

УДК 619:576.35:57.082.26

DOI 10.29326/2304-196X-2018-4-27-44-48

ХРАНЕНИЕ ПОЧЕК ПОРОСЯТ ПРИ СУБНОРМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСЛОЯ ПЕРВИЧНО ТРИПСИНИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Б. Л. Манин¹, Н. В. Коропова², В. А. Стариков³, И. В. Вологина⁴

¹ Ведуший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: manin_bl@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия

³ Ведуший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ Ведуший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vologina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Длительное хранение внутренних органов и тканей необходимо для рационализации технологического процесса получения первичных клеток, пригодных для вирусологических исследований. Представлены результаты изучения сохранности органов при субнормальных температурах в лабораторных условиях с целью дальнейшего получения полноценного монослоя первичных клеток. Предложен способ хранения до 6 сут изолированной в стерильных условиях почки 3–5-месячного поросенка. В качестве стабилизирующей субстанции использовали среду 199 без сыворотки с добавлением 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед./мл гентамицина. Для оптимизации химического гомеостаза среды хранения орган помещали в емкость с широким горлом, в которой соотношение среды и воздушной фазы было 1:1, накрывали чашкой Петри. Хранили при температуре от –1 до +4 °С до 6 сут, не допуская кристаллизации среды и органа. Сделано заключение, что любое замораживание с кристаллизацией (при –2 до –4 °С) без криопротекторов отрицательно сказывается на выживаемости клеток и тканей органов. По окончании срока хранения почки проводили трипсинизацию с получением полноценного монослоя первичной культуры. При проведении вирусологических работ все варианты полученного клеточного материала были пригодны для определения авирулентности полуфабрикатов, проведения реакции нейтрализации и выделения вируса ящура. Предложенный метод хранения почек поросят позволяет более рационально использовать донорские органы для получения первичных культур, используемых в вирусологии. Этот способ хранения органов может быть рекомендован для консервирования и транспортировки органов, полученных в полевых условиях от домашних и диких животных.

Ключевые слова: первичная культура клеток почек поросенка, среда 199, субнормальные температуры, трипсинизация, посевная концентрация, вирус ящура.

UDC 619:576.35:57.082.26

STORAGE OF PIGLET KIDNEYS AT SUBNORMAL TEMPERATURES FOR PRIMARY TRYPSINIZED CELL MONOLAYER PREPARATION

B. L. Manin¹, N. V. Koropova², V. A. Starikov³, I. V. Vologina⁴

¹ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: manin_bl@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia

³ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vologina@arriah.ru

SUMMARY

Optimization of the technology for preparation of the primary cells suitable for virological studies requires long-term storage of internal organs and tissues. Results of tests of organs stored at subnormal temperatures under laboratory conditions for the purpose of further preparation of complete monolayer of primary cells for their preservation are presented. Method for 6-day storage of kidneys aseptically taken from 3–5 month-old piglets was proposed. Serum-free medium 199 supplemented with 100 U/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 100 U/ml of gentamycin was used as a stabilizing substance. The organ was placed in a wide-neck vessel at medium/air phase ratio of 1:1 and the vessel was covered by a Petri dish to optimize medium chemical homeostasis and stored at temperature of –1 to +4 °C up to 6 days avoiding medium and organ crystallization. It was concluded that any freezing with crystallization and without cryoprotector (of –2 to –4 °C) had a negative effect on cell and organ tissue survivability. Trypsinization and complete monolayer preparation were carried out upon the kidney storage period completion. All variants of prepared cell materials used for virological studies were suitable for testing semi-preparations for their avirulence as well as for virus neutralization tests and foot-and-mouth disease virus isolation. Proposed method for porcine kidney storage allows more effective use of donor organs for primary culture preparation for virological studies. This method of organ storage could be recommended for preservation and transportation of organs derived from domestic and wild animals under field conditions.

Key words: piglet kidney cell cultures, medium 199, subnormal temperatures, trypsinization, seeding concentration, foot-and-mouth disease virus.

ВВЕДЕНИЕ

Способы сохранения органов человека при субнормальных температурах (0...+4 °С) уже несколько десятилетий применяются в трансплантационной хирургии [8]. Благодаря фундаментальным исследованиям, проведенным с органами животных, было выявлено, что паренхиматозные органы можно пересаживать в течение 1 сут после изъятия от донора, роговицу глаз в течение 3 сут хранения [5, 8, 9]. По окончании этого срока наступают необратимые биохимические и морфологические изменения в тканях, которые приводят к отторжению органа реципиентом [1, 7]. В большинстве случаев необратимые изменения наступают в сосудистых системах (образуются тромбы) и в стромальных тканях, которые обеспечивают приживаемость органов.

