

17. Kamath, S.A., & Joshi, S.R. (2003). Re-emerging of infections in urban India – Focus Leptospirosis. *J Assoc Phys*, 51, 247-248.
18. Kingsote, B. (1985). Leptospirosis in Livestok. *The Canadian Veterinary Journal*, 26, 235-236.
19. Ozgur, A. (2016). Leptospirosis; Diagnosis, Treatment and Prevention: a Review. *British Microbiology Research Journal*, 13 (6), 1-5.
20. Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., & Akritidis, N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends (review). *Int. J. Infect. Dis.*, 12, 351-357.
21. Suvarna, P. Ningal, & Manoj, B. Kothule (2015). A review on leptospirosis. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, Is. 9, 1531-1543.
22. Vivek, K.N., & Padmakumar, B. (2004). Neuroleptospirosis. *JK Science*, Vol. 6, 4, 218-219.
23. Verma, R., & Srivastava, S. (2012). Evaluation and comparison of native and recombinant *LipL21* protein-based ELISA for diagnosis of bovine leptospirosis. *Journal of Veterinary Science*, 13, N.1, 99-101.
24. Vijayachari, P, Sugunan, A.P., & Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.*, 33, 557-569.
25. Waleed, Alorry, Arahou, M., & Hassikou R. (2016). Leptospirosis: Transmission, Diagnosis and Prevention. *Innovative Space of Scientific Research Journals*, 15, No. 3, 457-467.
26. WHO (2003). World Health Organization Human Leptospirosis audience for diagnosis, Surveillance and control. (7th ed.). USA, 20, 61-69.
27. World Health Organization (2007). Leptospirosis: laboratory manual.
28. Zavitsanou, A., & Babatsikou F. (2008). Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. *Health Science Journal*, 2, Is. 2, 75-82.

УДК: 57.086.83:594.1

БАБКІН М.В., канд. вет. наук, e-mail: babkinmv@yandex.ua,

ГАВРАСЬЄВА Н.В., канд. вет. наук, e-mail: gari-nata@ukr.net,

КУЗЬМИЧ Г.С., e-mail: 80505752885@mail.ru

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН З ПРІСНОВОДНИХ МОЛЮСКІВ

Наведено результати отримання за допомогою різних методів первинної культури прісноводного молюска, клас двостулкові (Bivalvia), а саме: ферментативного, механічного та комбінації обох методів. Досліджено, що найбільший вихід клітин прісноводного молюска спостерігали при використанні комбінованого методу отримання первинної культури клітин та при використанні комбінації 2 поживних середовищ DMEM та F-12 (1:1) + 20% ембріональної сироватки ВРХ. Також підібрано оптимальну температуру +20 і +25°C для культивування первинної культури. За температури 37C° міграцію клітин прісноводного молюска не спостерігали. Отримана культура може бути використана в біотехнології, ветеринарній та гуманній медицині.

Ключові слова: прісноводні молюски, первинна культура клітин, поживні середовища для культивування культур клітин.

Вступ. Молюски, або м'якуни (лат. *Mollusca*) – тип первинноротих двобічно-симетричних целомічних тварин зі спіральним дробленням зиготи. Молюски мають здібності до регенерації, але для них не характерне утворення злоякісних пухлин [1, 2]. Усі спроби отримати перещеплювані лінії культур клітин із тканин цих тварин не мали успіху. Можливо, нездатність клітин тіла молюска до поділу в штучних умовах та низький «злоякісний потенціал» і є причиною неспроможності отримання перещеплених ліній. Тільки в останні роки в літературі з'явилися повідомлення про отримання клітинних ліній з тканин деяких морських безхребетних – асцидій (Rinkevich, Rabinovitz, 1994; Kawamura, Fujiwara, 1995) і коралових поліпів (Frank et al., 1994). Стало відомо, що низьку мітотичну активність, характерну для тканин всіх морських безхребетних, і довготривалий клітинний цикл можна суттєво змінити в умовах *in vivo* [6–8].

Мета роботи. Метою нашої роботи було отримання первинної культури клітин з прісноводного двостулкового молюска, клас двостулкові (*Bivalvia*), використовуючи різні умови культивування та їх подальшу оптимізацію, підбір поживного середовища.

Матеріали і методи дослідження. В роботі використовували 3 методи отримання первинної культури клітин, а саме: ферментативний, механічний та комбінацію обох методів [3–5].

