

УДК 619:57.082.26

И. А. ПУНТУС**В. А. БАБАК**, кандидат ветеринарных наук**А. Ю. ВОЛЧЕЦКАЯ, А. Е. ФИЛИПКОВА, Е. Е. ВЕРЕСОВАЯ**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии

им. С.Н.Вышелесского»

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНОВ ПЕРЕПЕЛОВ

В статье описывается технология получения фибробластов эмбрионов перепелов, которая позволят получать 61-72 млн.кл./эмбр.. Для культивирования ФЭП подобраны комбинированные питательные среды, позволяющие получать культуру с ИПА 2,0-2,6. Подобраны оптимальные посевные концентрации клеток с целью получения сформированного монослоя через 24-36 часов и культивирования клеток в течении 5 суток.

Ключевые слова: первичная культура клеток, фибробласты эмбрионов перепелов, субкультивирование клеток.

Производство противовирусных вакцин, как медицинских, так и ветеринарных, в настоящее время основано на накоплении вирусной биомассы в различных культурах клеток, среди которых первичные линии клеток имеют важное значение в силу их высокой специфичности и чувствительности.

Первичной – называется культура, полученная из ткани и выращиваемая *in vitro* до начала субкультивирования, то есть до первого посева. Такая культура лишена многих клеток, присутствующих в исходной ткани, поскольку не все клетки способны прикрепляться к субстрату и выжить *in vitro*. Первичные культуры получают путем трипсинизации тканей. Большая часть клеток первичной культуры способна к весьма ограниченному росту *in vitro* – обычно это не более чем 5-10 делений, в результате чего срок жизни таких культур ограничен [1, 2, 5].

Увеличение биомассы клеточной культуры, получаемой от одного животного, являющегося донором ткани, остается важнейшим этапом производственного процесса. Осуществление поставленной задачи возможно двумя способами: либо за счет увеличения сборов первично-трипсинизированных клеток, либо за счет использования более эффективных способов культивирования клеток. В силу биологических особенностей первично-трипсинизированных клеток кардинально усовершенствовать или заменить рутинные способы культивирования клеток не представляется возможным. Таким образом, дальнейшее совершенствование способов дезагрегации исходных тканей животных-доноров и культивирование полученных клеток остается по-прежнему актуальным [2, 4].

Несмотря на ряд сложностей в получении и выращивании первичных культур клеток они остаются незаменимыми в силу высокой специфичности и чувствительности к отдельным вирусным штаммам. Например, в ветеринарной практике в настоящее время остаются актуальными вопросы культивирования вируса болезни Марека, реовируса, накопление которых проводится на первичной

культуре фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП) [3, 4, 6]. Для получения фибробластов в мировой практике принято использование SPF-эмбрионов перепелов (specific pathogen free – свободные от специфических патогенов).

Целью наших исследований являлась отработка эффективного и технологичного способа получения клеток и культивирования фибробластов эмбрионов перепелов, пригодных для использования в качестве клеточных моделей при научно-исследовательской работе и при изготовлении вирусных вакцин из чувствительных штаммов.

Для достижения поставленной цели определены следующие **задачи**:

определить оптимальный возраст эмбрионов для получения культуры фибробластов;

отработать технологию получения ФЭП;

подобрать рациональную посевную концентрацию клеток ФЭП для получения полного монослоя через 24-36 часов;

подобрать оптимальную ростовую питательную среду;

определить возможность субкультивирования клеток ФЭП.

Материалы и методы.

В опытах использовали оплодотворенные яйца перепелов, которые инкубировали для получения эмбрионов при 37-39°C. Перед вскрытием поверхность яиц, уложенных в лотки, обрабатывали 70% спиртом, фламбировали и вносили в ламинарную зону для дальнейших манипуляций.

Эмбрионы асептически извлекали в стерильные чашки Петри с раствором Хенкса, с добавлением антибиотиков и антимиотика (стрептомицин – 200 мкг/мл, пенициллин – 200 мкг/мл, амфотерицин Б - 10 мкг/мл). Удаляли головы, и двукратно промывали тушки указанным раствором, затем вскрывали тушки и извлекали внутренние органы и вновь промывали раствором Хенкса. Тушки измельчали на кусочки размером 1,5-2 мм, переносили в плоскодонные колбы и заливали 0,02% раствором версена и с добавлением 2,5% концентрата раствора трипсина («Invitrogen»). Отработывая методику трипсинизации тканей раствором версен-трипсина подбирали конечную концентрацию трипсина в растворе 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 и 0,35%, и проводили манипуляции до полного истощения тканей.

