтранспортиру-*

ющих систем [2, с. 3]. Температурные лимиты и оптимум для роста таких клеточных линий, как правило, определяются температурными условиями окружающей среды, в которых обитают животные-доноры клеток. Одним из основных правил выбора температуры инкубации первичных клеточных линий, полученных от пойкилотермных позвоночных, считается следующий принцип: для первичных клеток необходимо поддерживать температуру немного выше, чем та, при которой данный вид животных обитает в природе. Для дальнейшего поддержания клеток в культуре эта температура может немного отличаться [10, с. 306].

Клеточные линии холоднокровных животных – рыб и лягушек – использовали еще в начале становления клеточной культуры, как исследовательской модели, благодаря тому, что их выращивание было возможно при комнатной температуре 18–25°C [10, с. 288]. Именно клетки лягушки были первой полученной культурой клеток. Harrison в 1907 культивировал нервные клетки зародыша лягушки в сгустке плазмы, и это достижение привело к революции в мировой науке и началу применения метода культуры клеток для широкого спектра исследований во всех областях биологических наук.

В крупнейших мировых клеточных банках, таких как ECACC, ATCC, DSMZ, а также нескольких коллекциях клеточных культур институтов международного значения, которые насчитывают десятки тысяч разнообразных клеточных линий, и на сегодняшний день содержится очень ограниченное количество клеточных культур амфибий. Большинство из них было получено в середине прошлого столетия и сохраняются до сих пор [4; 6; 8; 9; 11]. Однако, несмотря на то, что такие культуры уже существуют, они не всегда могут удовлетворить возрастающие потребности исследователей. Государственные коллекции и клеточные банки не содержат не только ни одной отечественной линии амфибий, а даже штаммов из международных коллекций. Кроме того, для наших лабораторий не всегда возможно и экономически оправданно приобретение зарубежных культур клеток. Более того, их приобретение (как технический его аспект, так и юридический) достаточно проблематично, а работа с ними связана с определен-

ными сложностями при культивировании и приобретении специфических и дорогих питательных сред. Таким образом, расширение исследовательского направления по получению культур клеток амфибий и создание в перспективе отечественных перевиваемых культур – актуальное направление исследований.

### *Цель работы*

Целью данной работы было определение оптимального температурного режима инкубации полученных нами субкультур фибробластов лягушки шпорцевой (*Xenopus laevis*).

### *Материалы и методы*

*Животные.* В качестве доноров ткани для получения первичной культуры клеток использовали сеголетков лягушки шпорцевой (*Xenopus laevis*), приобретенных в местной зооторговой компании. Первичные культуры были получены в соответствии с методическими рекомендациями по получению первично-трипсинизированных культур клеток холоднокровных животных [3, с. 51].

*Питательные среды, сыворотки и растворы.* Для проведения исследований была использована питательная среда DMEM (SH30243.01; HyClone), скорректированная по осмотическому давлению до необходимого для амфибий, путем добавления стерильной дистиллированной воды 20% по объему [7, с. 469]. В качестве антибактериальных и фунгицидных агентов были добавлены раствор гентамицина сульфата 4% («ПАТ «Артериум»); раствор пенициллин-стрептомицин для культур клеток (10тыс. ед/мл пенициллина и 10 мг/мл стрептомицина сульфата) (P0781; Sigma Chemical Co., EU); флуконазол 0,2% («Юриия-Фарм») в количестве 50тыс. ед пенициллина, 50мг стрептомицина сульфата, 2,0мг гентамицина сульфата, 4,0 мг флуконазола/100мл среды. Дополнительным ростовым компонентом являлась фетальная сыворотка коровы (FBS) (S7524; Sigma Chemical Co., EU), добавленная в количестве 15% от конечного объема питательной среды. В качестве хелатных агентов и дезагрегирующих растворов применяли: раствор трипсина 0,25%, раствор версена 0,02%, без  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$  («Био Тест Лаборатория»), их рабочим соотношением являлась смесь трипсин-версен в пропорции 1:3.

В качестве *субстрата для выращивания клеточных* линий были использованы полистероловые флаконы для культур клеток с ростовой площадью 25 см<sup>2</sup> (TPP).

Морфологическая оценка. Для изучения морфологических особенностей клеток проводили регулярную микроскопию нативных препаратов с использованием инвертированного микроскопа Leica DM IL LED при 10-х, 20-х та 40-х кратных увеличениях с применением фазового контраста.

*Определение оптимальных параметров культивирования.* Для определения оптимальных температурных условий выращивания субкультур фибробластов шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) были оценены показатели роста клеточной культуры в диапазоне температур от 18°C до 33°C. Критериями оценки служили такие показатели как: пролиферативная активность клеток (оценивали по индексу пролиферации (IP) [1, с. 615]) и время образования монослоя. Для определения индекса пролиферации, в данном случае проводили подсчет клеток в культуральных флаконах. Подсчитывали живые прикрепленные и распластанные клетки в 10 полях зрения при стократном увеличении. Подсчет индекса пролиферации (IP) осуществляли по формуле:

$$IP = a/b,$$

где а – окончательное количество клеток/10 полей зрения,

б – посевное количество клеток/10 полей зрения.