В ветеринарной вирусологии, несмотря на рекомендуемые 2–4 ч хранения при 0...+4 °С внутренних органов и тканей [4], сохранение более 2 сут также имеет научно-прикладное значение. Первая причина необходимости в длительном хранении почек – это рационализация технологического процесса получения первичных клеток, когда период трипсинизации необходимо растянуть во времени для получения свежих, не переросших культур, пригодных для вирусологических исследований. Вторая причина – изучение сохранности органов при субнормальных температурах в лабораторных условиях для дальнейшего применения этих данных в полевых условиях с целью получения из сохраненных органов полноценного монослоя первичных клеток. При получении из трипсинизированных органов полноценного монослоя первичных клеток необходимо также изучить их пригодность для вирусологических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первично трипсинизированную культуру получали из почек поросят 3–5-недельного возраста с использованием общепринятых методик получения первичных клеточных культур [5, 6]. Хранение изолированных почек осуществляли при +4 °С в среде 199 с 50 мкг/мл гентамицина без сыворотки. Трипсинизацию почек проводили через 1–6 сут хранения.

В процессе эксперимента проведена работа по изучению: адгезивной способности отдельных клеток; их агрегаций; морфологии седиментированных клеток; сроков формирования монослоя; чувствительности к вирусу ящура [2, 3]. Для выращивания первичных клеток поросят (СП) использованы питательная среда Игла с 0,25% ГЛА (Serva) и фетальная сыворотка крупного рогатого скота (Bioclot). Культивирование клеток осуществляли в пенициллиновых флаконах и пластиковых флаконах с площадью роста 25 см².

Анализ морфологии клеток и монослоя проводили с помощью фазово-контрастного микроскопа Olympus CKX41. Также осуществляли подсчет продуктивности первичных клеток после произошедшего на 5–7-е сут образования монослоя.

Чувствительность первичной культуры клеток СП оценивали по результатам титрования рабочей дозы вируса при постановке реакции нейтрализации. Одно и то же разведение культурального вируса ящура титровали на монослое первичной культуры клеток СП, выращенной сразу после трипсинизации. Через 2–3 сут повторяли контроль инфекционности вируса на куль-

туре клеток СП, выращенной после хранения в течение 2–6 сут при температуре 0...+4 °С суспензии клеток или цельных почек поросенка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально для получения необходимого количества дополнительной первичной клеточной культуры для вирусологических целей использована суспензия трипсинизированных клеток, которая хранилась 48 ч при +4 °С. Монослой клеток удалось получить (при посеве 200 000 кл. в мл) за 5 сут, но после исследования по репродукции вируса ящура выявлено, что клетки были малочувствительны к вирусу (табл. 1).

Результаты, представленные в таблице 1, подтверждают факт негативного воздействия хранения трипсинизированной суспензии клеток при +4 °С на чувствительность клеток СП к вирусу. Также необходимо отметить, что после хранения в течение 2 сут суспензии первично трипсинизированных клеток СП формируется монослой с большим количеством агрегатов и стромальных фибробластных клеток. Отмечен большой процент неспецифической дегенерации монослоя в процессе постановки реакции нейтрализации.

При морфологической оценке монослоя выяснили, что в межклеточном пространстве присутствует в большом количестве внеклеточный матрикс – белок, который, вероятно, частично изолирует клетки от вирусов (рис. 1) и тем самым снижает чувствительность клеток к вирусу ящура. Поэтому было решено провести исследования по трипсинизации почек, хранившихся в питательной среде при температуре, близкой к 0 °С.

После забора почек от 4-недельных поросят органы помещали во флакон с широким горлом с питательной средой 199, в которую добавляли 50 мкг/мл гентамицина. Флакон накрывали стерильной чашкой Петри, помещали в бытовой холодильник, в котором поддерживали температуру, близкую к 0 °С. Флакон с органом не был герметизирован пробкой для прохождения процесса пассивного газообмена с окружающим воздухом. Такое условие хранения выполнено для того, чтобы избежать закисления среды, так как даже в охлажденных

Таблица 1
Результаты определения чувствительности культуры клеток СП, полученной из хранившейся суспензии, к вирусу ящура