Трипсинизацию тканей проводили на шуттель-аппарате IKA KS260 basic («Laboratory equipment»), помещенном в термостат при $+37 \pm 0,1^\circ\text{C}$, скорость перемешивания раствора 150 дв./мин. Каждые 10 минут трипсинизирующий раствор сливали и доливали свежий. К клеточной суспензии добавляли питательную среду с содержанием 15-20% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) для дезактивации действия трипсина на клетки. Полученную клеточную суспензию фильтровали через четырехслойный марлевый фильтр, затем центрифугировали при 1100 об/мин 10-12 минут, надсадок сливали, а клетки ресуспендировали в питательной среде с добавлением 10 % сыворотки КРС.

Подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева после добавления к 1 мл клеточной взвеси равного объема 0,2%-го раствора трипанового синего и 8 мл физиологического раствора. Расчет концентрации клеток и определение живых и мертвых клеток проводили по общепринятой методике.

Качество трипсинизации тканей оценивали по выходу клеток с одного эмбриона, жизнеспособности клеток, скорости формирования клеточного монослоя, морфологии клеток, а так же количеству клеточных конгломератов в исходной клеточной суспензии.

Суспензию рассеивали в культуральные стеклянные матрасы Ру, пластиковые матрасы различного объема.

В опытах по подбору оптимальной ростовой питательной среды для выращивания ФЭП использовали синтетические среды ИглаМЕМ, 199, и ферментативную среду гидролизат лактальбумина (ГЛА) («Sigma»). Во всех вариантах к питательной среде добавляли 10% нормальной сыворотки крови КРС, показавшую лучшие ростостимулирующие свойства для клеток ФЭК.

С целью подбора посевной концентрации для получения полного монослоя через 24 часа, пригодного для заражения, отработывали несколько вариантов – 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10×10^5 кл/см³; для подбора посевной концентрации с целью культивирования в течении 5 суток и отработки получения субпассажа ФЭП – 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 кл/см³.

Через 5 суток субкультивирования первичной культуры ФЭП, из матрасов сливали ростовую питательную среду, монослой дезагрегировали раствором версен-трипсина в подобранной концентрации, проводили подсчет клеток и рассев из расчета согласно отработанной посевной концентрации.

Результаты исследований.

В опытах по получению культуры ФЭП было использовано 10 эмбрионов 7-суточного, 48 эмбрионов 8-суточного, 24 эмбриона 9-суточного и 10 эмбрионов 10 суточного возраста. 7-суточные эмбрионы были развиты слабо. При вскрытии у эмбрионов 9 и 10-ти суточного возраста наблюдалось развитие оперения. При получении фибробластов из таких эмбрионов, дифференцировать клеточную суспензию ФЭП от перьевых фолликулов не представлялось возможным, в результате чего качество формируемого клеточного монослоя резко снижалось.

Для проведения трипсинизации опытным путем отработывались пять концентрации трипсина в растворе версена (таблица 1).

Таблица 1

Влияние концентрации трипсина в дезагрегирующем растворе на выход клеток и ростовые свойства ФЭП

Концентрация трипсина в дезагрегирующем растворе, %	Выход клеток с эмбриона, млн.кл.	Выход клеток с эмбриона, ср.знач., млн.кл.	Процент жизнеспособных клеток, %
0,15	28-46	38,45±5,62	98-99
0,2	33-54	45,68±4,81	98-99
0,25	36-64	51,34±5,27	98-99
0,3	61-72	67,87±6,34	97-99
0,35	55-69	62,24±6,12	89-91

Исследования, результаты которых приведены в таблице 1, показали, что наиболее оптимальной для получения фибробластов перепелов была концентрация трипсина в растворе версена – 0,3%. Средний выход клеток с одного эмбриона составил 67,87±6,34 млн. кл., при этом монослой формировался через сутки, клетка была морфологически правильной веретенообразной формы. При использовании более низких концентраций трипсина в диспергирующем растворе кусочки тканей во время трипсинизации сбивались в конгломераты, которые при расसेве с трудом разбивались. В результате выход клеток снижался. При использовании 0,35%-ной концентрации трипсина и выше, в суспензии появ-

лялось до 11 % нежизнеспособных клеток, снижался средний выход клеток с эмбриона до $47,24 \pm 8,12$ млн. кл.

