

УДОСКОНАЛЕННЯ УМОВ І СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ТОТИПОТЕНТНИХ КЛІТИН МИШЕЙ

М.І. Яковлєва, О.В. Щербак
Інститут тваринництва УААН

У статті розглянуті деякі аспекти розвитку ранніх ембріонів миші у різних системах культивування. Також наведені результати досліджень по формуванню моношару ембріональних фібробластів миші в залежності від умов отримання ембріонального матеріалу та складу культурального середовища

ембріони, ембріональні стовбурові клітини, клітини внутрішньоклітинної маси, фідерний моношар, ембріональні фібробласти миші

Прогрес у сучасних біотехнологіях базується в основному на наукових досягненнях біотехнології відтворення та на відкриттях, що були зроблені останнього часу в галузі молекулярної генетики та молекулярної біології. Так, одним із біотехнологічних напрямків є трансформація зародків ссавців за допомогою методів трансгенезу. Об'єктом для генетичних маніпуляцій стають тотипотентні клітини, здатні до формування цілого організму. Серед тотипотентних клітин найбільш поширений інтерес викликають ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) завдяки їх здатності до диференціювання у різні типи тканин як *in vitro*, так *in vivo*. Вони мають необмежений проліферативний потенціал із зберіганням властивості тотипотентності на протязі багатьох пасажів[1].

Звичайним методом для отримання ЕСК є культивування інтактних бластоцист або клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) на фідерному моношарі соматичних клітин. Пасування ЕСК також проводять на фідерних моношарах. Фідерні моношари секретують цитокіни та ростові фактори, що й блокують апоптоз; запобігають прямому контакту клітин із адгезивною підложкою та блокують формування цитоскелету; приймають участь у формуванні імунологічного бар'єру [2]. Таким чином, фідер забезпечує підтримку виживання, недиференційованого стану та проліферації ЕСК при їх культивуванні та пасуванні.

Роботи по культивуванню ЕСК мишей проводяться давно. Однак і досі не встановлені оптимальні умови, необхідні для їх отримання та підтримки їх у культурі зі зберіганням тотипотентності.

Метою даної роботи було удосконалення умов і середовищ для отримання тотипотентних клітин мишей.

Матеріал і методика досліджень. Досліди проводили на ембріонах мишей лінії СВА.

Суперовуляцію самиць було індуковано ін'єкцією 5 МЕ ГСЖК та через 46-48 годин - ін'єкцією 5 МЕ ЛХГ. Час ін'єкції ЛХГ приймали за час

нуль. Через 90-92 години після ін'єкції ЛХГ самиць забивали. Зародки вимивали із рогів матки середовищем М2+БСА. Частину отриманих ембріонів переносили в краплі середовища М16+БСА об'ємом 50 мкл та культивували під мінеральним маслом в умовах 37⁰С та 5% CO₂ в атмосфері до їх виходу із зони пеллюцида. Потім ембріони, що вийшли із зони пеллюцида, вносили до середовища ДМЕМ з додаванням 10% ФСТ та антибіотика (10 мкл/мл гентаміцину). Культивування проводили в краплях об'ємом 50 мкл під мінеральним маслом в умовах 37⁰С та 5% CO₂ в атмосфері. Зміну середовища на свіже проводили кожної доби [3].

Частину зародків, що було вимито із рогів матки, одразу вносили до середовища ДМЕМ з додаванням 10% ФСТ та антибіотика. Культивування проводили в краплях середовища об'ємом 50 мкл під мінеральним маслом в умовах 37⁰С та 5% CO₂ в атмосфері. Зміну середовища на свіже проводили кожної доби.

