

УДК 636.09:578:5981.1

САВІНОВА І.В., аспірантка

КЛЕСТОВА З.С., д-р вет. наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології

і штамів мікроорганізмів Державної ветеринарної

та фітосанітарної служби України

isavinova@ukr.net

## ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИННО-ТРИПСИНІЗОВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЖАБИ ШПОРКОВОЇ ГЛАДЕНЬКОЇ (*XENOPUS LAEVIS*)

Наведені дані щодо особливостей отримання первинних культур клітин безхвостих амфібій на моделі жаби шпоркової гладенької (*Xenopus laevis*). Містяться рекомендації щодо вибору оптимальних способів підготовки культуральних субстратів та поживних середовищ, які використовуються для культур клітин інших видів тварин, та їх адаптації для вирощування клітин амфібій. Також надано коротку морфологічну характеристику первинних культур клітин, отриманих від жаби шпоркової гладенької (*Xenopus laevis*). Виявлено, що одержані клітини демонстрували однорідну фібробластоподібну морфологію, на відміну більшості описаних клітинних ліній земноводних.

**Ключові слова:** культура клітин, амфібії, жаба шпоркова гладенька (*Xenopus laevis*), фібробластоподібний культуральний субстрат, поживне середовище.

**Постановка проблеми.** Хвороби амфібій останніми роками викликали підвищений інтерес не лише через різке зниження чисельності внаслідок руйнування їх природних місць існування, а також у зв'язку з раптовими спалахами таких високонтагіозних захворювань як хітриддіомікоз та ранавірусна інфекція, що призводять до високої летальності серед популяцій цих тварин не лише на промислових фермах та в зоологічних колекціях, але й у нечисленних популяціях рідкісних та зникаючих видів у природі. У зв'язку з цим із 2009 р. ці захворювання внесені до Списку МЕБ (OIE Listed diseases). Згідно з Настановою МЕБ Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2012) культура клітин є "золотим стандартом", коли йдеться про діагностику інфекцій амфібій, викликаних збудниками роду *Ranavirus*. І незважаючи на те, що певні віруси даної групи можуть бути виділені на деяких перещеплювальних лініях риб, клітинні лінії амфібій є більш чутливими і їх використання прийнятніше. Отже, подальше дослідження цих вірусних захворювань потребує удосконалення методів діагностики, а також винайдення нових пермісивних клітинних ліній для вивчення морфології, еволюції, екології епізоотичного та антропозоотичного потенціалу цих вірусів.

Метод культури клітин є основоположним, оскільки його поява у свій час привела до бурхливого розвитку вірусології – і сьогодні лишається одним з головних її інструментів. Клітинні лінії є абсолютно незамінним методом *in vitro* досліджень багатьох біологічних і молекулярних процесів. Одним з найбільш розповсюджених лабораторних об'єктів у світовій науці є жаби. І саме клітини жаби є першою отриманою культурою клітин. Harrison у 1907 р. культивував нервові клітини зародка жаби у згустку плазми і це досягнення привело до революції у світовій науці і початку використання методу культури клітин.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** У найбільших світових клітинних банках, таких як ECACC, ATCC, DSMZ та кількох колекціях клітинних культур інститутів міжнародного значення, які нараховують десятки тисяч найрізноманітніших клітинних культур, на сьогодні зберігається дуже обмежена кількість клітинних ліній амфібій. Більшість з них була отримана у середині минулого століття і зберігаються понині [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Тому не зважаючи на вже існуючі клітинні лінії жаб, не завжди вони можуть задовольнити зростаючі потреби дослідників. Українські колекції та банки клітинних культур не містять не лише жодної вітчизняної клітинної лінії від амфібій, а навіть штамів з міжнародних колекцій. Окрім того для вітчизняних лабораторій не завжди є можливим та економічно виправданим придбання закордонних клітинних ліній. Більше того їх придбання (як технічний його аспект, так і юридичний) є дуже проблематичним, а робота з ними пов'язана з певними труднощами під час культивування та придбання специфічних і дорогих середовищ. Таким чином, розширення досліджень з отримання

первинних культур клітин і субкультур від амфібій та створення у подальшому вітчизняних перещеплювальних клітинних ліній є актуальним напрямом досліджень.