С целью подбора оптимальной ростовой среды использовали среды на основании проведенного анализа литературных данных (ЕМЕМ, 199, ГЛА). Во всех вариантах к питательной среде добавляли 10% сыворотки крови КРС. Результаты по подбору оптимальной ростовой питательной среды для культивирования ФЭП приведены в таблице 2.

Таблица 2

Ростовые свойства ФЭП на разных питательных средах

Питательная среда	Выход клеток с матраса, млн.кл.	Выход клеток с матраса, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
Игла МЕМ	127-157	148,35±15,80	1,7– 2,1
199	105-128	115,35±12,30	1,4– 1,7
ГЛА	126-152	138,15±12,10	1,7–2,0
Игла МЕМ +199 (1:1)	111-143	124,41±39,60	1,5–1,9
Игла МЕМ+ГЛА (1:1)	163-192	187,50±18,25	2,2-2,6
ГЛА+199 (1:1)	131-153	141,30±12,60	1,7–2,0
ИглаМЕМ+199+ГЛА (1:1:1)	164-186	164,71±43,15	2,2-2,5

Как видно из таблицы 2, наиболее оптимальной питательной средой для культивирования ФЭП оказались комбинированные среды, состоящие из синтетического и ферментативного компонентов: ИглаМЕМ+ГЛА в соотношении 1:1 и ИглаМЕМ+199+ГЛА (1:1:1) с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота при pH среды 7,2, которые обеспечивали формирование полного монослоя при посевной концентрации 5×10^5 кл/см³ ($75,0 \times 10^6$ клеток на 1,5-литровый матрас Ру) через 96 часов, с выходом через 5 суток – $187,5 \pm 18,25 \times 10^6$ и $164,71 \pm 43,15 \times 10^6$ кл/матрас соответственно (индекс пролиферативной активности составил 2,2-2,6 и 2,2-2,5). При использовании монокомпонентных синтетических питательных сред выходы по сравнению с комбинацией ИглаМЕМ+ГЛА были ниже: Игла МЕМ на 26,4%, среда 199 – на 62,5%, ИглаМЕМ+199 (1:1) – на 50,7%. Выход фибробластов при культивировании на монокомпонентной гидролизной среде ГЛА был ниже базового варианта в среднем на 35,7%.

С целью определения оптимальной посевной концентрации для получения полного монослоя через 24 часа отработывали несколько вариантов концентраций клеток в суспензии – $6,0 \times 10^5$, $7,0 \times 10^5$, $8,0 \times 10^5$, $9,0 \times 10^5$, $10,0 \times 10^5$ кл/см³. Результаты изучения формирования монослоя клеток приведены в таблице 3.

Таблица 3

Формирование монослоя при разных посевных концентрациях клеточной суспензии ФЭП

Посевная концентрация клеточной суспензии, 10^5 кл/см ³	Процент формирования клеточного монослоя, часы				
	12	24	36	48	72
6,0	10-20	40-50	50-60	70-90	90-100
7,0	20-40	50-70	80-90	90-100	100
8,0	30-50	70-90	90-100	100	100
9,0	50-70	90-100	100	100	100
10,0	70-90	90-100	100	100	100

На основании данных, приведенных в таблице 3, наиболее оптимальной посевной концентрацией для получения полного монослоя через 24-36 ч была концентрация клеток в посевной суспензии $8,0-9,0 \times 10^5$ кл./см³ (120-135 млн.кл./матр.). Более низкие посевные концентрации не обеспечивали формирование полного монослоя за 24-36 ч культивирования.

Для подбора посевной концентрации клеток с целью культивирования в течении 5 суток и отработки методики субкультивирования клеток ФЭП исследовали следующие посевные концентрации – $3,0 \times 10^5$, $4,0 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$, $6,0 \times 10^5$, $7,0 \times 10^5$ кл/см³.