Ембріональні фібробласти миші отримували із зародків на стадії 12,5 – 14,5 доби. Плоди вносили до середовища РВ1 [3], видаляли голову, кінцівки та кров'яні скупчення. Потім ембріони вміщували до чистого середовища РВ1 та роздроблювали механічним шляхом. Після цього частину отриманого ембріонального матеріалу вносили в чашки Петрі із культуральним середовищем із розрахунку 1 частина отриманого матеріалу: 2 частини середовища. Культивування проводили в умовах 37⁰С та 5% CO₂ в атмосфері. Другу частину отриманого механічним шляхом ембріонального матеріалу інкубували у розчині трипсину та ЕДТА (0,25% трипсин - 0,2% ЕДТА) на протязі 15 хвилин при 37⁰С. Отриману суспензію клітин висівали в чашки Петрі із культуральним середовищем. Кінцева концентрація клітин становила 4-5х 10⁵ клітин/мл. Культивування проводили в умовах 37⁰С та 5% CO₂ в атмосфері [4].

В обох випадках у якості культурального середовища використовували:

ДМЕМ + 10% ФСТ + антибіотик;

ДМЕМ + 10% ФСТ + 1 мг/мл глюкози + антибіотик[5];

ДМЕМ + 10% ФСТ + 1 мг/мл глютаміну + антибіотик[1];

ДМЕМ + 10% ФСТ + 1 мг/мл глюкози + 1 мг/мл глютаміну + антибіотик.

Зміну середовища на свіже проводили кожної доби. На 2 – 3 добу формувався моношар клітин, що пересівали на протязі 5 – 9 пасажів. Пасування проводили кожної доби в умовах 37⁰С та 5% CO₂ в атмосфері. Культивування та пасування проводили у середовищі ДМЕМ + 10% ФСТ + 1 мг/мл глюкози + 1 мг/мл глютаміну + антибіотик.

Результати та обговорення. Попередниками ЕСК є клітини внутрішньоклітинної маси бластоцисти. За літературними джерелами культивування преімплантаційних ембріонів *in vitro* з метою отримання клітин ВКМ проводять безпосередньо на культуральному пластику або на фідерному моношарі соматичних клітин[1, 3].

У першому випадку, як правило, проводять культивування ранніх ембріонів миші у середовищі М16+БСА до їх виходу із зони пеллюцида, а

потім переносять до більш складного середовища ДМЕМ + 10% ФСТ для утворення трофктодермальних виростів та формування горбика ВКМ [3].

У наших дослідженнях ми провели культивування ранніх ембріонів миші у 2-х культуральних системах: 1) культивування бластоцист миші в краплях середовища М16+БСА до їх виходу із зони пеллюцида з подальшим переносом бластоцист, що вилупилися, в краплі середовища ДМЕМ + 10% ФСТ; 2) культивування ранніх ембріонів одразу в краплях середовища ДМЕМ + 10% ФСТ. Розвиток ембріонів оцінювали за такими параметрами, як 1) кількість ембріонів, що вийшли із зони пеллюцида; 2) кількість прикріплених бластоцист, що вилупилися, до поверхні чашки Петрі; 3) кількість бластоцист, що утворили трофктодермальні вирости та горбик ВКМ.

Ми спостерігали розвиток ембріонів в обох системах. Так, після 28 –

1. Порівняльний аналіз розвитку преімплантаційних ембріонів миші у різних культуральних системах

Культуральна система *	Кількість ембріонів		
	всього отримано	вийшли із зони пеллюцида, шт./%	прикріпилися до поверхні чашки Петрі, шт. /%
М16+БСА	102	68 / 66,7	43 / 42,1
ДМЕМ + 10% ФСТ	98	73 / 74,5	47 / 48

**У жодній культуральній системі у ембріонів не виявлено розростання трофктодермальних виростів та горбиків.*

30 годин культивування ранніх ембріонів миші в краплях середовища М16+БСА із 102 отриманих зародків 68 (66,7%) вийшли із зони пеллюцида, у той час як із 98 зародків, що було перенесено одразу у середовище ДМЕМ+10% ФСТ, 73 (74,5%) вийшли із зони пеллюцида (табл.1).

Через 42–44 годин після початку культивування 43 (42,2%) бластоцисти першої

системи, що вилупилися, прикріплювалися до поверхні чашки Петрі, у той час як кількість прикріплених ембріонів другої системи культивування становила 47 (48%).

