

УДК 619:576.35:57.082.26

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ЛИНИИ ВНК-21/2-17 МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

М. А. Шевченко¹, М. Н. Гусева², Д. В. Михалишин³, Б. Л. Манин⁴, А. А. Шишкова⁵

¹ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁴ Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin_bl@arriah.ru

⁵ Главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shishkova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты исследования клеточного цикла линии ВНК-21/2-17 методом проточной цитометрии. Данная клеточная линия получила широкое применение в биологической промышленности, поэтому изучение закономерности клеточного цикла суспензии клеток ВНК-21/2-17 при помощи предложенного метода и определение средств и методов профилактики морфологических и структурных изменений клеток в культуре под воздействием неблагоприятных факторов представляет большой интерес. Проточная цитометрия позволяет определять количественные параметры фаз клеточного цикла и проводить корреляцию между этими фазами и жизнеспособностью производственной популяции клеток. Отмечено, что общая тенденция суспензионного культивирования данной клеточной линии в течение 48 ч имела стандартную динамику, при этом на всех этапах клеточного цикла преобладала фаза начального роста – G_1 . При неблагоприятных условиях культивирования апоптоз и дебрис могли возрасти до 31–59%, т. е. часть популяции клеток могла быть потенциально нерепродуктивной. Выявлены неблагоприятные этапы культивирования, связанные с низким содержанием водородного показателя в культиваторе, где pH не поддерживали на постоянном определенном уровне. При оптимизации физико-химических параметров культивирования клеток интенсивность пролиферации увеличивалась. Выход жизнеспособных клеток в культиваторе, где поддерживался определенный уровень pH, был выше, и на синтетической стадии $G_2 + M$ не происходило задержки циклов.

Ключевые слова: проточная цитометрия, апоптоз, фазы клеточного цикла.

UDC 619:576.35:57.082.26

STUDIES OF THE ВНК-21/2-17 LINEAGE USING FLOW CYTOMETRY

M. A. Shevchenko¹, M. N. Guseva², D. V. Mikhailishin³, B. L. Manin⁴, A. A. Shishkova⁵

¹ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁴ Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: manin_bl@arriah.ru

⁵ Chief Technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shishkova@arriah.ru

SUMMARY

The paper presents results of the ВНК-21/2-17 lineage cell cycle tests using flow cytometry. This cell line is widely used in biological industry that is why studying the ВНК-21/2-17 cell suspension pattern using the proposed technique and determination of tools and methods to prevent morphological and structural cell modifications in the culture affected by negative factors is of great interest. Flow cytometry allows to determine quantitative parameters of cell cycle phases and perform correlation between these phases and viability of the working cell population. It was mentioned that the general trend of this cell lineage suspension cultivation for 48 hours has a standard dynamics, herewith at all stages of the cell cycle the primary growth stage – G_1 prevailed. Under unfavorable conditions of cultivation apoptotic debris could increase up to 31–59%, i. e. part of the cell population could be potentially non-reproductive. Unsuccessful cultivation stages associated with low pH content in the cultivator where pH was not maintained at the constant level were detected. During optimization of cell cultivation physical and chemical parameters proliferation intensity increased. Viable cell yield during cultivation when a specific pH was maintained was higher and at the synthetic stage $G_2 + M$ no cycle delay occurred.

Key words: flow cytometry, apoptosis, cell cycle phases.

ВВЕДЕНИЕ

Проточная цитометрия – это уникальная современная технология, обеспечивающая быстрый, качественный и мультипараметрический анализ клеток, которая получила широкое распространение в таких областях медицины, как иммунология, фармакология, цитология, онкология, гематология, генетика, инфекционные болезни. Процессы, которые возможно исследовать с помощью данного метода, многообразны [1].

Современный метод проточной цитометрии позволяет с высокой точностью и статистически достоверно измерить вещества, содержащиеся в клетках и их ядрах. Принцип заключается в том, что клетки или ядра поодиночке пересекают сфокусированный световой пучок, лазерный или от ртутных ламп сверхвысокого давления. Свет определенной длины возбуждает молекулы флуоресцирующих красителей, связанных с различными клеточными компонентами, при этом может происходить одновременное возбуждение нескольких разных красителей, что позволяет оценить сразу несколько клеточных параметров. Методом проточной цитометрии можно получать самые разные данные: определять содержание в клетке ДНК и РНК, суммарное количество белков и количество специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами, исследовать клеточный метаболизм (например, измерять внутриклеточный рН), изучать транспорт ионов кальция и кинетику ферментативных реакций [7].

