

Подбор условий культивирования клеток надпочечников взрослых крыс

Г.В. ДУДЕЦКАЯ, Г.А. БОЖОК, Т.П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Selection of Culturing Conditions for Cells of Adult Rat Adrenal Glands

G.V. DUDETSKAYA, G.A. BOZHOK, T.P. BONDARENKO

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Культивирование является одним из способов оценки жизнеспособности и функциональной активности как нативных, так и криоконсервированных клеток. Поэтому подбор оптимальных условий культивирования для нативных клеток является целесообразным.

Цель работы – сравнить эффективность использования различных подложек (покровное стекло, пластик или коллаген тип I) и сред культивирования различного состава. Суспензии клеток получали из надпочечников взрослых крыс. Жизнеспособность суспензии составила 90%. Средами для культивирования были: среда 199+5% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) (среда 1), среда 199+5% ЭТС+ФРН (фактор роста нервов) (среда 2), среда 199+10% ЭТС (среда 3), среда 199+15% ЭТС (среда 4).

При культивировании клеток на покровных стеклах состав среды не имел решающего значения, так как клетки не прикреплялись к стеклу и оставались в суспензии. В насадке при окрашивании трипановым синим определялись как жизнеспособные, так и мертвые клетки. При использовании пластиковой подложки и всех сред на 3-и сутки прикреплялось 70% клеток. Клетки были разных размеров, распределены по всей поверхности, имели округлую форму, подобную нативной суспензии, наблюдались агрегаты клеток. На 7-е сутки количество клеток сохранялось, также наблюдалось небольшое количество распластанных клеток. Однако уже на 11-е сутки при применении сред 1, 2 и 3 количество клеток значительно снизилось. В образцах, где была использована среда 4, клетки сохранялись прикрепленными и распластанными, тем не менее склонность к образованию монослоя не отмечалась. К 14-м суткам культивирования во всех образцах прослеживалась деградация клеток. Применение чашек Петри, покрытых коллагеном, показало, что на 3-и сутки культивирования было прикреплено 90% клеток при использовании всех сред культивирования. Липидо-содержащие клетки распределялись по всей поверхности, большая часть из них распластывалась. Также были клетки округлой и фибробластоподобной формы. К 7-м суткам культивирования в средах 2 и 4 местами наблюдалась тенденция к образованию монослоя. На 11-е сутки культивирования при использовании среды 1 клетки вновь стали округляться и их количество уменьшилось. При применении сред 2, 3 и 4 клетки образовывали небольшие участки монослоя. На 14-е сутки при использовании среды 1 на поверхности подложки сохранялись единичные клетки. При культивировании в среде 3 наряду с распластыванием у части клеток культуры наблюдались явления деградации. Применение сред 2 и 4 позволило получить наибольшее количество прикрепленных и распластанных клеток, а также сохранить участки монослоя. Установлено, что из 4-х апробированных вариантов сред наиболее эффективными оказались среды 2 и 4 в сочетании с коллагеновой подложкой, которые способствовали переживанию клеток в культуре до 14 суток.

Culturing is one of the ways to assess the viability and functional activity of both native and cryopreserved cells. Therefore the selection of optimal culturing conditions for native cells is an expedient one.

The research aim was to compare the efficiency of the use of different substrates (cover glass, plastic or collagen type I) and culturing media of different composition. Cell suspension was derived from adult rat adrenal glands. Viability of the suspension was 90%. The media for culturing were as follows: medium 199 + 5% FCS (fetal calf serum) (medium 1), medium 199 + 5% FCS + NGF (nerve growth factor) (medium 2), medium 199 + 10% FCS (medium 3), medium 199 + 15% FCS (medium 4).

During cell culturing on cover glasses the medium composition had no decisive value, since the cells did not adhere to glass and remained in the suspension. When staining with trypan blue there were found both viable and dead cells in the supernatant. To the 3rd day 70% of cells were adhered when using plastic embedding in all the media. The cells were of different dimensions, distributed over the whole surface, were of round shape, similar to native suspension, there were observed cell aggregates. To the 7th day the number of cells was the same, and there was found a small amount of flattened cells too. However, to the 11th day when using the media 1, 2 and 3 the number of cells was significantly reduced. In the samples where the medium 4 was used the cells remained adhered and flattened, nevertheless, no tendency to monolayer formation was noted. To the 14th culturing day in all the samples there was observed the cell degradation. Use of Petri dishes coated with collagen has shown that to the 3rd day of culturing 90% of cells were adhered with applying all culturing media. Lipid-containing cells were distributed over the whole surface, the most of them was flattened. In addition there were the cells of round and fibroblast-like shapes. To the 7th culturing day when using the media 2 and 4 in some regions we observed the tendency of monolayer formation. To the 11th culturing day when using the medium 1 the cells again became round and their number decreased. When using media 2, 3 and 4 the cells formed small sites of monolayer. To the 14th day when using the medium 1 only single cells were preserved on the surface of the substrate. When using the medium 3 the cases of degradation were found along with flattening of the part of the culture cells. The using of media 2 and 4 allowed the obtaining of the highest amount of adhered and flattened cells, as well as preservation of monolayer sites. It has been established that among 4 tested variants of the media the most effective occurred to be the media 2 and 4 in combination with collagen embedding, contributing to the survival of cells in the culture up to 14 days.