Тип вируса	Титр культурального вируса ящура (lg ТЦД ₅₀ /0,1 см ³) на культуре клеток	
	суспензия клеток СП, нативная	суспензия клеток СП, хранившаяся 48 ч при +4...+6 °С
А	2,00	2,00
	2,50	2,75
	2,75	2,50
0	1,75	0,75
	2,0	1,25
Азия-1	2,00	1,75
	2,00	1,00
<i>M ± m</i>	2,11 ± 0,15	1,71 ± 0,29

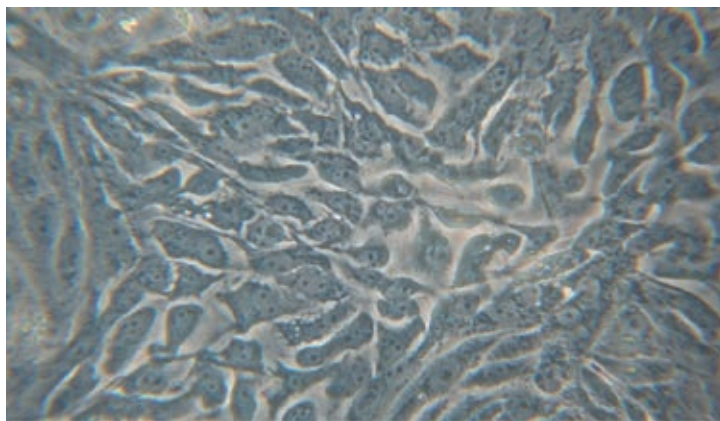


Рис. 1. Монослой первичных клеток СП с внеклеточным матриксом

органах идет гликолиз [5]. При хранении в течение 96 ч почки поросенка в 100 мл среды 199 при температуре, близкой к 0 °С, рН среды повысилась с 7,0 до 7,1–7,2. Во флаконе со средой 199, где не было органа, рН повысилась до 7,6. Стабилизация рН среды, где находится почка, свидетельствует о том, что ткани дышат, утилизируют глюкозу и выделяют углекислый газ и метаболиты.

Следующим этапом исследования было изучение влияния замораживания органов при температуре –2...–4 °С на качество получаемых культур клеток. Для получения клеток проведена трипсинизация почки поросенка после оттаивания кристаллической фазы системы «среда + почка» (т. е. почка была во льду и, вероятно, сама была частично заморожена). Затем суспензию клеток посеяли в пенициллиновые флаконы

и пластиковые матрасы с площадью роста 25 см². Не окрашенные трипановой синью клетки (концентрация 200 000 кл./мл) при посеве не адгезировались и не формировали монослой. Дезагрегированные клетки оказались на стадии апоптоза. Сделано заключение, что любое замораживание с кристаллизацией без криопротекторов отрицательно сказывается на выживаемости на 90% состоящих из воды клеток и тканей органов [1, 9].

Хранившиеся при +2 °С в течение 2–6 сут почки поросенка не изменяли свою консистенцию и цвет. Кожный слой измельчали стальными ножницами и диспергировали теплым раствором трипсина стандартным способом. Из 1 г почечной ткани получали до 30 млн клеток, не окрашенных трипановой синью. Как было выявлено в предыдущих работах, трипсинизированные клетки были полиморфны и принадлежали к разным гистотипическим тканям, не все клетки были способны образовывать колонии [2, 4].

При проведении данных экспериментов клетки, полученные из хранившихся при +2 °С в течение 2–6 сут почек, также были полиморфны и в дальнейшем имели стандартную динамику седиментации, адгезии и пролиферации. Первый показатель сохранности клеток после трипсинизации – это количество жизнеспособных клеток, полученных из 1 г почечной ткани и тестированных окрашиванием трипановой синью. Количество живых клеток, полученных из 1 г почечной ткани, во всех случаях равнялось в среднем 15–20 млн.

В процессе проведения опытов по хранению почек при температурах, близких к 0 °С, изучены морфологические характеристики первичных клеток в зависимости от возраста монослоя (рис. 2–5).

