

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А. А. Лукашевич, Е. С. Покрова, А. Г. Зинкевич, А. А. Жизневская

lukashevichalesya@gmail.com;

Научный руководитель – Е. Г. Веремеенко, кандидат биологических наук, доцент

Важным свойством любого противоопухолевого препарата является его безопасность для нормальных клеток. В отличие от малигнизированных, культуры нормальных клеток плохо поддаются субкультивированию, что приводит к необходимости использования первичных культур. В данной работе были получены первичные культуры клеток печени, кожи, спинного и костного мозга грызунов, а также доказана эффективность использования культуральной жидкости для стимуляции вхождения клеток в культуру.

Ключевые слова: первичные культуры; культивирование животных клеток; тестирование противораковых препаратов.

ВВЕДЕНИЕ

Первичная культура – это стадия культуры, полученная после выделения клеток из ткани до первого субкультивирования. Получение первичных культур осуществляется в 4 стадии: получение образца, выделение ткани, препарирование и(или) дезинтеграция, посев в культуральную посуду [1]. В данной работе были оптимизированы методики получения первичных культур клеток различных тканей грызунов. Полученные культуры клеток в дальнейшем будут использованы для тестирования биологической активности феназиновых соединений, как потенциальных противоопухолевых агентов [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

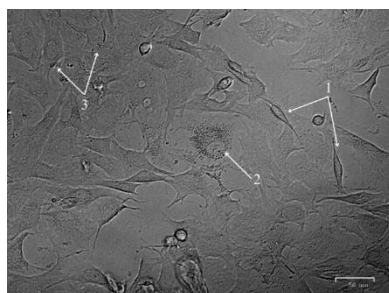
Для получения первичных культур клеток различных тканей использовалась методика первичных эксплантов с модификациями, а также метод ферментативной дезинтеграции [1]. Для стимуляции прикрепления клеток к поверхности культуральной посуды все флаконы предварительно обрабатывались 500 мкл телячьей эмбриональной сыворотки на протяжении ночи. Культивирование всех культур осуществлялось в стандартных условиях в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия), при 5% CO₂ и 37°C, в среде DMEM (Lonza, США) с 10% телячьей эмбриональной сывороткой и смесью антибиотиков в концентрации 10 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

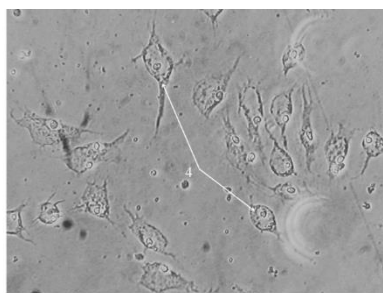
Культура печени мыши была получена методом первичного экспланта. Для этого печень была освобождена от капсулы, а паренхима органа была фрагментирована. В первичной культуре печени мыши были идентифицированы гепатоциты.

Первичная культура эпителиальных клеток кожи была получена посредством ферментативной дезинтеграции с использованием смеси ферментов коллагеназы и эластазы. За основу был взят протокол [1]. Для получения культуры был использован фрагмент кожи с ушей. Фрагмент был очищен, фрагментирован, отмыт в 70% этиловом спирте и в PBS буфере. Отмытые фрагменты были помещены в пробирку с 1,5 мл среды, в которую была добавлена смесь ферментов (200 ед./мл). Фрагменты ткани инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Далее в культуральный флакон переносили 500 мкл жидкости, а также несколько фрагментов ткани, оставшихся после дезинтеграции.

В первичной культуре клеток кожи крысы (рис. 1) были обнаружены фибробласты, макрофаги, кератиноциты и меланоциты.



a



б

1 – фибробласты; 2 – макрофаг; 3 – кератиноциты; 4 – меланоциты

a: Axiostar plus, A-Plan 32x/0.25 Ph 1 Var (ZEISS, Германия); *б*: ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD, США)

Рис. 2. Первичная культура клеток кожи крысы

Получение первичной культуры спинного мозга крысы осуществлялось методом первичного экспланта. Для получения культуры был использован позвоночник. Из него с помощью пинцета извлекали спинной мозг и фрагментировали. Полученные участки отделялись от оболочек. Внутреннее содержимое переносилось в культуральный флакон, предварительно инкубированный с 500 мкл сыворотки.

В первичной культуре клеток спинного мозга (рис 2) были идентифицированы нейроны и глиальные клетки.

