

УДК 57.086.83

И.П. САВЧЕНКОВА*, Д.Г. КОРОВИНА, С.А. ВАСИЛЬЕВА

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко»,
Москва, 109428

e-mail: s-ip@mail.ru

Желатинизация как метод защиты клеток млекопитающих

Предложен метод «простой сэндвич» для заключения клеток млекопитающих в термолабильный желатиновый гель. В качестве объекта использовали шесть культур клеток различного происхождения. Суть метода заключается в предварительном внесении в емкость для хранения (пробирку) небольшого количества раствора желатина и создании условий для его быстрого затвердевания с целью предупреждения последующего оседания клеток на дно пробирки. Клетки помещали в питательную смесь с желатином (2%, 5 или 10% желатина в полнокомпонентной среде для выращивания) при температуре 37° и концентрации $3 \cdot 10^6$ кл/мл. При переносе такой смеси в окружающую среду с температурой 4° происходит быстрая желатинизация (затвердевание), или загустение суспензии. Клетки можно легко освободить от загустевшего матрикса путем нагревания материала до 37° и разбавления свежей средой. Было показано, что хранение клеток в 2%-ном растворе желатина над желатиновым гелем как при комнатной температуре, так и при охлаждении до 4° в течение 1 сут обеспечивает условия, при которых исследуемые клетки сохраняют жизнеспособность и пролиферативную активность. Представленные данные свидетельствуют, что заключение клеток в термолабильный гель посредством желатинизации может быть перспективным методом для их защиты, например, при транспортировке.

Ключевые слова: желатин, жизнеспособность клеток, затвердевание, метод переноса клеток, монослой клеток, термолабильный гель.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-31-37

Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных, которая входит в состав Российской коллекции клеточных культур позвоночных, имеет большое научное и народнохозяйственное значение как для исследований биологии клетки в культуре и вирусологии, так и для создания новых клеточных систем, кото-

рые продуцируют физиологически активные вещества (гормоны, ферменты, интерфероны, моноклональные антитела) в ходе биотехнологических процессов [1]. В связи с этим вопросы, связанные с сохранением и развитием коллекции культур клеток, являются актуальными.

При этом важное значение имеет разработка не только методов, позволяющих сохранить

Савченкова Ирина Петровна, Коровина Дарья Григорьевна, Васильева Светлана Александровна.

Список сокращений: ВКМ — внеклеточный матрикс; КМ — костный мозг; КРС — крупный рогатый скот; ММСК — мультипотентные мезенхимные стволовые клетки; ПЖТ — подкожная жировая ткань; СКПК — сыворотка крови плодов коровы.

* Автор для переписки.

жизнеспособность клеточного материала во время хранения, но и способов его транспортировки с целью защитить клетки от травм и колебаний температур, которые неизбежны при почтовых перевозках и пересылках, а также свести к минимуму риск утечек клеточного материала. Считается, что включение в полутвердые матрицы или капсулы позволяет защитить хрупкие клетки, например, гибридом, от механических воздействий при крупномасштабном культивировании [2]. Клетки могут быть иммобилизованы адсорбцией, ковалентным связыванием, перекрестным связыванием или заключением в полимерные матрицы. Для этого могут быть использованы различные материалы. Выбор конкретного материала зависит от предназначения иммобилизованных клеток [3]. Наиболее перспективны матрицы, изготовленные из нативных белков, которые являются основными компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ). Известно, что природные полимеры помимо высокой биосовместимости обладают способностью расщепляться на более простые соединения, которые выводятся из организма или принимают активное участие в клеточном биосинтезе.

В настоящий момент свойства некоторых полимеров реагировать на изменения температуры вызывают огромный интерес. Применение термочувствительных полимеров, которые при мягких условиях, благоприятных для живых клеток, могут формировать гели, в качестве подложки для культивирования позволяет снять с культурального пластика монослой клеток, не подвергая их обработке ферментами, а лишь изменив кратковременно температуру *in vitro* [4—6].