Статистична обробка отриманих даних показала, що різниця між обома запропонованими системами культивування ранніх ембріонів за такими параметрами, як кількість ембріонів, що вийшли із зони пеллюцида, та кількість прикріплених до поверхні чашки Петрі бластоцист є вірогідною. Рівень вірогідності становить 99,95%.

Таким чином, культивування ранніх ембріонів миші у середовищі ДМЕМ + 10% ФСТ без етапу культивування зародків у середовищі М16+БСА є більш ефективним, спрощеним та щадним і його може бути використано у подальших дослідженнях.

За літературними джерелами розростання трофктодермальних виростів та формування горбика ВКМ відбувається після прикріплення бластоцист, що вилупилися, до поверхні чашки Петрі із спеціальним покриттям (Falcon) [3]. У наших дослідженнях ми використовували такі чашки Петрі, але нами не спостерігалось розростання трофктодермальних виростів та формування горбика ВКМ. Отримані результати свідчать про необхідність

використання фідерних моношарів для подальшого розвитку ембріонів, що вийшли із зони пеллюцида.

Попередні дослідження свідчать, що різні типи фідерного моношару здійснюють різний вплив на розвиток культур бластоцист[1]. У якості фідера використовують такі моношари соматичних клітин як первинні епітеліальні фібробласти миші або кролів, первинні епітеліальні клітини рогів матки миші або кролів, клітини нирки ембріона свині, клітини трахеї ембріона корови та різні комбінації на основі цих клітин. Більшу кількість ЕС-подібних клітинних ліній тварин було отримано на фідерних моношарах первинних ембріональних фібробластів миші. При цьому існують два підходи до використання моношару. Перший підхід полягає у використанні існуючих переживаємих ліній мишачих ембріональних фібробластів: STO, NIH 3T3, 3T3 Balb/c[6]. Другий підхід полягає у виготовленні культури мишачих ембріональних фібробластів, їх використанні на протязі 7-10 пасажів із наступною зміною культури на нову[1].

Існуючі лінії ембріональних фібробластів не забезпечують у повному обсязі підтримки недиференційованого стану ЕС-подібних клітин, у деяких випадках сприяють дегенерації клітин ВКМ, у деяких випадках сповільнюють розвиток клітин ВКМ [7]. Тому перевага надається другому підходу отримання ембріональних фібробластів, при якому, навпаки, відзначають інгібування диференціювання клітин ВКМ та ЕСК [1].

Отримання культури ембріональних фібробластів миші пов'язано з деякими труднощами. Так, відзначають розбіжності в необхідності додавання до культурального середовища енергетичних добавок, таких як глюкоза та глютамін, та в методі дезагрегації ембріонального матеріалу, щодо необхідності етапу його трипсинізації [4].

У наших дослідженнях отримання ембріонального матеріалу проводили як за допомогою трипсинізації, так і без неї, а його культивування відбувалося у таких середовищах: 1) ДМЕМ + ФСТ + антибіотик; 2) ДМЕМ + 10% ФСТ + глюкоза + антибіотик; 3) ДМЕМ + 10% ФСТ + глютамін + антибіотик; 4) ДМЕМ + 10% ФСТ + глюкоза + глютамін + антибіотик.

Проведені нами експериментальні дослідження визначили наступні результати. Після механічної дезагрегації зародків відбувалося часткове прикріплення ембріонального матеріалу до поверхні чашки Петрі та незначна проліферація клітин у суспензії на протязі 7 діб. Однак формування моношару не спостерігалось у будь-якому використаному середовищі. Після обробки трипсином ембріонального матеріалу отримали суспензію клітин, які прикріплювалися до поверхні чашки Петрі через 1 добу культивування та проліферували у культурі на протязі 7 діб (табл.2).

Проліферацію клітин у культурі можна стимулювати додаванням до культурального середовища високоенергетичних речовин, таких як глюкоза та глютамін [5]. Проведені нами дослідження виявили, що без додавання енергетичних добавок відбувається лише незначна проліферація клітин, а формування моношару не відбувається.