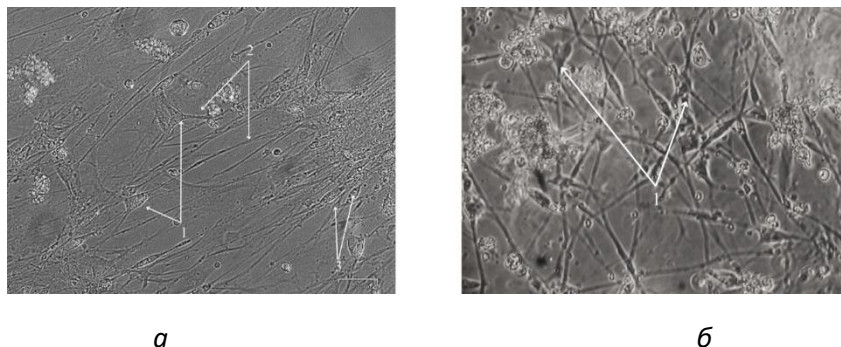


Рис. 2. Первичная культура клеток спинного мозга крысы:
а: ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD, США); *б:* Axiostar plus, A-Plan 32x/0.25 Ph 1 Var (ZEISS, Германия)
 1 – тела нейронов, 2 – отростки нейронов, 3 – глиальные клетки

Для получения первичной культуры клеток костного мозга были использованы бедренная и большеберцовая кости крысы. Эпифизы костей удаляли. Для удаления клеток крови полость каждой из костей промывали 1 мл среды RPMI с помощью стерильного шприца. Затем использовали 2 мл среды DMEM для извлечения клеток костного мозга. Культивирование осуществляли в стандартных условиях. Фрагменты костного мозга не удалялись с поверхности флакона на протяжении всего периода культивирования. В первичной культуре костного мозга были идентифицированы мезенхимальные клетки (рис. 3).

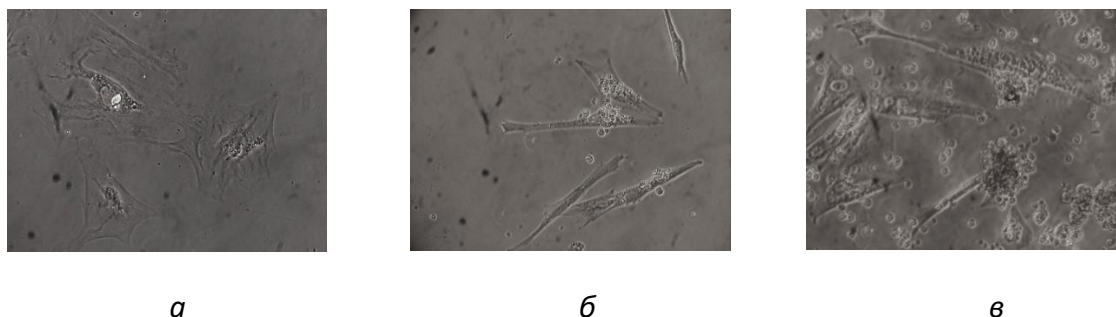


Рис. 3. Стимуляция вхождения в культуру клеток костного мозга крысы:
а – Первичная культура костного мозга на 3 месяце культивирования; *б* – Первичная культура костного мозга на 4 неделю культивирования без добавления культуральной жидкости; *в* – Первичная культура костного мозга на 4 неделю культивирования с добавлением культуральной жидкости
 Axiostar plus, A-Plan 32x/0.25 Ph 1 Var (ZEISS, Германия)

Также был проведен эксперимент по стимуляции вхождения в культуру клеток костного мозга. Для этого была использована 3-месячная первичная культура костного мозга крысы, а также получены 2 свежие первичные культуры. На 4 неделе культивирования в один из

культуральных флаконов было добавлено 20 мкл среды из флакона на 3 месяце культивирования. Второй флакон использовали в качестве контроля и введение в культуру проводили в стандартных условиях, описанных выше.

В сравнении с контрольной культурой, концентрация клеток в опытном флаконе была значительно выше (рис. 3). Существенная часть клеток в опытной культуре находилась в состоянии деления. Таким образом, можно сделать вывод об эффективности использования культуральной жидкости вошедших в культуру клеток для стимуляции вхождения в культуру свежеполученных первичных культур костного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были получены и успешно перевивались первичные культуры клеток печени мыши, кожи, спинного мозга и костного мозга крысы.

Была успешно проведена стимуляция входа в культуру клеток костного мозга крысы путем добавления культуральной жидкости из культуры на более поздних стадиях культивирования.

Приведенные методики могут быть использованы для получения первичных культур для последующего тестирования биологической активности ряда природных и синтетических соединений.

Выражаем благодарность доценту кафедры биохимии биологического факультета БГУ, к.б.н. Шолуху М.В. за предоставленный препарат смеси ферментов коллагеназы и эластазы.

Библиографические ссылки

1. *Фрешни, Р. Я.* Культура животных клеток / *Р. Я. Фрешни* - Москва: Лаборатория знаний, 2018. - 791 с. - ISBN 978-5-00101-557-4.
2. Phenazines and cancer / A. Cimmino [et al.] // Nat. Prod. Rep. – 2012. – Vol. 29, № 4. – P. 487.