Ферментативний метод. Суть методу полягає у використанні 0,25% розчину трипсину з метою руйнування міжклітинних зв'язків. Після обробки черепашки молюска річкового 70% спиртовим розчином проводили розтин молюска. Відділяли від мантиї тканину його ноги та розрізали на 4 рівні частини у чашці Петрі в забуференому розчині з антибіотиків (10000 ОД/мл пеніциліну, 10 мг/мл стрептоміцину, 25 мг/мл амфотеріцину, гентаміцину сульфату 40 мг/л). До отриманого матеріалу додавали суміш 0,25% трипсину з розчином Версена та 5% розчину глюкози у співвідношенні (1:8:1). Далі подрібнену тканину інкубували у термостаті за температури +20, +25, +37°C. Через 24 години зливали рідину, а до осаду додавали повторно суміш розчинів 0,25% трипсину, Верстану та 5% глюкози (1:8:1). Суміш клітин, яка була зібрана, фільтрували через декілька шарів марлі у центрифужні пробірки. Центрифугували 5 хвилин при 1500 об./хв. Надосадову рідину зливали та центрифугували. Для отримання більшої концентрації клітин таку маніпуляцію проводили тричі. Отриману масу клітин розділили на 4 частини. До отриманої суспензії клітин додавали різні ростові поживні середовища, а саме: ДМЕМ, ДМЕМ+F-12 (1:1), F-12 з додаванням ембріональної сироватки у кількості 10–20% (табл. 1).

Таблиця 1

Поживні середовища для культивування культури клітин з прісноводних молюсків

№	Поживне середовище	Ембріональна сироватка ВРХ	
1	ДМЕМ	10%	20%
2	ДМЕМ+F-12 (1:1)	10%	20%
3	F-12	10%	20%

Використовували комбінацію поживних середовищ з рН 7,0–7,4 та додавали антибіотики (10000 ОД/мл пеніциліну, 10 мг/мл стрептоміцину, 25 мг/мл амфотеріцину, гентаміцину сульфату 40 мг/л), флуконазол у кількості 100–130 мг/л.

Суспензію розливали у плашки для культивування культур клітин і інкубували в термостаті за температури +20, +25, +37°C. На четвертий день інкубації проводили заміну ростового поживного середовища на підтримуюче. На четвертий день перевіряли кількість живих клітин у камері Горяєва з використанням трипанового синього. Зміну середовища проводили кожні 3 дні.

Механічний метод. Відмінність попереднього методу полягає у застосуванні механічного впливу на експлантат з метою отримання завису культур клітин без використання 0,25% розчину трипсину. Черепашку моллюска обробляли 70% спиртовим розчином і поміщали в чашку Петрі із забуференим розчином із додаванням антибіотиків (10000 ОД/мл пеніциліну, 10 мг/мл стрептоміцину, 25 мг/мл амфотеріцину, гентаміцину сульфату 40 мг/л), флуконазолу в кількості 100–130 мг/л. Тканину ноги моллюска розрізали на дрібні шматки діаметром 0,2 см та двічі промивали забуференим розчином з антибіотиками. Шматочки тканини помістили у плашки для культивування культур клітин із ростовим поживним середовищем, яке описано вище у статті. Культивування культури проводили за температури +20, +25, +37°C в термостаті. На 4 день перевіряли кількість живих клітин із використанням трипанового синього і змінювали ростове поживне середовище на підтримуюче. Зміну середовища проводили кожні 3 доби.

Комбінований метод. Поверхню моллюска обробляли 70% спиртом і поміщали в чашку Петрі. Відділяли від мантиї тканину ноги моллюска у чашці Петрі із забуференим розчином з антибіотиків (10000 ЕД/мл пеніциліну, 10 мг/мл стрептоміцину, 25 мг/мл амфотеріцину, гентаміцину сульфату 40 мг/л). Тканину ноги моллюска розрізали на дрібні шматки діаметром 0,2 см та двічі промивали ЗБР з антибіотиками. Тканину поміщали в колбу з металічним магнітним стержнем, заливали 10 см³ теплою 0,25% розчину трипсину і залишали на електромагнітній мішалці на 10 хв. Потім першу клітинну суміш зливали та повторно заливали 10 см³ 0,25% розчином трипсину. Знову через 10 хвилин суміш клітин зливали у скляний посуд для культур клітин. Описані вище маніпуляції проводили 10 разів. Суміш клітин, яка була зібрана, фільтрували через декілька шарів стерильної марлі у центрифужні пробірки. Центрифугували протягом 5 хвилин при 1500 об./хв, видаляли надосадову рідину тричі. Після видалення надосадової рідини, підраховували кількість клітин і доводили концентрацію до 10⁵ клітин на 1 см³ поживними середовищами, які описані вище.