Целью наших исследований было определение условий, приемлемых для включения клеток млекопитающих разного происхождения в термочувствительный желатиновый гель и хранения в нем без существенных потерь в жизнеспособности и пролиферативных свойствах.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследований были использованы шесть культур клеток млекопитающих: мышинные эмбриональные фибробласты линий *3T3* и *STO*, эпителиальные клетки печени крысы *BRL*, мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), выделенные из костного мозга (КМ) и подкожно-жировой ткани (ПЖТ) крупного рогатого скота (КРС), а также ММСК, выделенные из ПЖТ человека. Все культуры клеток были взяты из коллекции лаборатории стволовых клеток ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко [7].

Для приготовления желатиновых гелей применяли сухой желатин типа В из кожи быка («ПанЭко», Россия). 2%-ный, 5%- и 10%-ный растворы лиофилизованного желатина готовили с использованием минимальной среды Игла MEM в модификации Дюльбекко (DMEM) («ПанЭко») при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (Biosan, Латвия) и нагревании до 50°. Полученные растворы стерилизовали автоклавированием и затем дополняли их 10% сыворотки крови плодов коров (СКПК) фирмы NuClone (США) и антибиотиками («ПанЭко», конечная концентрация пенициллина 50 ед/мл, стрептомицина — 50 мкг/мл). Готовые растворы хранили при 4°.

Внесение клеток в гели проводили, используя метод «простой сэндвич». Схема эксперимента представлена на рис. 1. Для этого в стерильные конические центрифужные пробирки емкостью 15 мл вносили по 250 мкл предварительно разогретого в термостате при 37° раствора желатина различной концентрации и помещали в холодильник (4°, 30 мин) для загустевания. Затем на образовавшийся гель наслаивали сверху 750 мкл смеси жидкого желатина с клетками. Одну часть экспериментальных пробирок помещали в холодильник, а другую хранили при комнатной температуре (22°) в течение 24 ч. Конечная концентрация всех клеток составляла $3,0 \cdot 10^6$ в 1 мл геля.

Морфологическую характеристику клеток в нативных препаратах и в препаратах, окрашенных по Романовскому-Гимзе, проводили визуально с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа фирмы Carl Zeiss и программного обеспечения AxioVisionRel. 4.8.

Жизнеспособность клеток оценивали по окраске трипановым синим (0,1 %-ный раствор) фирмы «ПанЭко».

Оценивали скорость образования монослоя клетками, подвергшимися желатинизации. Для этого отмытые от геля клетки переносили в стерильные чашки Петри диаметром 60 мм (SPL Lifescience, Корея) до конечной концентрации $2 \cdot 10^4$ кл/см² и культивировали до образования клеточного монослоя. Контролем служили культуры клеток, соответствующие каждой группе, посеянные в той же концентрации и не включенные в желатин.

Способность ММСК при индукции формировать клетки жировой и костной тканей после кратковременного хранения в термочувствительном геле желатина выполняли по методике, описанной нами ранее [8]. Остеогенной индукционной средой была среда DMEM с 10 % СКПК, дексаметазо-