У каждой клетки есть период существования от момента ее образования путем деления материнской клетки до собственного деления или гибели, называемый клеточным циклом. Сам клеточный цикл составляют два периода: 1) период клеточного роста, называемый «интерфаза», и 2) период клеточного деления, называемый «фаза М». В свою очередь, в каждом периоде выделяют несколько фаз. Обычно интерфаза занимает не меньше 90% времени всего клеточного цикла. Большая часть компонентов клетки синтезируется на протяжении всей интерфазы, это затрудняет выделение в ней отдельных стадий.

В интерфазе выделяют фазы G_1 , S и G_2 . Период интерфазы, когда происходит репликация ДНК клеточного ядра, был назван «фаза S». Период между фазой M и началом фазы S обозначен как фаза G_1 , а период между концом фазы S и последующей фазой M – как фаза G_2 [3].

Благодаря использованию в исследованиях проточных цитометров получены важные данные, касающиеся классификации клеток по фазам митотического цикла, а также получены результаты, позволяющие оценить продолжительность и дисперсию соответствующих фаз цикла G_1 , S, G_2 + M.

Определение содержания ДНК в клеточном ядре является распространенным методом цитологического исследования, результаты которого важны для геномных исследований и для практической медицины [6]. Из ДНК-гистограмм можно получить два рода данных. Во-первых, идентифицировать клетки с аномальным содержанием ДНК, так называемые анеуплоидные клетки. Во-вторых, определить долю клеток, находящихся в фазе S, и оценить степень пролиферации. Как правило, в клеточной популяции с высокой пролиферативной активностью число клеток в фазе S больше, чем обычно. Однопараметрический анализ кинетики клеточного цикла по изучению содержания ДНК показал возможности количественной цитометрии и открыл широкие перспективы относительно его ис-

пользования для исследования и углубления знаний по изучаемому вопросу.

Таким образом, проточная цитометрия позволяет исследовать многие важные параметры клеточного цикла.

Нерегламентированные условия культивирования клеточной линии приводят к значительному снижению интенсивности роста, изменению культуральных, морфологических и кариологических показателей, а также переходу изолированных клеток в стационарную фазу роста, где они могут находиться в некробиотическом состоянии, в стадиях паранекроза или программированной клеточной гибели – апоптозе. При оптимизации условий культивирования клетки, находящиеся в некробиотическом состоянии, как правило, восстанавливают ростовой потенциал, в то же время большая часть клеток в стадии паранекроза и апоптоза погибает. Экспериментально доказано, что величина апоптоза является объективным показателем, характеризующим жизнеспособность клеток, ростовой потенциал и перспективность для практического применения [4].

Перевиваемая линия клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/2-17 ввиду высокой чувствительности ко многим вирусам и потенции роста получила широкое применение в биологической промышленности. Поэтому вопрос изучения закономерности клеточного цикла ВНК-21/2-17 при помощи метода проточной цитометрии и определения средств и методов профилактики морфологических и структурных изменений клеток в культуре под воздействием неблагоприятных факторов представляет интерес.

Целью исследований было: изучение динамики клеточного цикла методом проточной цитометрии при суспензионном культивировании клеточной линии ВНК-21/2-17 в течение 48 ч; рассмотрение влияния постоянного значения рН среды на фазы клеточного цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали:

- клетки ВНК-21/2-17;
- культиваторы металлические с контроллером, рабочий объем 40 дм³, (KM-50) «Tris»;
- культиваторы стеклянные, рабочий объем 40 дм³ (КС-40);
- культиваторы металлические, рабочий объем 800 и 1800 дм³ (KM);
- проточный цитометр «Accuri C6»;
- набор для работы с цитометром «Becton, Dickinson and Company BD Biosciences»;
- набор для определения ДНК клеток «C6 Flow Cytometer Fluid Kit».

Пробы отбирали каждые 2 ч на протяжении одного пассажа культивирования.

Концентрацию клеток ВНК-21/2-17 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови, dA0.000.851, которая соответствует ТУ 64-1-816-84. К 1 см³ клеточной взвеси добавляли равный объем 0,2% раствора трипановой сини, тщательно перемешивали и заправляли камеру. Количество клеток в 1 см³ суспензии определяли по формуле [2]

$$X = \frac{A \times B \times 4000}{3600} \times 1000,$$

где A – общее количество клеток в камере;
 B – разведение суспензии.