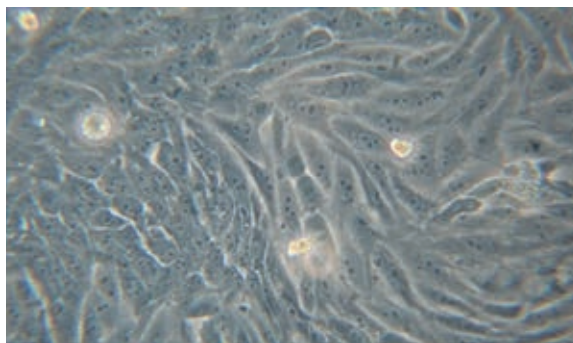


Рис. 2. Клеточная культура СП, полученная без предварительного хранения почки

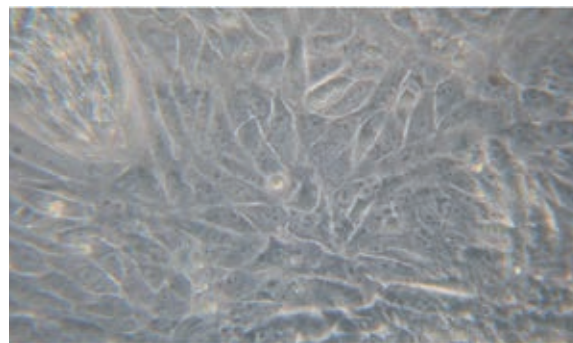


Рис. 3. Клеточная культура СП, полученная после хранения почки в течение 72 ч

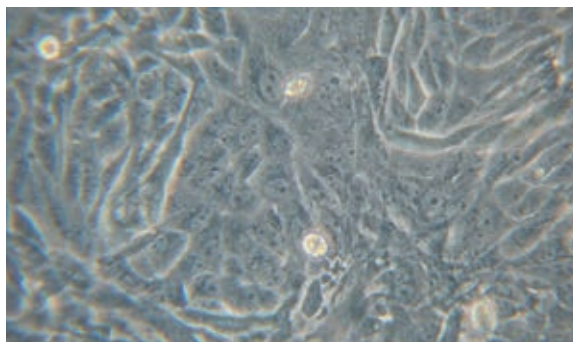


Рис. 4. Клеточная культура СП, полученная после хранения почки в течение 96 ч

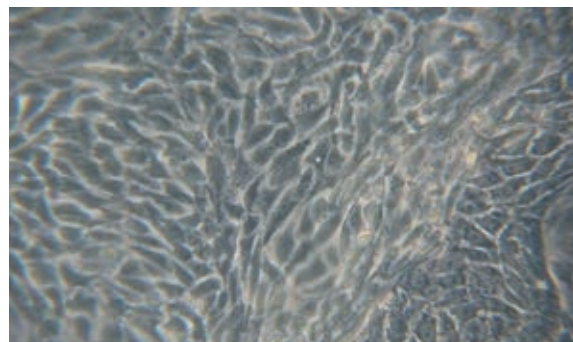


Рис. 5. Клеточная культура СП, полученная после хранения почки в течение 144 ч

Таблица 2
Характеристика полученного монослоя первичных клеток в зависимости от срока хранения почек поросят при +2 °С

Длительность хранения почек при +2 °С, ч	Посевная концентрация, кл./мл	Время формирования монослоя, сутки	Качество монослоя	Чувствительность к вирусу ящура
0	150 000	5	стандартно полиморфное	стандартная
24	120 000	5	стандартно полиморфное	стандартная
48	120 000	5	стандартно полиморфное	стандартная
72	150 000	5	стандартно полиморфное	стандартная
96	150 000	6	стандартно полиморфное	стандартная
120	170 000	6	стандартно полиморфное	стандартная
144	180 000	7	стандартно полиморфное	стандартная

Как видно из представленных рисунков 2–5, сформированный монослой во всех случаях представлен полиморфными клетками с минимальным количеством внеклеточного матрикса. После хранения почек от 0 до 3 сут при температуре, близкой к 0 °С, и последующей трипсинизации тканей коркового слоя (при оптимальной посевной концентрации клеток) монослой формируется за 5 сут; при хранении от 4 до 5 сут полноценный монослой образуется за 6 сут. При 6-суточном хранении почек монослой сформировался за 7 сут с преобладанием нормальных полиморфных клеток без внеклеточного матрикса (табл. 2).

При визуальном наблюдении почки поросят при температуре хранения, близкой к 0 °С, не меняют цвет, также отсутствуют явные признаки некроза, диспергирование трипсином происходит в стандартном режиме. Однако после 5-суточного хранения почек пролиферативная активность выживших после трипсинизации клеток ниже на 15–20%. Динамика формирования монослоя запаздывает в среднем на 1 сут. Во всех опытах контаминации банальной микрофлорой не наблюдали и первичную культуру получали стерильной.