Таблица 4

Формирование монослоя при разных посевных концентрация клеточной суспензии ФЭП

Посевная концентрация клеточной суспензии, $\times 10^5$ кл/см ³	Процент формирования клеточного монослоя, часы				
	24	48	72	96	120
3,0	10-20	20-40	40-60	70-80	90-100
4,0	20-30	30-50	50-70	80-90	90-100
5,0	20-40	50-70	80-90	90-100	100
6,0	40-50	70-90	90-100	100	100
7,0	50-70	90-100	100	100	100

Оптимальным оказалось использование посевной концентрации 5×10^5 кл/см³, что позволяло получать полный монослой через 96 часов и использовать культуру для посева 5-ти суточным циклом. При более высокой посевной концентрации монослой клеток перерастал и к 5-м суткам культивирования в суспензии появлялись мертвые клетки. При посевной концентрации $3-4 \times 10^5$ кл/см³ формирование полного монослоя происходило только к 5-м суткам, при этом ИПА клеток составил 1,1-1,5 что является низким показателем для субкультивирования клеток.

Сформированный монослой клеток через 5 суток роста использовали для получения субпассажа. Клетки снимали с помощью раствора версена трипсина в подобранной концентрации. Выход с 1,5-литрового матраса Ру составлял от 126 млн.кл. до 148 млн.кл., средний выход – $158,25 \pm 15,0$ млн.кл./матр (ИПА – 1,7–2,0).

Проводили 2 последовательных субпассажа. Полученную клетку рассевали в 1,5-литровые матрасы с посевной концентрацией 5×10^5 кл/см³. Для формирования полного монослоя через 24 часа, клетки рассевали в концентрации $8,0-9,0 \times 10^5$ кл./см³ (120-135 млн.кл./матр.). Матрасы с сформированным монослоем фибробластов использовались для экспериментального накопления вируса болезни Марека.

Выводы:

Определен оптимальный возраст эмбрионов с целью получения качественной культуры фибробластов эмбрионов перепелов – 8 суток.

Отработана оптимальная методика проведения трипсиназации тканей с использованием 0,02% раствора версена и добавлением 0,3% трипсина при $+37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, скорость перемешивания раствора 150 дв./мин.

Подобрана оптимальная ростовая комбинированная питательная среда ИглаМЕМ+ГЛА в соотношении 1:1 с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота (рН среды 7,2), которая обеспечивает формирование полного

монослоя при посевной концентрации 5×10^5 кл/см³ ($75,0 \times 10^6$ клеток на 1,5-литровый матрас Ру) через 96 часов, с выходом через 5 суток – $187,5 \pm 18,25 \times 10^6$ кл/матрас (индекс пролиферативной активности – 2,2-2,6).

Определена оптимальная посевная концентрация – $8,0-9,0 \times 10^5$ кл/см³ (135 млн.кл на 1,5-литровый матрас Ру) для получения полного сформированного монослоя через 24-36 часа культивирования для последующего заражения вирусом.

Отработана методика культивирования ФЭП 5-суточными циклами с целью получения субпассажа культуры.

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с.

2. *Дьяконов Л. П.* Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / Под общ.ред. проф. Дьяконова Л.П. – М.: Издательство «Спутник+», 2009. – 656 с.

3. Патент «Штамм "ВНИИЗЖ/№ 110" вируса герпеса индеек для изготовления вакцины против болезни Марека», 2144562 / Ш.К.Куляшбекова, А.А. Гусев; Ж.А. Шажко; В.Г. Андреев; Е.В. Гусева; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. - №99113380/13; заяв. от 20.01.2000 г.

4. Применение однослойных клеточных культур. Выращивание вируса в однослойной культуре [Электронный ресурс] / Медицинская микробиология. – 2012. – Режим доступа: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/917.html>– Дата доступа: 15.06.2012.

5. *Фрешни, Р.* Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 318 с.

6. *Чуйко О. М.* Биологические свойства вакцинных штаммов вирусов инфекционной бурсальной болезни и герпеса индеек (методы совместного культивирования и конструирование бивалентной вакцины) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / О.М.Чуйко. – Щелково, 2008. – 24 с.

THE TECHNOLOGY OF DISAGGREGATION AND CULTIVATION OF FIBROBLAST EMBRYO'S OF QUAIL / Puntus I. A., Babak V. A., Volchekaya A. J., Filipkova A. E.,

The technology of disaggregation of fibroblast embryo's of quail that provide about 60 mln.cells from egg is described at the article. For the cultivation of FEQ cells was found combinations of nutrient mediums that provide IPA 2.0-2.6. The optimal concentration of cells is supply to get full monolayer to 24-36 h and provide growing of cells during 5 days.

Key words: cell culture, fibroblast embryo's of quail, subcultivation of cells.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **У. М. Яненко**