**Мета досліджень** – визначення оптимальних методів отримання та культурально-морфологічна характеристика первинних культур жаби шпоркової гладенької (*Xenopus laevis*).

**Матеріал і методи досліджень.** Як донорів тканини для отримання первинної культури клітин використали сеголетків жаби шпоркової гладенької (*Xenopus laevis*), масою 2,5 та 3,1 г, придбаних у приватній зооторговій компанії.

Для отримання первинно-трипсинізованої культури клітин жаби шпоркової гладенької було використане поживне середовище DMEM (виробництва компанії HyClone, каталожний номер SH30243.01).

Як хелатні агенти та дезагрегуючі розчини були використані: розчин трипсину 0,25 %, розчин Версену 0,02 %, без  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  («Біо Тест Лабораторія», Україна). Антисептичні, антибактеріальні та фунгіцидні агенти: розчин гентаміцину сульфату 4 % («ПАТ «Артеріум», Україна); пеніцилін-стрептоміцин (10 тис. Од/мл пеніциліну і 10 мг/мл стрептоміцину сульфату) (розчин для культур клітин; P0781; Sigma Chemical Co., EU); флуконазол 0,2 %, "Декасан" розчин 0,02 % («Юрія-Фарм», Україна); спирт етиловий 70 %, ("ВФК" Біо-Фарма ЛТД", Україна). Інші розчини та добавки до поживних середовищ: фетальна сироватка крові ВРХ (FBS) (S7524; Sigma Chemical Co., EU); вода стерильна (дистильована) для ін'єкцій («ПАТ «Артеріум», Україна).

Як субстрат для вирощування клітинних ліній були використані наступні культуральні флакони з ростовою площею 25 см<sup>2</sup>: скляні культуральні матраси (аналог посуду Карелля); полістеролові культуральні матраси (Sarstedt, Germany); полістеролові матраси для культур клітин, виробництва TPP Techno Plastic Products, Switzerland. Використовували попередньо підготовлені та непідготовлені флакони. Підготовку культуральної поверхні здійснювали відповідно до запатентованого методу [8].

Для вивчення морфологічних особливостей отриманих клітин проводили мікроскопічну оцінку нативних та пофарбованих препаратів. Оцінку нативних клітинних зразків проводили під інвертованим мікроскопом Leica DM IL LED за 10x, 20x та 40x-кратних збільшень із застосуванням методу фазового контрасту. Для морфологічної оцінки пофарбованих препаратів клітинну культуру вирощували на стерильних, попередньо знежирених покривних скельцях та фарбували за Папенгеймом [9,10].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Приготування робочих розчинів та середовищ для проведення маніпуляцій з отримання тканинних експлантатів та ініціалізації первинних клітинних ліній здійснювали напередодні отримання зразків. Для знезараження тканинних зразків після отримання використовували підготовче середовище (ПС), яке складалося з середовища DMEM (80 %) та стерильної дистильованої води (20 %), гентаміцину сульфату (0,4 мг/мл), пеніциліну (200 Од/мл), стрептоміцину сульфату (0,2 мг/мл) та флуконазолу (0,04 мг/мл). Як дезагрегуючий розчин був використаний трипсин 0,25 %. Для вирощування отриманих первинних клітинних ліній використовували повне ростове середовище (ППС) – поживне середовище такого ж складу як ПС, але з додаванням FBS 15 % за кінцевим об'ємом, та L-глутаміну 2 мМ/мл. Після приготування усі отримані розчини та середовища стерилізували шляхом фільтрації через 0,22 μm фільтр (Millex®-GS) і їх робочі аліквоти зберігали у стерильному посуді при 4 °C у захищеному від світла місці до використання.