#### *Результаты исследований*

Все работы с культурами клеток проводили, используя стерильные питательные среды и растворы со строгим соблюдением требований стерильной работы с культурой клеток [5, с. 11]. Пассажи первичных культур проводили по достижении ими монослоя в разные сроки от момента посева (от 15 дней до 2 месяцев). Для проведения исследования использовали стабильно растущие субкультуры на уровне 2–4 пассажей.

Пролиферативную активность клеток при разных температурах инкубации оценивали, высевая суспензию клеток с посевной концентрацией 5х10<sup>5</sup> кл/см<sup>3</sup> в культуральные флаконы и выращивали при разных температурных режимах

от 18°C до 33°C. Культивирование при 18°C не приводило к клеточной адгезии и пролиферации, большинство клеток оставалось не прикрепленными и находилось в суспензии. Единичные прикрепившиеся клетки не проявляли признаков пролиферации даже через две недели после посева и через несколько недель погибали. При температуре 22°C количество прикрепившихся клеток было больше, чем при 18°C, однако их пролиферативная активность оставалась слабой. Наблюдались деления некоторых прикрепившихся клеток, но островков сливного роста не образовывалось, и через 7–10 дней были отмечены вакуолизация цитоплазмы, фрагментация ядра и гибель клеток в течение нескольких последующих дней. Температура инкубации 26°C приводила к достаточно активной клеточной пролиферации и формированию рыхлого монослоя, состоящего из сильно вытянутых фибробластоподобных клеток, на 18 день после посева. При 30°C количество прикрепившихся и пролиферирующих клеток было приблизительно таким же, как и при 26°C, однако, монослой формировался на четыре дня раньше. Морфологически клетки характеризовались более четкими контурами и менее вытянутой формой. Инкубирование при температуре 33°C приводило к наибольшему количеству прикрепленных клеток и значительной их пролиферативной активности в течение первых трех суток после посева, однако, на четвёртые сутки начали появляться признаки дегенерации монослоя: вакуолизация цитоплазмы, округление и отделение клеток от субстрата. К концу шестых суток практически все клетки находились в суспензии (таблица 1).

Таблица 1

Влияние температуры инкубации на показатели роста  
субкультур клеток *Xenopus laevis*

| Показатели                        | Температура инкубации, °C |           |           |           |           |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                   | 18                        | 22        | 26        | 30        | 33        |
| Период формирования монослоя, сут | -                         | -         | 18        | 14        | -         |
| Индекс пролиферации               | 0,2 ± 0,2                 | 0,3 ± 0,2 | 3,6 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 | 0,5 ± 0,2 |

### *Выводы*

Исследование влияния различных температур на пролиферативную активность субкультур клеток *Xenopus laevis* позволило сделать вывод, что в диапазоне температур 26–29°C с повышением температуры наблюдалось увеличение процента прикрепленных клеток и темпов роста клеточной культуры в течении всего срока культивирования. При температуре 18°C не происходила адгезия и пролиферация, а при увеличении температуры до 33°C среди уже прикрепленных клеток на четвертые сутки инкубации наблюдались признаки апоптоза (округление клеток и потеря ими контакта с соседними клетками, отделение от субстрата, вакуолизация цитоплазмы и т. д.). Таким образом, температурный диапазон 26–29°C можно считать оптимальным для выращивания фибробласто-подобной культуры (субкультуры) клеток шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) в данных условиях эксперимента.

### *Список литературы*

1. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре. – М.: Спутник, 2009. – 615 с.
2. Жегунов В.Ф. Роль липидов и ионтранспортирующих систем биомембран в процессах адаптации к низким температурам // Криобиология и криомедицина. – 1983. – Вып. 13. – С. 3–15.
3. Клестова З.С. Методичні рекомендації з отримання первинно-трипсинізованих культур клітин холонокровних тварин. – К., 2014. – 51 с.
4. Anizet M. Characterization of a new cell line, XL2, obtained from *Xenopus laevis* and determination of optimal culture conditions // In Vitro. –1981. –Vol. 17. – P. 267–274.
5. Cell culture basic. Handbook. Gibco / Thermo Fisher Scientific Inc., 2014.
6. Fukui A. A new cell line (XTY) from a tumor of *Xenopus laevis* // Experientia. – 1992. – Vol. 48. – P. 87–91.
7. Jacoby W. Cell culture // Methods in enzymology. – 1979. – Vol. 58. – P. 466–474.

8. Nishikawa A. Isolation, characterization, and in vitro culture of larval and adult epidermal cells of the frog *Xenopus laevis* // *In Vitro Cell Dev Biol.* – 1990. – Vol. 26. – P. 1128–1134.
9. Pudney M. Establishment of a cell line (XTC-2) from the *Xenopus laevis* // *Experientia.* – 1973. – Vol. 29. – P. 466–467.
10. Rothblat G. *Nutrition and Metabolism of Cells in Culture.* – London.: Academic Press, 1972.
11. Schlage W. Established *Xenopus* heart endothelium (XTH) cells exhibiting selected properties of primary cells // *Europ J Cell Biol.* – 1981. – Vol. 24. – P. 21–24.