При проведении вирусологических работ все варианты полученного клеточного материала были пригодны для определения авирулентности полуфабрикатов, проведения реакции нейтрализации и выделения вируса ящура (табл. 3).

Чувствительность клеток к вирусу ящура была сравнима с контролем. Цитопатическое действие вируса ящура на клетки, полученные после хранения органа до 6 сут, было типичным и интенсивным (рис. 6).

В процессе постановки вирусологических реакций удалось проанализировать динамику и специфику цитопатического действия вируса ящура на первичные клетки. В первую очередь поражаются эпителиеподобные клетки монослоя. Они становятся сферическими, процесс деадгезирования сопровождается появлением множества цитоплазматических выростов. Через некоторое время поверхность клеток становится гладкой, затем зернистой, и далее происходит фрагментация, т. е. разрушение монослоя до детрита. Сделано предположение, что эпителиеподобные клетки выросшего монослоя являются предшественниками эпителиальных тканей, выстилающих поверхность боуменовых капсул, которые первыми принимают на себя контакт

с вирусами, циркулирующими в организме поросенка. Потомки стромальных клеток сосудов и органов (фибробласты) поражаются вирусной инфекцией в последнюю очередь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данных об условиях хранения почек животных для получения первичных клеточных культур в литературных источниках найдено не было. Проведенные исследования позволяют говорить о возможности более длительного использования донорских органов.

Таблица 3
Влияние хранения почек поросенка на чувствительность монослоя первично трипсинизированной культуры клеток к вирусу ящура

Тип вируса	Титр культурального вируса ящура (lg ТЦД ₅₀ /0,1 см ³) на культуре клеток	
	суспензия клеток СП, нативная	суспензия клеток СП, хранившаяся 48 ч при 0...+4 °С
А	2,25	2,00
	2,50	3,00
	2,00	2,75
	2,50	2,75
	3,00	2,75
	2,00	1,75
	2,50	2,00
	2,50	3,00
0	2,00	2,75
	2,00	2,50
Азия-1	2,25	2,00
	2,00	2,25
<i>M ± m</i>	2,29 ± 0,09	2,46 ± 0,13

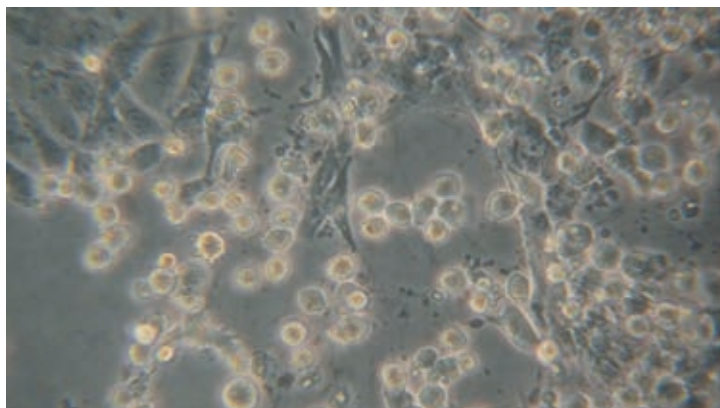


Рис. 6. Дегенерация монослоя первичных клеток СП при взаимодействии с вирусом ящура

Выявлено, что хранение почек в стерильных условиях при температуре, близкой к 0 °С, не приводит к кристаллизации органов, в то же время сохраняется жизнеспособность гистотипических клеток, которые после трипсинизации и получения полноценного монослоя чувствительны к вирусу ящура.

Определено, что кристаллизация среды и почек во время хранения при температуре -2...-4 °С ведет к необратимым изменениям в трипсинизированных клетках, которые после инокуляции в культуральные сосуды не адгезируются и не образуют колоний.

В результате проведенных опытов показано, что при хранении в холодильнике при +4 °С в течение 2 сут первично трипсинизированных клеточных суспензий происходит частичная гибель эпителиальных клеток, наиболее чувствительных к вирусу ящура. В то же время хранение почек при субнормальных температурах (0...+2°С) от 2 до 6 сут позволяет получать после трипсинизации нормальные популяции первичных клеток с высокой чувствительностью к вирусу.