Під час отримання тканинних зразків використовували клінічно здорових, добре вгодованих тварин. Усі маніпуляції з отримання зразків тканин та їх подальшої обробки проводили в асептичних умовах, з дотриманням усіх вимог щодо стерильної роботи з культурами клітин [11]. Для проведення маніпуляцій проводили евтаназію тварин, застосовуючи ефірний наркоз за загальноприйнятою методикою [12]. Усі маніпуляції з тваринами відповідали нормам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментах або з іншою науковою метою (Страсбург, 1986 р.) та Хельсинкської декларації всесвітньої медичинської асоціації про гуманне ставлення до тварин (1996).

Під час отримання зразків зовнішніх органів (шкіри, зябер, плавників та ін.) набагато вищою є вірогідність контамінації, оскільки ці органи населені мікрофлорою. Особливо це стосується тканин амфібій, шкіра яких за життя захищена секретом шкірних залоз, що перестають функціонувати після відокремлення від цілісного організму. Тому перед проведенням маніпуляцій шкірні покриви тварин

необхідно промити хлорованою проточною водою. Ця проста, на перший погляд, процедура дозволяє видалити механічні забруднення та суттєво знизити вірогідність потрапляння сторонньої мікрофлори в культуру. Тому одразу після евтаназії тварин цілком мили під проточною водою без використання детергентів, ретельно ополіскували дистильованою водою, після чого поверхню шкіри ретельно обприскували 70 % етанолом і проводили декапітацію. Для зручності препарування тварин використовували простерилізовані автоклавуванням коркові дощечки та шпильки. Від жаб відбирали пул внутрішніх паренхіматозних органів (печінку, легені, нирки і серце) та задні кінцівки. Внутрішні органи одразу вміщували у ПС та поміщали на холод (4 °С). Отримані таким чином тканинні зразки зберігалися в стерильних, герметично закритих ємностях, за 4 °С впродовж кількох діб без значного зниження життєздатності клітин, після чого були закладені на кріозберігання у рідкий азот за стандартною методикою [11].

Тканинні зразки, отримані із задніх кінцівок одразу після відбору вміщували у стерильні пробірки з 0,02 % розчином Декасану на 1–2 хв і періодично струшували їх. Після чого ретельно обробляли ПС та переносили у стерильну чашку Петрі для механічної дезагрегації, яку проводили застосовуючи стерильні ножиці, скальпель та пінцети. Отриману тканину ретельно подрібнювали на шматочки 0,1–0,2 мм<sup>3</sup>, додавали невелику кількість ПС та збирали шматочки тканини піпеткою з широким отвором (Пастера) або одноразовим шприцом без голки. Переносили у стерильну центрифужну пробірку з ПС, ретельно відмивали від еритроцитів, осаджували центрифугуванням (50–80 г 5–7 хв), супернатант відбирали, а осад ресуспендували у свіжому ПС. Відмивання повторювали 3 рази. Після чого у пробірку із знекровленою тканиною додавали трипсин, у такій кількості, щоб тканина була покрита рідиною на 1,5–2,0 см та залишали за кімнатної температури на 40–50 хв, періодично інтенсивно струшуючи пробірку. Враховуючи дуже маленьку кількість донорської тканини, магнітну мішалку не використовували. Через 40–50 хв у центрифужні пробірки з розтрипсинізованою тканиною додавали ПРС ½ за об'ємом, та осаджували клітинну суспензію центрифугуванням (100 г впродовж 5 хв). Надосадову рідину відбирали, а отриманий осад ресуспендували у 3–4 мл, ПРС. Посівна концентрація складала приблизно  $5 \times 10^5$  кл/см<sup>3</sup>. Клітинну суспензію разом з шматочками тканини переносили у культуральні флакони, які залишали у робочому положенні на 30–40 хв у термостаті за температури 37 °С без додавання ростового середовища [13]. Потім дуже обережно, щоб не змити експлантати, що прикріпилися, по краплинах додавали ПРС. Інкубацію проводили за температури 28 °С у герметично закритих культуральних флаконах, які щоденно перевіряли на наявність проліферації та міграції клітин з експлантатів.