2. Вплив умов отримання ембріонального матеріалу та складу культурального середовища на формування моношару первинних ембріональних фібробластів миші

Спосіб дезагрегації ембріонального матеріалу	Культуральне середовище			
	ДМЕМ +10% ФСТ	ДМЕМ+10% ФСТ+ глюкоза	ДМЕМ+10% ФСТ+глютамін	ДМЕМ+10% ФСТ+глюкоза+ глютамін
Механічна дезагрегація	—	—	—	—
Механічна дезагрегація та та трипсинізація	—	часткове	часткове	+

Додавання до середовища одного із енергетичних субстратів стимулює проліферацію клітин, однак формування моношару відбувається лише часткове, а після 7–8 діб культивування – зупинка у розвитку із відкріпленням клітин від поверхні чашки Петрі. При додаванні до середовища разом обох енергетичних речовин - і глюкози, і глютаміну – відбувається формування моношару на 2-3 добу культивування клітин, що пройшли обробку трипсином.

Отриману культуру клітин пересівали на протязі 7 – 9 пасажів. При щодобовому пасуванні у середовищі ДМЕМ + глюкоза + глютамін + 10% ФСТ клітини формували моношар, який використовували для виготовлення фідера та подальшого пересіву.

Таким чином, формування моношару первинних ембріональних фібробластів миші відбувається після дезагрегації ембріонального матеріалу за допомогою трипсинізації та подальшого культивування у середовищі ДМЕМ з додаванням разом таких високоенергетичних речовин, як глюкоза та глютамін.

Висновки. Проведені нами дослідження дають змогу зробити висновок, що для отримання тотипотентних клітин миші культивування ранніх ембріонів краще проводити в середовищі ДМЕМ+10% ФСТ до їх виходу із зони пеллюцида, з подальшим переносом на фідерний моношар. У якості фідерного моношару краще використовувати культуру первинних ембріональних фібробластів миші, що були отримані за допомогою трипсинізації ембріонального матеріалу з подальшого його культивування у середовищі ДМЕМ+10% ФСТ та додаванням одразу таких енергетичних речовин, як глюкоза та глютамін. Культура первинних ембріональних фібробластів миші, що отримана таким методом, залишається життєздатною на протязі 7-9 пасажів.

Бібліографічний список

1. Савченкова И.П., Сергеев Н.И., Айтбаев Н.Е. Сравнительный анализ развития преимплантационных эмбрионов кролика *in vitro* на различных монослоях соматических клеток //Цитология. -1994.-Т.36.- № 9/10.- С.955-959.
2. Репин В.С. Эмбриональная стволовая клетка (от фундаментальной биологии к медицине) //Успехи физиологических наук.–2001. Т.32.-№1.– С.3-18.

3. Биология развития млекопитающих. Методы: Пер. с англ. // Под ред. М.Манк. – М.: Мир. – 1990. – 406 с., ил.

4. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии // Киев. – “Урожай”. - 1990. – 152 с.

5. Wang W.L., Jiang H.S., Lu K.H., Gordon I. Effect of condition medium and glucose concentration on the in vitro development of early bovine embryos // Theriogenology. - 1990. - V.33. - №1.- P.343.

6. Anderson G.B. Isolation and use of embryonic stem cells from livestock species // Animal Biotechnology. - 1992. -V.3. - № 1. - P.165-175.

7. Evans M.J., Notarianni E., Laurie S., Moor R.M. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell blastocysts // Theriogenology. - 1990. - V.33. - №1. - P. 125-128.

В статье рассмотрены некоторые аспекты развития ранних эмбрионов мыши в разных системах культивирования. Также представлены результаты исследований по формированию монослоя эмбриональных фибробластов мыши в зависимости от условий получения эмбрионального материала и состава культуральной среды

The article deals with some aspects of early mouse embryos development in different culture systems. Also the influence of conditions of embryo material obtaining and culture system composition on mouse embryonic fibroblasts monolayer formation are presented