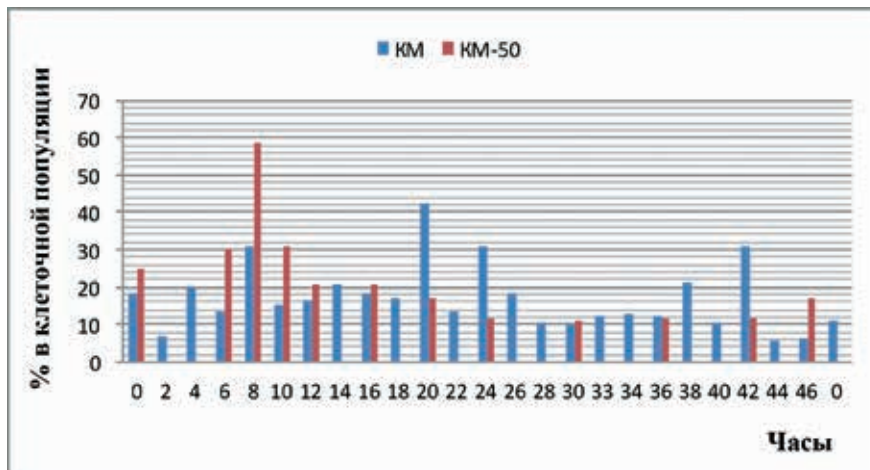


Рис. 1. Динамика изменения апоптоза и дебриса при культивировании ВНК-21/2-17 в KM и KM-50

Подсчет проводили при 10-кратном увеличении микроскопа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику клеточного цикла определяли по следующим показателям:

- интенсивность прироста клеточной популяции, которая рассчитывалась как отношение конечной концентрации клеток и исходной в одном пассаже;
- изменения апоптоза и дебриса при культивировании суспензии клеток ВНК-21/2-17;
- изменения стадий клеточного цикла (G_1 , S , $G_2 + M$).

Общая тенденция суспензионного культивирования клеточной линии ВНК-21/2-17 в течение 48 ч имела стандартную динамику роста, определяемую через интенсивность прироста.

ДНК клетки определяли в KM и в KM-50 с помощью набора «С6 Flow Cytometer Fluid Kit». При культивировании в KM водородный показатель (pH) среды проверяли 3 раза в сутки, а в KM-50 pH поддерживался постоянно на заданном уровне. Результаты опытов представлены на рисунках 1–6.

При сравнении количества клеток, находящихся в апоптозе, установили, что через 8 ч от начала культивирования происходит увеличение количества апоп-

тозных клеток и дебриса (до 31% в KM и 59% в KM-50). Вероятно, это связано с адаптацией культуры к условиям культивирования и питательной среде, далее скачков апоптоза в KM-50 не наблюдали (рис. 1).

При культивировании в системе, где не поддерживается постоянный уровень pH, происходит еще несколько пиков роста потенциально непродуктивных клеток. Увеличение этого показателя связано с крайними значениями pH среды. Так, при измерении pH было установлено, что через 20, 24, 38, 42 ч его значение было $6,38 \pm 0,17$, в то время как для данной линии ВНК оптимальным является pH 6,6–6,7.

При исследовании интенсивности прироста клеток в KM-40 и KM-50 отмечено, что интенсивность прироста в KM-40 была $4,34 \pm 0,07$, а в KM-50 – $4,90 \pm 0,11$ ($n = 90$), различия достоверны, $p < 0,001$ (рис. 2).

Таким образом, поддержание pH питательной среды на заданном уровне вело к уменьшению количества клеток, находящихся в апоптозе, и увеличению интенсивности прироста клеточной популяции, т. е. чем ниже pH среды, тем больше было дебриса, апоптоза и потенциально непродуктивных клеток.

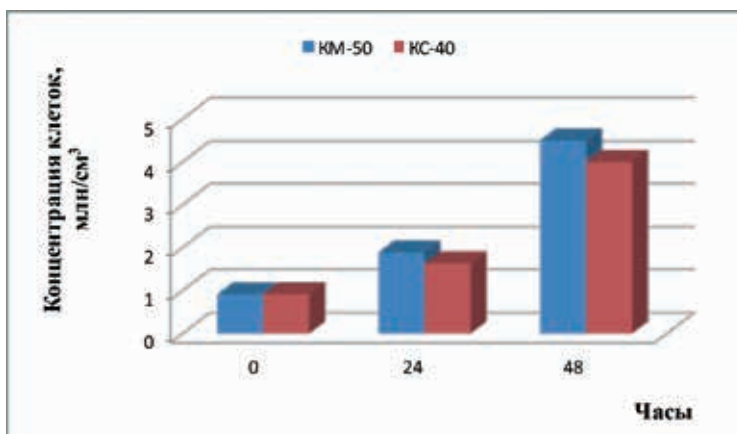
При оптимизации физико-химических параметров культивирования клеток ВНК-21/2-17 интенсивность прироста клеточной популяции увеличивалась.