Як "підготовлені субстрати" були використані культуральні флакони, заздалегідь оброблені фетальною сироваткою ВРХ, шляхом нанесення сироватки на ростову поверхню культуральних флаконів та інкубування їх у робочому положенні впродовж двох тижнів до використання за температури 4 °С.

Як "непідготовлені" були використані такі саме культуральні флакони, але без попереднього нанесення на їх ростову поверхню фетальної сироватки крові ВРХ.

Придатність підготовлених та непідготовлених субстратів оцінювали за ефективністю посіву (прикріплення) [10]. Суспензію клітин посівною щільністю  $5 \times 10^5$  кл/см<sup>3</sup> готували у ПРС DMEM, висівали у T25 флакони з підготовленою та непідготовленою поверхнею росту. Культивування проводили за температури 28 °С. Підрахунок проводили у 10 полях зору за збільшення у 100 разів.

У флаконах ТРР з підготовленою поверхнею, прикріплення експлантатів та міграція клітин, а також прикріплення, розпластування та проліферація окремих клітин спостерігалось вже на першу добу після посіву, у 8 з 10 полів зору (рис. 1). Приблизно такі самі результати було отримано у культуральних флаконах ТРР з непідготовленою поверхнею: прикріплення, розпластування та проліферація клітин спостерігалось на першу добу після посіву, але лише у 6 з 10 полів зору (рис. 2).

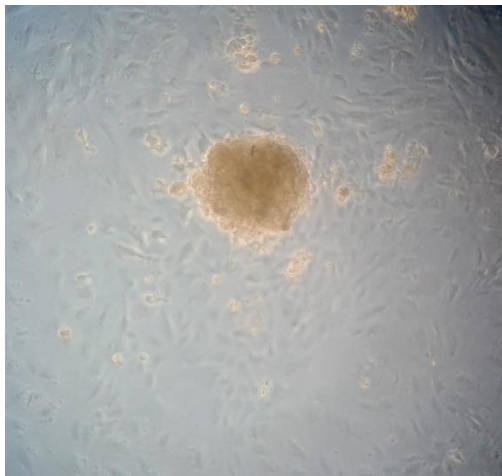


Рис. 1. Прикріплення експлантата та проліферація клітин у підготовленому культуральному флаконі TPP (x200).

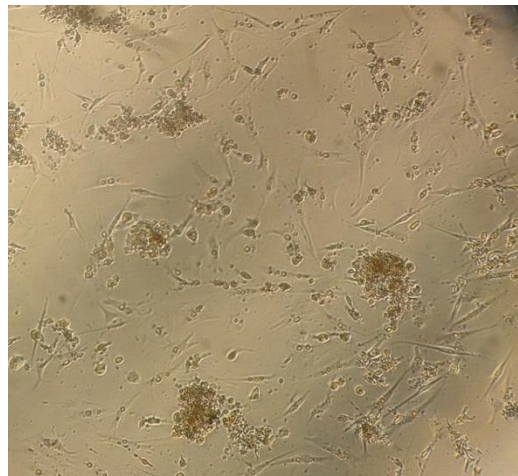


Рис. 2. Прикріплення та проліферація клітин у непідготовленому культуральному флаконі TPP (x100).

Пластикові культуральні флакони Sarstedt з підготовленою культуральною поверхнею також сприяли прикріпленню та проліферації клітин, на першу добу їх можна було спостерігати у 7 з 10 полів зору. На непідготовленому субстраті ознаки прикріплення та росту клітин були зареєстровані у 6 з 10 полів зору.

Скляні культуральні флакони за даних умов найгірше забезпечували клітинний ріст. Підготовлена скляна культуральна поверхня забезпечувала ріст клітин у 3 полях зору з 10, а непідготовлена – у одному.

Отримані первинні клітини мають морфологічні характеристики фібробластів: різко сплюснені, видовжені, веретеноподібної форми клітини, максимально розпластані на субстраті. Ядро овальної форми, розташоване відцентровано та оточене нечітко вираженою цитоплазмою. Клітини, які мігрують з прикріплених тканинних експлантатів формують пучки, що безладно переплітаються, компактно прилягаючи один до одного (рис. 3).