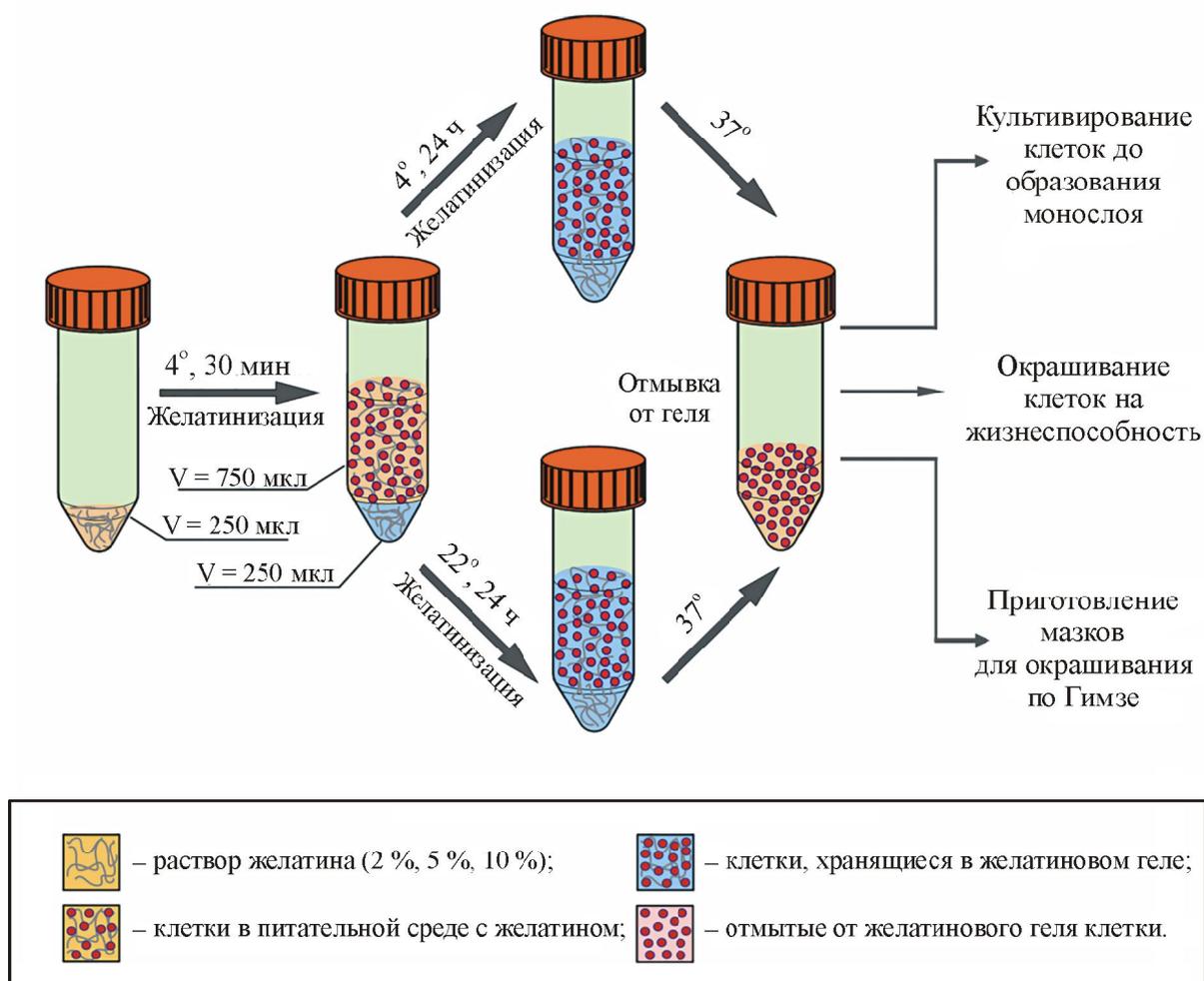


Рис. 1. Схема метода «простой сэндвич» для заключения клеток млекопитающих в термолabile желатиновый гель

Fig. 1. Scheme of *simple sandwich* for inclusion of mammalian cells in thermolabile gelatin gel

ном (10^{-7} М) (Sigma, США), β -глицерофосфатом (10 мМ) (Sigma) и аскорбиновой кислотой (0,2 мМ) (Sigma). Индукционную среду меняли каждые 4 сут в течение 21 сут. По окончании индукции клетки фиксировали ледяным метанолом (Macron Fine Chemicals, США) в течение 5—6 мин и окрашивали ализариновым красным S (Sigma-Aldrich). Адипогенной средой служила DMEM с 10 % СКПК, дексаметазоном (10^{-7} М) и инсулином (10^{-9} М) (Sigma). Через 3 нед клетки фиксировали и окрашивали жировым красным O (Sigma-Aldrich) в течение 10—15 мин. Затем их промывали и окрашивали гематоксилином («ПанЭко») в течение 1 мин.