Установили, что сразу после загрузки количество клеток, находящихся в стадии G_1 , было 58–63%, которое через 8 ч уменьшилось на 34–39% (рис. 3), но выросло в 4–6 раз в стадии S (рис. 4). Через 16–20 ч количество клеток в стадии G_1 опять возрастало на 38–47% и держалось на заданном уровне до окончания цикла культивирования (48 ч).

Интересную закономерность можно выделить в динамике стадии $G_2 + M$ (рис. 5): через 8, 22 и 36 ч наблюдали уменьшение количества клеток, а через 12–16, 24, 44 ч – увеличение.

Таким образом, в клеточном цикле линии ВНК-21/2-17 преобладала фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов, т. е. фаза G_1 . На эту фазу приходилось от 30 до 75% клеток в зависимости от времени культивирования. Фаза S , во время которой идет репликация ДНК клеточного ядра, занимала от 2 до 33%, а фаза подготовки к митозу и сам митоз ($G_2 + M$) – от 2 до 18% (рис. 4, 5).

Рис. 2. Сравнение интенсивности прироста клеток в разных системах культивирования



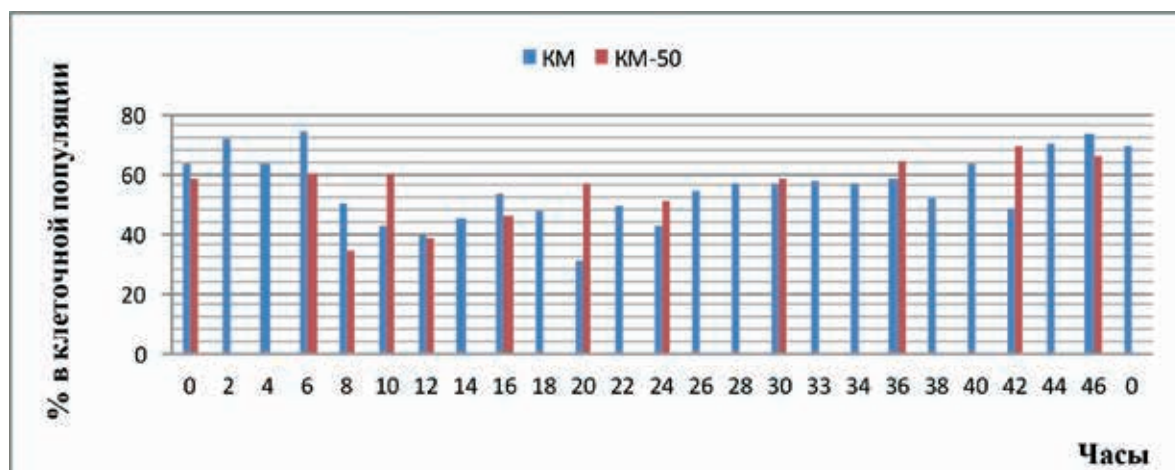


Рис. 3. Динамика изменения стадии G₁ при культивировании ВНК-21/2-17 в КМ и КМ-50