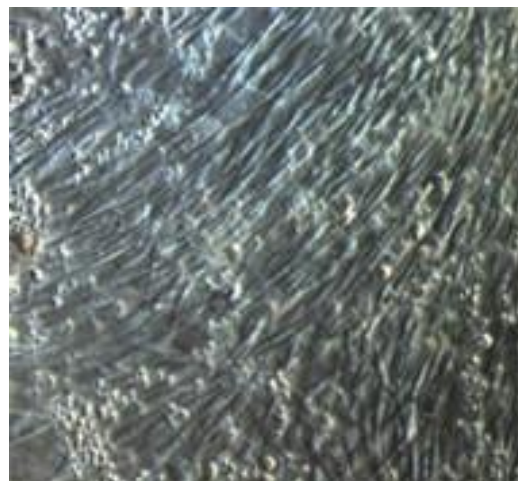


Рис. 3. Фібробластоподібні клітини, які формують пучки, що безладно переплітаються, компактно прилягаючи один до одного (x200).

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Отримані первинні клітини жаби шпоркової гладенької *Xenopus laevis* характеризувалися чітко вираженою фібробластоподібною морфологією, мали притаманну фібробластам видовжену веретеноподібну форму та характер росту на субстраті.

В результаті проведених досліджень було зроблено висновок, що для вирощування первинних культур клітин *Xenopus laevis* придатні як скляні, так і пластикові культуральні субстрати. Попередньо підготовлені пластикові поверхні (полістеролові культуральні флакони виробництва Sarstedt (Німеччина) та TPP (Швейцарія) забезпечували найкращу адгезію, розпластування та проліферацію первинних клітин жаби шпоркової гладенької *Xenopus laevis*. Непідготовлені скляні субстрати, за даних умов, не забезпечували клітинну адгезію та ріст первинної культури клітин даного виду амфібій.

Первинна культура клітин жаб рекомендована МЕБ для діагностики ранавірусної інфекції амфібій.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Characterization of a new cell line, XL2, obtained from *Xenopus laevis* and determination of optimal culture conditions / M.P. Anizet, B. Huwe, A. Pays, J.J. Picard // In Vitro. – 1981. – Vol. 17. – P. 267–274.
2. A new cell line (XTY) from a tumor of *Xenopus laevis* / A. Fukui, A. Tashiro, H. Koyama [et al.] // Experientia. – 1992. – Vol. 48. – P. 87–91.
3. Godsell P.M. The cell cycle of *Xenopus laevis* cells in monolayer culture / P.M. Godsell // Exp. Cell. Res. – 1974. – Vol. 87. – P. 433–436.
4. Nishikawa A. Isolation, characterization, and in vitro culture of larval and adult epidermal cells of the frog *Xenopus laevis* / A. Nishikawa, K. Shimizu-Nishikawa, L. Miller // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1990. – Vol. 26. – P. 1128–1134.
5. Pudney M.A. Establishment of a cell line (XTC-2) from the South African clawed toad, *Xenopus laevis* / M.A. Pudney, M.G. Varma, C.J. Leake // Experientia. – 1973. – Vol. 29. – P. 466–467.
6. Schlage W. Established *Xenopus* heart endothelium (XTH) cells exhibiting selected properties of primary cells / W. Schlage, C. Kuhn, J. Bereiter-Hahn // Europ. J. Cell. Biol. – 1981. – Vol. 24. – P. 21.
7. Smith J.C. *Xenopus* cell lines / J.C. Smith, J.R. Tata // Methods Cell. Biol. – 1991. – Vol. 36. – P. 635–654.
8. Пат. 91485 Україна. Спосіб отримання первинних культур клітин холоднокровних хребетних тварин / З.С. Клестова, І.В. Савінова, В.І. Білоконь // Бюл. – 2014. – № 14. – С. 89.
9. Микроскопическая техника / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 290 с.
10. Животная клетка в культуре (методы применения в биотехнологии) / Под общ. ред. Л.П. Дьяконова. – М.: Спутник+, 2009. – 246 с.
11. Cell culture basics. Handbook. Gibco / Thermo Fisher Scientific Inc., 2014. – 11 p.
12. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин / Ю.М. Кожемякин, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, А.І. Соловійов. – К.: Авицена, 2002. – 134 с.
13. Establishment, Characterization, and Toxicological Application of Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) Primary Skin Fibroblast Cell Cultures / S.J. Webb, G.V. Zychowski, S.V. Bauman [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 2014. – Vol. 48. – P. 14728–14737.