Результаты обрабатывали статистически. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Данные считали достоверными при $p < 0,05$, где p — статистическая значимость для оценки достоверности различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительные результаты по использованию прямого способа смешивания клеточной суспензии с раствором желатина без создания дополнительного слоя гидрогеля, который ранее был описан и применен для пересылки диплоидных клеток человека и первичных клеток обезьяны [9], продемонстрировали, что клетки сразу после добавления суспензии к раствору желатина быстро оседают на дно пробирки в виде комка. Поэтому нами был предложен метод «простой сэндвич», суть которого заключалась во внесении клеточной суспензии на уже застывший слой небольшого количества желатина с целью предупреждения оседания клеток на дно пробирки. При этом клетки перед нанесением на плотный слой желатина смешивали с полнокомпонентной средой для выращивания, содержащей различную концентрацию желатина (2%, 5% или 10%) при температуре 37° и

концентрации клеточной суспензии $3 \cdot 10^6$ кл/мл. Если такую смесь выдерживать при температуре 4° хотя бы непродолжительное время, происходит быстрое желатинизирование (затвердевание), или загустение суспензии. В образовавшихся таким образом гелях тестируемые культуры клеток меняли морфологию, приобретая сферическую форму (данные не приведены).

Известно, что желатин является одним из нативных полимеров, который чувствителен к колебаниям температур: загустевает при температуре 20° и становится жидким при температуре 37° [10]. В наших опытах мы наблюдали затвердевание всех растворов желатина в различных его концентрациях в смеси с клетками (см. «Условия эксперимента») при температуре 22 — 24° . Нагревание материала до 37° и разбавление свежей средой позволяет легко освободить клетки от загустевшей матрицы.

Включенные в желатиновый гель клетки инкубировали при температуре 4° и 22° в течение 24 ч, затем освобождали от геля путем нагревания и окрашивали трипановым синим. Данные, приве-

денные в табл. 1, свидетельствуют о высокой жизнеспособности клеток после их включения в желатиновый гель в каждой из использованных концентраций и температур затвердевания геля.

Представляло интерес изучить пролиферативные свойства клеток в культуре после пребывания в геле. Клетки отмывали от геля и переносили в определенной концентрации (см. «Условия эксперимента») на культуральный пластик (чашки Петри) для дальнейшего культивирования. Сравнительный анализ времени образования клеточного монослоя в каждой из экспериментальных групп по сравнению с контрольной группой выявил некоторые их отличия (табл. 2). Инкубация культур клеток линий *3T3*, *BRL* и *STO* в 2%-ном геле желатина как при комнатной температуре, так и при охлаждении до 4° в течение 1 сут не оказывало влияния на скорость образования монослоя в экспериментальных группах по сравнению с контролем.

На рис. 2, а представлены клетки линии *STO* через 24 ч после их освобождения из геля и

Таблица 1
Table 1

Жизнеспособность клеток млекопитающих, %, после 24 ч инкубации в желатиновом геле различной концентрации
Vitality of mammalian cells, %, after 24 h of incubation in gelatin gel of various concentrations

Показатели Characteristics Культура клеток Cell culture	Температура и концентрация желатина при затвердевании Temperature and concentration of gelatin gel at solidification					
	4°			22°		
	2%	5%	10%	2%	5%	10%
<i>STO</i>	100±0,01	100±0,06	97,7±0,03	100±0,001	98,8±0,08	99±0,06
<i>3T3</i>	100±0,03	99,5±0,02	98±0,08	100±0,07	100±0,04	99,1±0,05
<i>BRL</i>	99,8±0,014	95,5±0,01	95,7±0,01	100±0,02	94,9±0,06	96,8±0,01
ММСК ПЖТ КРС ММСК, cattle subcutaneous adipose tissue	99,4±0,23	100±0,12	99±0,54	99,9±0,04	99,9±0,12	100±0,03
ММСК КМ КРС ММСК, cattle brain cell tissue	99,2±0,08	98,9±0,1	100±0,17	99,7±0,31	100±0,5	98,7±0,19
ММСК ПЖТ человека ММСК, human subcutaneous adipose tissue	100±0,12	100±0,4	99,9±0,28	100±0,1	98,6±0,34	99,8±0,23

Примечание: представлены средние значения и ошибка результатов трех независимых экспериментов.

Footnote: mean values and errors of three independent experiments are represented.