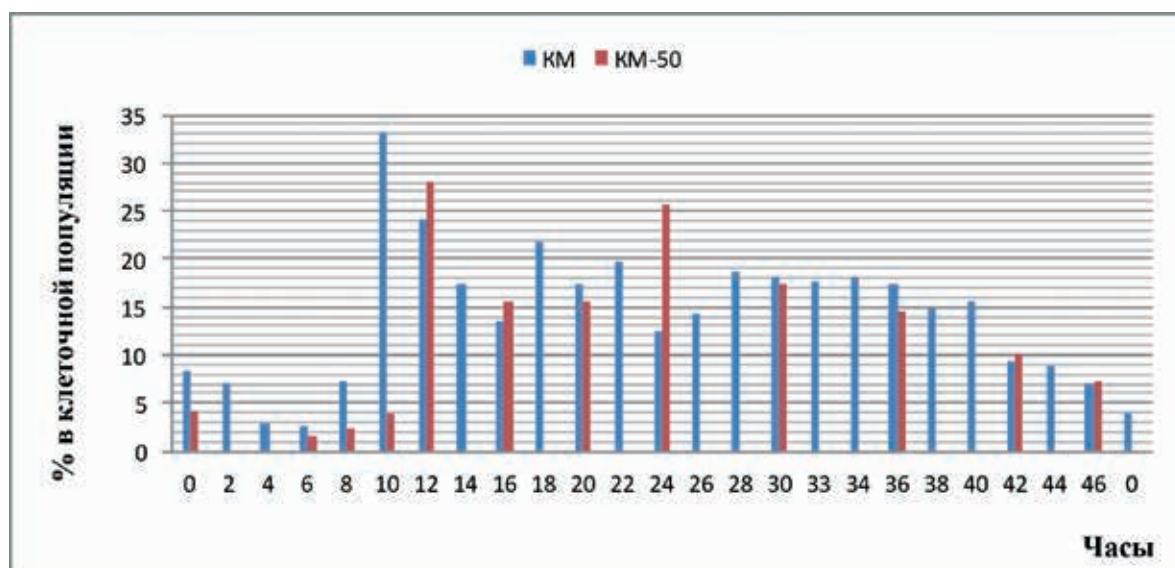


Рис. 4. Динамика изменения стадии S при культивировании ВНК-21/2-17 в КМ и КМ-50

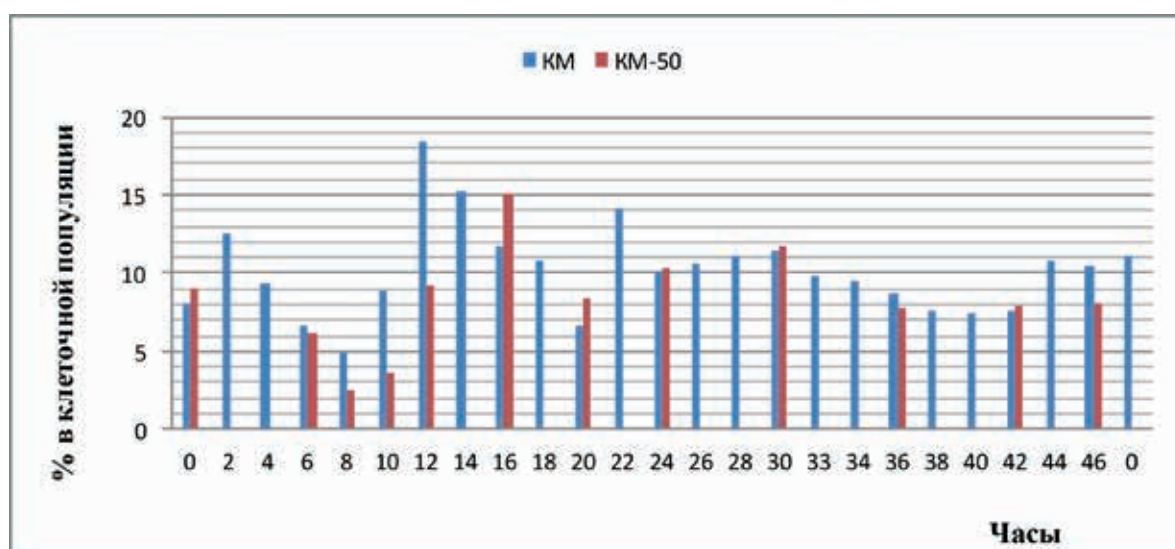


Рис. 5. Динамика изменения стадии G₂ + M при культивировании ВНК-21/2-17 в КМ и КМ-50