### REFERENCES

1. Anizet M.P., Huwe B., Pays A., Picard J.J. (1981). Characterization of a new cell line, XL2, obtained from *Xenopus laevis* and determination of optimal culture conditions. In Vitro. 17:267–274.
2. Fukui A., Tashiro A., Koyama H., Iwamura Y., Asashima M. (1992). A new cell line (XTY) from a tumor of *Xenopus laevis*. Experientia. 48:87–91.
3. Godsell P.M. (1974). The cell cycle of *Xenopus laevis* cells in monolayer culture. Exp. Cell. Res. 87:433–436.
4. Nishikawa A., Shimizu-Nishikawa K., Miller L. (1990). Isolation, characterization, and in vitro culture of larval and adult epidermal cells of the frog *Xenopus laevis*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 26:1128–1134.
5. Pudney M., Varma M.G., Leake C.J. (1973). Establishment of a cell line (XTC-2) from the South African clawed toad, *Xenopus laevis*. Experientia. 29:466–467.
6. Schlage W., Kuhn C., Bereiter-Hahn J. (1981). Established *Xenopus* heart endothelium (XTH) cells exhibiting selected properties of primary cells. Europ. J. Cell. Biol. 24:21A.
7. Smith J.C., Tata J.R. (1991). *Xenopus* cell lines. Methods Cell. Biol. 36:635–654.
8. Patent na korisnu model' № 91485 «Sposib otrimannja pervinnih kul'tur klitin holodnokrovnih hrebetnih tvarin», Kljestova Z.S., Savinova I.V. Bilokon' V.I 10.07.2014.
9. Mikroskopicheskaja tehnika. Pod. red. Sarkisova D.S., Perova Ju.L. M.: Medicina, 1996. 14:89.
10. Zhivotnaja kletka v kul'ture (metody primenenija v biotehnologii) / Pod. obshh. red. D'jakonova L.P. – M.: Sputnik+, 2009. – 246 s.
11. Cell culture basics. Handbook. Gibco. (2014). Thermo Fisher Scientific Inc. 11.
12. Naukovo-praktychni rekomendacii' z utrymannja laboratornyh tvaryn / Ju.M. Kozhemjakyn, O.S. Hromov, M.A. Filonenko, A.I. Solovjov. – K.: Avycena, 2002. – 134 s.
13. Webb S.J., Zychowski G.V., Bauman S.V. & other. (2014) Establishment, Characterization, and Toxicological Application of Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*) Primary Skin Fibroblast Cell Cultures. Environ. Sci. Technol. 48:14728–14737.

### **Получение и культурально-морфологическая характеристика первично-трипсинизированной культуры клеток лягушки шпорцевой (*Xenopus laevis*)**

**И.В. Савинова, З.С. Клестова**

В статье приведены данные относительно особенностей получения первичных культур клеток бесхвостых амфибий на модели лягушки шпорцевой (*Xenopus laevis*). Содержатся рекомендации относительно выбора оптимальных культуральных субстратов и питательных сред, которые используются для культур клеток других классов животных, в частности млекопитающих, и их адаптации для выращивания клеток амфибий. Также приведена краткая морфологическая характеристика первичной культуры клеток, полученной от лягушки шпорцевой (*Xenopus laevis*). Выявлено, что полученные клетки демонстрировали однородную фибробластоподобную морфологию, в отличие от большинства описанных ранее клеточных линий земноводных.

**Ключевые слова:** культура клеток, амфибии, шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*), фибробластоподобный культуральный субстрат, питательная среда.

*Надійшла 07.04.2015 р.*