Время образования клеточного монослоя (сут) после инкубации клеток млекопитающих в желатиновом геле
Time of formation of monolayer, day, after mammalian cells incubation in gelatin gel

Контроль Control	Культура клеток Cell culture	Температура и концентрация желатина при затвердевании Temperature and concentration of gelatin at solidification					
		4°			22°		
		2%	5%	10%	2%	5%	10%
3	<i>STO</i>	3	4	8	3	6	8
4	<i>3T3</i>	4	4	8	3	5	8
5	<i>BRL</i>	6	7	12	5	8	10
7	ММСК ПЖТ КРС ММСК, cattle subcutaneous adipose tissue	6	5	5	6	5	5
7	ММСК КМ КРС ММСК, cattle brain cell tissue	5	4	5	5	4	4
7	ММСК ПЖТ человека ММСК, human subcutaneous adipose tissue	5	4	5	6	5	5

перевода в культуру. На 3-и сутки клетки формировали плотный монослой (см. рис. 2, *b*). Увеличение концентрации желатина до 10 % при хране-

нии этих клеток приводило к снижению скорости образования монослоя в экспериментальных группах в 2 раза. Наблюдали формирование скоплений

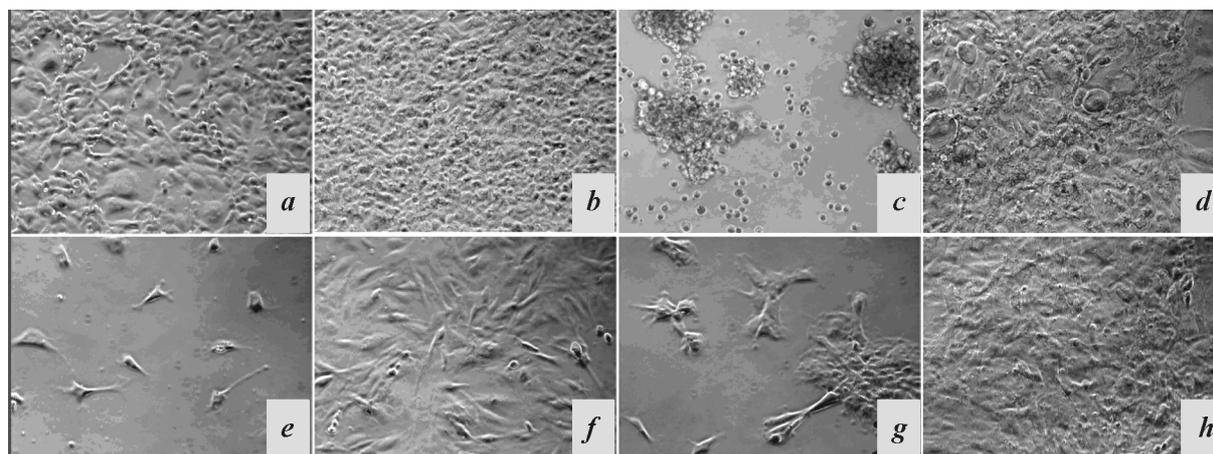


Рис. 2. Культурально-морфологические свойства клеток, инкубированных в геле различной концентрации при 4°, освобожденных из геля при нагревании и затем подвергнутых культивированию в течение 24 ч: *a* и *c* — линия *STO*, 2%-ный и 10%-ный гель, соответственно; *e* и *g* — ММСК КМ КРС, 2%-ный и 10%-ный гель, соответственно; *b* и *d* — образование монослоя клетками *STO* на 3-и сутки после освобождения из 2%-ного и 10%-ного геля, соответственно; *f* и *h* — ММСК КМ КРС на 7-е сутки после освобождения из 2%-ного и 10%-ного геля, соответственно. Увеличение (×10)—(×20)

Fig. 2. Cultural and morphological properties of cells incubated in gels of various concentrations at 4°C, released from the gel by heating and then subjected to culturing for 24 h: *a* and *c*, *STO* line, 2% and 10% gel, respectively; *e* and *g*, MMCK (cattle brain cells line); 2% and 10% gel, respectively; *b* and *d*, formation of monolayer by *STO* cells on 3rd day of culturing, 2% and 10% gel, respectively; *f* and *h*, formation of monolayer by MMCK (cattle brain cells line), 2% and 10% gel, respectively. Enlargement, (×10)—(×20)