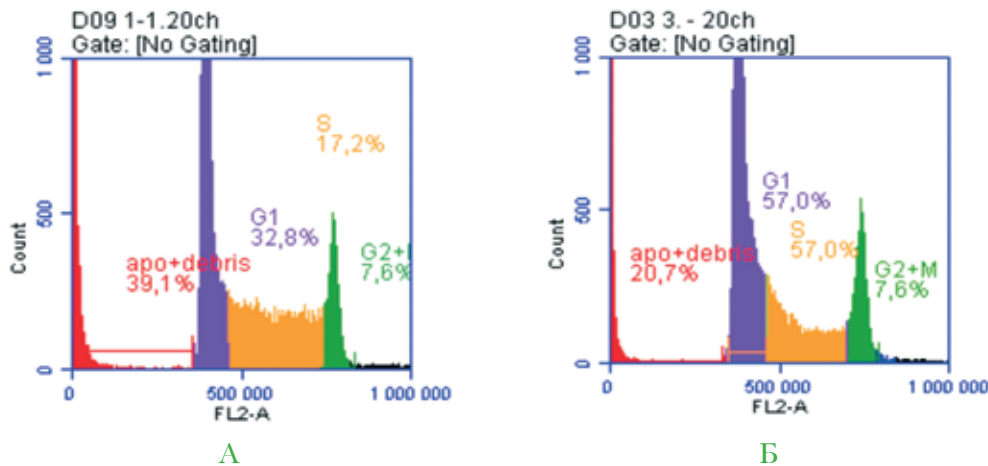


Рис. 6. ДНК-гистограмма клеток ВНК-21/2-17 при культивировании в КМ (А) и КМ-50 (Б) через 20 ч после загрузки

ДНК-гистограммы клеток ВНК-21/2-17, культивируемых в КМ и КМ-50, через 20 ч после загрузки представлены на рис. 6. В культиваторах с постоянным поддержанием рН меньше клеток в апоптозе, выше количество клеток в фазах G_1 и S в течение продолжительного времени (20 ч после загрузки).

В более ранних работах при использовании цейтраферной киносъемки было выявлено время клеточного цикла линии ВНК-21/2-17, равное примерно 12 ч. Таким образом, по простым подсчетам, при соблюдении оптимальных условий культивирования при посевной концентрации $0,5 \times 10^6$ кл/см³ теоретически через 48 ч должны получить 8×10^6 кл/см³ [5].

Таким образом, в начале логарифмической стадии роста активизировалась синтетическая фаза (S) и уменьшалось количество клеток, находящихся в фазе G_1 . На вторые сутки синтетическая фаза стабилизировалась и оставалась такой до конца культивирования. При этом увеличивалась численность клеток, находящихся в фазе $G_2 + M$ (до 10,5–11,8% всей клеточной популяции).

Апоптоз и дебрис при неблагоприятных условиях культивирования могли возрасти до 31–59%, т. е. часть популяции клеток могла быть потенциально непродуктивной. При оптимизации физико-химических параметров культивирования клеток ВНК-21/2-17 интенсивность пролиферации увеличивалась.

Количество апоптических клеток оставалось одинаковым при любом способе культивирования, но при поддержании рН на постоянном определенном уровне выход жизнеспособных клеток был выше и задержки циклов на синтетической стадии и $G_2 + M$ не происходило, что способствовало уменьшению плоидности популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проточная цитометрия позволяет определять количественные параметры фаз клеточного цикла и проводить корреляцию между этими фазами и жизнеспособностью производственной популяции клеток.

Определено, что при суспензионном культивировании линии ВНК-21/2-17 в течение 48 ч на всех этапах клеточного цикла преобладала фаза начального роста – G_1 .

Были выявлены неблагоприятные этапы культивирования в 20, 24, 38, 42 ч, связанные с низким содержанием водородного показателя ($6,38 \pm 0,17$) в культиваторах, где постоянно не поддерживали рН на определенном уровне.

Было установлено, что при оптимизации физико-химических параметров культивирования клеток ВНК-21/2-17 увеличивалась интенсивность пролиферации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Войткова В. В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 6 (76), ч. 1. – С. 220–225.
2. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М.: Спутник+, 2009. – 656 с.
3. Клетки / под ред. Б. Льюина [и др.]. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011. – 951 с.
4. Колышкин В. М., Ночевный В. Т., Новохатский А. С. Апоптоз клеток в культуре: особенности проявления и влияние на эффективность биотехнологического производства (обзор) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2005. – № 6. – С. 99–105.
5. Манин Б. Л., Худяков Г. А., Бурдов А. Н. Оценка функционального состояния клеток по их морфологии при криоконсервировании с помощью различных методов // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тез. докладов науч. конф. ВНИИЯ. – Владимир, 1988. – С. 5–6.
6. Основные этапы разработки и применения метода проточной цитометрии в ФГУ РНЦРХТ / А. С. Ягунов, А. В. Карташев, С. В. Токалов, Л. Н. Киселева // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 494–497.
7. Эффективность метода проточной цитометрии в изучении механизмов репарации клеток ВНК-21 в процессе культивирования и криоконсервирования / Б. Л. Манин, В. Т. Ночевный, С. В. Хайдуков, В. Н. Ласкавый // Ветеринарна медицина: міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2011. – Вип. 95. – С. 66–70.