Суспензію клітин у поживному середовищі розливали у чашки Петрі і поміщали в термостат за температури +20 до +37°C. На четвертий день проводили зміну ростового поживного середовища на підтримуюче з ембріональною сироваткою 10%. На четвертий день перевіряли кількість живих

клітин з використанням трипанового синього. Зміну середовища проводили кожні 3 доби.

Результати досліджень та їх обговорення. Спостереження за ростом в чашках Петрі проводили за допомогою інвертованого мікроскопу. Культивували первинну культуру з прісноводного молюска протягом 30 днів, при різних температурних режимах та поживних середовищах. Оптимальною температурою для культивування виявилась +20 і +25°C, за температури 37°C міграцію клітин прісноводного молюска не спостерігали.

Найбільший вихід клітин прісноводного молюска спостерігали при використанні комбінованого методу отримання первинної культури клітин та при використанні комбінації 2 поживних середовищ DMEM та F-12 (1:1) + 20% ембріональної сироватки ВРХ. Під час експерименту було виявлено, що до поживного середовища для культивування необхідно додавати 20% сироватки, яка є джерелом ростових факторів, гормонів для ростового середовища. При використанні поживних середовищ DMEM та F-12, та 20% ембріональної сироватки ВРХ кількість клітин прісноводного молюска була менша на 30% порівняно з комбінованим поживним середовищем. Також при порівнянні 3 методів отримання первинної культури: ферментативного, механічного та комбінації обох методів, вихід клітин більше, ніж на 20%, було отримано при комбінації обох методів.

Через 24 години після інкубування культури спостерігали інтенсивну міграцію клітин, а саме: фібробластоподібні клітини, великі клітини Лейдіга, клітини гемолімфи та епітеліальні клітини. Міграція клітин проходила інтенсивно в перший тиждень культивування. Через 6 діб культивування первинної культури були помічені тільки епітеліальні клітини. З 14 доби культивування інтенсивність падала, більшість епітеліальних клітин відокремлювалась від пластика. Епітеліальні клітини маленькі за розміром та різної форми. Під час зміни поживного середовища через кожні 3 дні в культуральних плашках кількість клітин скорочувалась на 2–5%. На 20 добу кількість прикріплених клітин складала 50% від моношару, який ми спостерігали в першу добу. Чисельність клітинної популяції скорочувалась до 30 доби.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Встановлено, що використання комбінованого методу отримання первинної культури з прісноводного молюска давало на 20% більший вихід клітин порівняно з механічним та ферментативним методами.

2. Проведені нами дослідження доводять, що для культивування первинної культури з прісноводного молюска є придатною комбінація 2 поживних середовищ DMEM і F-12 (1:1) + 20% ембріональної сироватки ВРХ.

3. Оптимальною температурою для культивування виявилась +20 і +25°C.

Перспективою подальших досліджень є отримання перещеплюваної культури клітин з прісноводного молюска. Отримана культура може бути використана в біотехнології, ветеринарній та гуманній медицині.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пастернак Р.К. Моллюски / Р.К. Пастернак // В кн.: Жизнь животных. М.: Просвещение, 1988. – С.447.
2. Полянский Ю.И. Двустворчатые моллюски / Ю.И. Полянский // В кн.: Зоология беспозвоночных. –М: Высшая школа, 1981. – С. 81–101.
3. Bank S.K. CaCO₃ crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel / S.K Bank., J.K. Jena and Janaki Ram // Science. – Vol. 86, No. 5. – 2004. – P. 730–733.
4. Gardner D.B. Long-term culture of freshwater mussel gill strips: use of serotonin to affect aseptic condition / D.B.Gardner, F.S.Turner, J.M Myers and et. // Biol. Bull. – 1991. Vol. 181. – P. 175–180.
5. Chen S.N. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding./ S.N. Chen, C.M. Wen // Methods Cell Sci. – 1999. – Vol. 21. – P. 183–192.
6. Frank U. In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians / U. Frank, C. Rabinowitz, B. Rinkevich // Marine Biol. – 1994. Vol 120. – P. 491–499.
7. Kawamura K. Establishment of cell lines from multipotent epithelial sheet in the budding tunicate, *Polyand-rocarpa misakiensis* / K. Kawamura, S. Fujiwara // Cell Structure and Function. – 1995. – Vol 20. – P. 97–106.
8. Rinkevich B. Acquiring embryo-derived cell cultures and aseptic metamorphosis of larvae from the colonial protochordate *Botryllus schlosseri* / B. Rinkevich, C. Rabinowitz // Inverteb. Reprod. Develop. – 1994. – Vol.25. – P. 59–72.