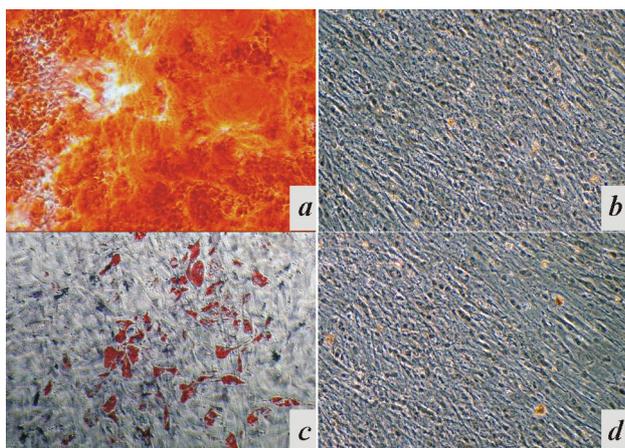


Рис. 3. Дифференцировка в остеогенном направлении линии ММСК, выделенных из подкожно-жировой ткани человека, после хранения при комнатной температуре в геле желатина (2%) (окрашивание ализариновым красным S) на 21-е сутки после индукции (а) и без индукции (б). Дифференцировка тех же клеток ММСК после хранения при 4° в желатиновом геле (2%) в адипогенном направлении (окрашивание жировым красным O) на 21-е сутки после индукции (с) и без индукции (д). Увеличение (×10)—(×20)

Fig. 3. Differentiation in osteoplastic direction of MMCK cell line isolated from human subcutaneous adipose tissue after storage in gelatin gel (2%) at room temperature (staining with Alizarin red S) on 21st day after induction (a) and without induction (b). Differentiation of the same MMCK cells in adipogenic direction after their storage at 4°C in gelatin gel (2%) (staining with Fatty red O) on 21st day after induction (c) or without induction (d). Enlargement, (×10)—(×20)

(комков) клеток (см. рис. 2, c), которые в дальнейшем прикреплялись к пластику, распластывались и образовывали монослой (см. рис. 2, d). Наоборот, у ММСК наблюдали незначительное увеличение скорости образования монослоя при хранении их в 10%-ном растворе желатина (см. рис. 2, сравни e и h). ММСК после хранения в желатиновых гелях сохраняли способность к формированию при индукции *in vitro* клеток жировой и костной тканей. Культивирование клеток в адипогенной среде приводило к формированию кластеров адипоцитов (рис. 3). Данные морфологии нашли подтверждение при обработке экспериментальных образцов специальным красителем (ализариновым красным S). При культивировании в среде, индуцирующей дифференцировку с образованием клеток костной ткани, наблюдали образование остеобластов и отложение кальция, которые выявлялись при окраске ализариновым красным S (см. рис. 3).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что предложенный метод желатинизации может быть использован для краткосрочного хранения перевиваемых культур клеток млекопитающих, в том числе ММСК, как при комнатной температуре, так и при охлаждении до 4°. Этот метод позволит защитить клетки от колебаний температур и риска потери клеточного материала при перевозке из лаборатории в лабораторию или при пересылке по почте.

Получено 28.03.16

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьяконов Л.П. Коллекция клеточных культур — фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии // *Ветеринарная патол.* — 2003. — № 1 (5). — С. 10—21.

Diakonov, L.P. Collection of cell cultures as a fundamental of investigations in cell biology and biotechnology // *Veterinarnaya Patologiya (Veterinary Pathology)*. — 2003. — N 1 (5). — P. 10—21.