Предложенный метод хранения почек поросят позволяет более рационально использовать донорские органы для получения первичных культур, используемых в вирусологии. Этот способ хранения органов может быть рекомендован для консервирования и транспортировки органов, полученных в полевых условиях от домашних и диких животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кирпатовский В. И., Кудрявцев Ю. В. Криоконсервация почки крысы и кролика // Успехи современной криобиологии: материалы 11-й международной конф. – Харьков, 1992. – С. 82–83.
2. Манин Б. Л., Коропова Н. В. Влияние артефактов биологического статуса поросят на культивирование первичной культуры, полученной из почки // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2012. – Т. 10. – С. 238–245.
3. Манин Б. Л., Коропова Н. В., Стариков В. А. Способ хранения почки поросенка для получения первично трипсинизированных клеток и использование его в вирусологических

исследованиях: пат. 2646135 Российская Федерация, МПК А01N1/02 (2006.01). – № 2016140461; заявл. 14.10.16; опубл. 01.03.18.

4. Ночевный В. Т. Комплексная стандартизация получения первичных культур клеток // Цитология. – 1999. – Т. 41, № 3–4. – С. 298–299.

5. Трошина В. П. Функциональное состояние изолированных тканей при температуре, близкой к нулю // Вестник Ленинградского ун-та. – 1957. – № 3. – С. 111–121.

6. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.

7. Юрченко Т. Н., Жуликова Е. П., Говоруха Т. П. Структурно-функциональные показатели клеток печени на этапах подготовки к криоконсервации // Проблемы криобиологии. – 1991. – № 1. – С. 8–16.

8. Янгсон Р.-М. Хирургия. Что и зачем делает хирург? – Минск: Попурри, 1997. – 592 с.

9. Jeske A. H., Fonteles M. C., Karow A. M. Functional preservation of the mammalian kidney. III. Ultrastructural effects of perfusion with dimethylsulfoxide (DMSO) // Cryobiology. – 1974. – Vol. 11 (2). – P. 170–181; DOI: 10.1016/0011-2240(74)90307-1.

REFERENCES

1. Kirpatovsky V. I., Kudryavtsev Yu. V. Cryopreservation of rat and rabbit kidneys [Kriokonservatsiya pochki krysy i krolika]. *Achievements of modern cryobiology: Proceedings of the 11th International Conference*. Kharkov, 1992; 82–83 (in Russian).
2. Manin B. L., Koropova N. V. Effect of pig biological status artifacts on cultivation of kidney-derived primary cultures [Vliyaniye artefaktov biologicheskogo statusa porosyat na kul'tivirovaniye pervichnoy kul'tury, poluchennoy iz pochki]. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. Vladimir, 2012; 10: 238–245 (in Russian).
3. Manin B. L., Koropova N. V., Starikov V. A. Method of storage of porcine kidneys for primary trypsinized cell preparation and their use in virological studies [Sposob hraneniya pochki porosenka dlya polucheniya pervichno tripsinirovannykh kletok i ispol'zovanie ego v virusologicheskikh issledovaniyakh]: patent No. 2646135 Russian Federation, МПК А01N1/02 (2006.01). No. 2016140461; applied on 14.10.16; published on 01.03.18 (in Russian).
4. Nochevny V. T. Integrated standardization of primary cell culture preparation [Kompleksnaya standartizatsiya polucheniya pervichnykh kul'tur kletok]. *Cell and Tissue Biology*. 1999; 41 (3–4): 298–299 (in Russian).
5. Troshina V. P. Functional state of isolated tissues at temperatures close to zero [Funktsional'noe sostoyaniye izolirovannykh tkanej pri temperature, blizkoj k nulyu]. *Vestnik Leningradskogo universiteta*. 1957; 3: 111–121 (in Russian).
6. Freshney R. *Yan Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. M.: Binom. Laboratoriya znaniy, 2011 (in Russian).
7. Yurchenko T. N., Zhulikova Ye. P., Govorukha T. P. Structural and functional characteristics of kidney cells at the stages of their preparation for cryopreservation [Strukturno-funktsional'nye pokazateli kletok pecheni na etapah podgotovki k kriokonservatsii]. *Problems of Cryobiology*. 1991; 1: 8–16 (in Russian).
8. Yangson R.-M. *Khirurgiya. What and why surgeon is doing? [Hirurgiya. Chto i zachem delaet hirurg?]* Minsk: Poppuri, 1997. (in Russian).
9. Jeske A. H., Fonteles M. C., Karow A. M. Functional preservation of the mammalian kidney. III. Ultrastructural effects of perfusion with dimethylsulfoxide (DMSO). *Cryobiology*. 1974; 11 (2): 170–181; DOI: 10.1016/0011-2240(74)90307-1.

Поступила 05.06.18

Принята в печать 20.11.18