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК С ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ / Бабкин М.В., Гаврасьева Н.В., Кузьмич Г.С.

Описаны результаты получения с помощью разных методов первичной культуры пресноводного моллюска, класс двустворчатые (Bivalvia), а именно: ферментативного, механического и комбинации обоих методов. Исследовано, что большой выход клеток пресноводного моллюска наблюдали при использовании комбинированного метода получения первичной культуры клеток и использовании комбинации 2 питательных сред DMEM и F-12 (1:1) + 20% эмбриональной сыворотки КРС. Также подобрано оптимальную температуру +20 и +25°C для культивирования первичной культуры. При температуре +37°C миграцию клеток пресноводного моллюска не наблюдали. Полученная культура может быть использована в биотехнологии, ветеринарной и гуманной медицине.

Ключевые слова: пресноводные моллюски, первичная культура клеток, питательные среды для культивирования культур клеток.

OBTAINING OF PRIMARY CELL CULTURE FROM FRESHWATER MOLLUSCS / Babkin M.V., Gavrasieva N.V., Kyzmich G.S.

Introduction. Molluscs have the ability to regenerate, but they are not characteristic of malignant tumors. All attempts to get inoculated cell line cultures from the tissue of these animals were not successful. Perhaps the inability of the mollusk body cells segmentation in vitro and low «cancerous potential» causes failure to get finite cell lines.

The goal of the work The objective of our work was to obtain primary cell cultures of freshwater bivalves, class bivalves (Bivalvia).

Materials and methods. In the study we used three methods enzymatic, mechanical and combination of both methods to obtain primary cell cultures. Observation of cell culture was performed using inverted microscope.

Results of research and discussion. Primary culture of freshwater mollusk cultured for 30 days at different temperatures and media. The optimum temperature for cultivation was +20 and +25°C, at a temperature 37°C mollusc cell migration was observed. The largest freshwater molluscs cells output was observed when using the combined method of obtaining primary culture cells. Also, it was observed by using a combination of two culture mediums DMEM and F-12 (1:1) +20% fetal bovine serum.

Conclusions and prospects for further research. There were showed results of obtaining of primary freshwater clam culture class bivalves (*Bivalvia*) by different methods. We used enzymatic, mechanical methods and combination of both methods as well. It was found that the largest freshwater molluscs cells yield was observed using the combined method of obtaining primary culture cells. Also, it was observed when using a combination of two media DMEM and F-12 (1:1) +20% fetal bovine serum. In addition, the optimal temperature +20 and + 25°C was chosen for primary culture culturing.

The prospect of further research is to obtain passaged cell culture from freshwater molluscs. The obtained culture can be used in biotechnology, veterinary and humane medicine.

Keywords: freshwater molluscs, primary cell culture, nutrient media, culturing cell cultures.

REFERENCES

1. Pasternak, R.K. (1988). *Zhyzn zhyvotnykh [Life of animals]*. Moscow: Prosveshchenye [in Ukrainian].
2. Polyanskyy, YU.Y. (1981). *Zoolohyya bespozvonochnykh [Zoology of invertebrate]*. Moscow: Vysshaya shkola [in Ukrainian].
3. Bank, S.K., Jena, J.K., Ram, J. (2004). SaSO_3 crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel. *Science*, 86, No. 5, 730-733.
4. Gardner, D.V., Turner, F.S., Myers, J.M. et al. (1991). Long-term culture of freshwater mussel gill strips: use of serotonin to affect aseptic condition. *Biol. Bull.*, 181, 175-180.
5. Chen, S.N., Wen, C.M. (1999). Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding. *Methods Cell Sci.*, 21, 183-192.
6. Frank, U., Rabinowitz, C., & Rinkevich, B. (1994). In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. *Marine Biol.*, 120, 491-499.
7. Kawamura, K., Fujiwara, S. (1995). Establishment of cell lines from multipotent epithelial sheet in the budding tunicate, *Polyand -rocarpa misakiensis*. *Cell Structure and Function*, 20, 97-106.
8. Rinkevich, B., Rabinowitz, C. (1994). Acquiring embryo-derived cell cultures and aseptic metamorphosis of larvae from the colonial protochordate *Botryllus schlosseri*. *Inverteb. Reprod. Develop.*, 25, 59-72.