2. Nilsson, K. Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules / K. Nilsson, W. Scheirer, O.W. Merten, L. Ostberg., E. Liehl, H.W. Katinger, K. Mosbach // *Nature (London)*. — 1983. — V. 14. — N 302. — P. 629—630.
3. Волкова И.М. Трехмерные матрицы природного и синтетического происхождения для клеточной биологии / И.М. Волкова, Д.Г. Коровина // *Биотехнология*. — 2015. — № 2. — С. 8—27.
4. Oie, Y. Development of a cell sheet transportation technique for regenerative medicine/ Y. Oie, T. Nozaki, H. Takayanagi, S. Hara, R. Hayashi, S. Takeda, K. Mori, N. Moriya, T. Soma, M. Tsujikawa, K. Saito, K. Nishida // *Tissue Eng. Part C. Methods*. — 2014. — V. 20. — N. 5. — P. 373—382.
5. Shimizu, T. Cell sheet-based tissue engineering for fabricating 3-dimensional heart tissues // *Circulation J.* — 2014. — V. 78. — P. 2594—2603.
6. Zhou, L. Cartilage engineering using chondrocyte cell sheets and its application in reconstruction of microtia / L. Zhou, R. Ding, B. Li, H. Han, H. Wang, G. Wang, B. Xu, S. Zhai, W. Wu // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* — 2015. — V. 8. — N 1. — P. 73—80.
7. Савченкова И.П., Волкова И.М., Викторова Е.В., Полякова М.В. Дополнительная информация к каталогу специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промышленных животных при ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (СХЖ РАСХН). — М.: ООО «Агентство творческих технологий», 2012. — 6 с.

Savchenkova, I.P., Volkova, I.M., Viktorova, E.V., and Poliakova, M.V. Additional information to the Catalog of Speciali-

zed Collection of Continuous Somatic Cell Cultures of Farm and Commercial Animals, the Kovalenko GNU VIEV. — Moscow: Agency for Creative Technologies, 2012. — 6 с.

8. *Савченкова И.П., Эрнст Л.К., Викторова Е.В.* Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков. — М.: Спутник, 2010. — 23 с.
Savchenkova, I.P., Ernst, L.K., and Viktorova, E.V. Methodical instructions on isolation of multipotent mesenchymal stem cells from adult mammal tissues, investigation of their properties and signs. — Moscow: Sputnik, 2010. — 23 p.
9. *Wilton-Smith, P.* Sending cells safely through the mail // Trends Biotechnol. — 1983. — V. 1. — P. 101.
10. *Akimoto, J.* Facile cell sheet manipulation and transplantation by using *in situ* gelation method // *J. Akimoto, A. Arauchi, M. Nakayama, R. Kanaya, Y. Iwase, S. Takagi, M. Yamato, T. Okano* // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. — 2014. — V. 102. — N 8. — P. 1659—1668.

I.P. SAVCHENKOVA*, D.G. KOROVINA,
and S.A. VASILIEVA

The Kovalenko All-Russian Research Institute for Experimental Veterinary, 109428, Moscow Russia

e-mail: s-ip@mail.ru

Gelatinization as a Method for Mammalian Cells Protection

A simple sandwich method for the mammalian cells inclusion into temperature-responsive gelatinous gel has been developed. Six different origin cell cultures were used as subjects. The essence of the method consists of the preliminary introduction in a medium or buffer of a small amount of gelatin solution with its subsequent fast hardening aiming at the prevention of cell precipitation on a test tube bottom. The cells ($3 \cdot 10^6$ cell/ml) were placed in a nutritious mix with gelatin (2%, 5 or 10% of gelatin in a full-component medium for cultivation) at a temperature of 37°C. The transfer of this mix into environment at 4°C resulted in its fast gelatinization (hardening) or solidification. Cells can be easily extracted from the thickened matrix by heating of the material up to 37°C and dilution by a fresh medium. It was shown that the storage of the tested cells in 2% gelatin hydrogel either at the room temperature or 4°C during 24 h provided conditions for the retention of their viability and proliferative activity. The obtained data testify that the cell inclusion into the temperature-responsive gel by gelatinization can be a perspective method for their protection during, for instance, transportation.

Key words: cell monolayer, cell transfer method, cell viability, gelatin, temperature-responsive gel, thickening.

Biotechnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 4, P. 31—37.

* Author for correspondence.