ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ CAPROVINEA

НОВГОРОВОДА Инна Петровна, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста

ИОЛЧИЕВ Байлар Садрадин оглы, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста

КЛЕНОВИЦКИЙ Павел Михайлович, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста

ПРЫТКОВ Юрий Александрович, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста

Получение культур клеток лимфоцитов с целью изучения кариотипов животных является легкодоступным, относительно дешевым методом и позволяет получать результаты в короткие сроки. Для получения метафазных пластинок хромосом различных видов животных хорошего качества был оптимизирован привычный метод и внесены некоторые корректировки в протокол. При этом учитывались такие критерии, как использование различных сред для культивирования культуры клеток крови и возможность применения их у разных видов животных. Были отобраны образцы крови из яремной вены у коз ($n = 15$), овец ($n = 30$) и тура ($n = 1$). Культуру клеток культивировали в течение 72 ч, на 70 ч вносили колхицин в количестве 0,5 мкл/мл. В ходе исследований были использованы такие питательные среды, как DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) и RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) и митогены фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А в разной концентрации. Оптимальные параметры для приготовления метафазных пластинок с хорошим распределением хромосом были получены при использовании среды RPMI 1640 с добавлением сухого L-глутамин и одновременного использования таких митогенов, как конканавалин и ФГА. Количество пластинок хорошего качества при получении культуры клеток лимфоцитов в зависимости от вида животных колебалось у овец от 2,17 до 6,52 %, у коз – от 33,3 до 66,7 % и у тура достигало 100 %. Модифицированная методика позволила уменьшить потерю клеток в процессе приготовления препаратов хромосом. По результатам исследования, рост и деление клеток лимфоцитов, выделенных из периферической крови сельскохозяйственных животных зависит от состава среды и видовой особенности животных.

Введение. Цитогенетические методы исследования остаются актуальными для проведения кариологического анализа, необходимого для программ разведения животных [8]. Цитогенетические исследования направлены на изучение хромосомных изменений, происходящих в геноме животных и человека. Исследование хромосомного профиля сельскохозяйственных животных в раннем возрасте – необходимый метод для выявления фертильности, наличия хромосомных аномалий и т.д. Так называемый «цитогенетический скрининг» дает возможность не только выявлять, но и выбраковывать особей с хромосомными аномалиями, позволяющими снизить экономические потери [11]. Цитогенетические методы широко применяются в различных областях, как медицины, так и сельского хозяйства. Основные исследования цитогенетики млекопитающих были начаты в 1950-х годах. Они были направлены на разработку методики использования гипотонических растворов и их воздействия на клетки, различных фиксаторов, клеточных культур и митотических ингибиторов [12].

Для обеспечения культивирования клеток необходимо знать их особенность с учетом потребности различных физиологических функций. Многие питательные среды являются комплексными и могут применяться для различных целей [1].

К основным методам кариотипирования относят получение культуры клеток тканей [10], метод раздавленных хромосом [3] и суспензии клеток тканей, подвергающихся митозу [7], которые были разработаны для визуализации хромосом на разных стадиях развития животных.

Существует несколько протоколов получения культуры клеток хромосом (метафазных пластинок). В основном все они были разработаны изначально для человека. Затем эти протоколы были модифицированы для определенных видов животных и птиц. Совершенствование методов культивирования позволит решить многие вопросы изучения биологии клеток. Разработка питательных сред, необходимых для длительного культивирования клеток животных вне организма, является важным фактором при получении препаратов хромосом.

Цель нашего исследования направлена на сравнение использования питательных сред для культивирования клеток периферической крови у разных видов животных.

Методика исследований. Исследование проводили в лаборатории клеточной инженерии Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста. Объектом исследования служили препараты хромосом сельскохозяйственных животных. Опыт был проведен на козах ($n = 15$), овцах ($n = 30$) и туре ($n = 1$), содержащихся на физиологическом дворе ВИЖ.

Культуру клеток лимфоцитов получали по следующей прописи: отбирали кровь в вакуумные пробирки с гепарином в количестве 5–10 мл, выдерживали 30 мин при температуре +4 °С, центрифугировали 10 мин при 1000 об./мин. Готовили среду для дальнейшего культивирования, содержащую питательную среду RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) или DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), митоген фитогемагглютинин или конканавалин А и антибиотики в определенных концентрациях и объемах, затем добавляли 2 мл плазмы с лимфоцитами и ставили инкубировать на 72 ч в термостат при 37,6 °С. На 70 ч добавляли колхицин и по истечении 72 ч проводили гипотоническую обработку, фиксацию и нанесение полученной суспензии на стекла с последующим окрашиванием препаратов хромосом.

Основные критерии в исследованиях – выбор оптимальной среды для культивирования, ее количество, подбор используемых митогенов, а также изучение сравнительного аспекта используемых питательных сред в зависимости от вида животного. В эксперименте использовали несколько модификаций прописей протоколов питательных сред для постановки культуры клеток лимфоцитов, более подробно схема опыта представлена в табл. 1.

После каждого этапа раствор центрифугировали при 1000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Суспензию наносили на предметные стекла методом распыливания с высоты 40 см и после высушивания проводили окраску препаратов по методу Романовского – Гимза и Дифф – Квик. Для окрашивания по методу Романовского – Гимза препараты помещали в 2%-й раствор красителя на 20 мин. Процесс окрашивания с использованием набора Дифф – Квик состоит из четырех этапов, так как набор содержит четыре компонента.

Препараты в течение 2–3 мин фиксировали с помощью раствора № 1. Удаляли остатки, поста-

вив стекла вертикально на фильтровальную бумагу. После фиксации окрашивали красителем раствора № 2 (розовый), продолжительность окрашивания 3 мин, также удаляли остатки краски, поставив стекла в вертикальном положении на фильтровальную бумагу. Данную процедуру повторяли и с раствором № 3. После удаления избытка раствора № 3 слайды промывали в буфере и высушивали.

Препараты хромосом подсчитывали и идентифицировали с помощью программы VideoTest Карио 3.1. Фотосъемку проводили с использованием камеры Альтами 3М Пикс и микроскопа Альтами БИО1, изображения обрабатывали с помощью программы AltamiStudio 3.4.0. (увеличение ×100). Полученные данные обрабатывали при помощи компьютерной программы SPSS Statistics 23.0. Определяли сопряженности между используемыми компонентами и количеством полученных метафазных пластинок. Определяли распределение высококачественных метафазных пластинок в зависимости от состава культуральных сред и используемых митогенов.

Результаты исследований. В ходе исследований изучали рост и деление клеток в процессе культивирования лимфоцитов крови разных видов для получения хромосом. Данные результатов в зависимости от вида животных представлены в табл. 2.

Несмотря на то, что у овец было много препаратов без метафазных пластинок (82,6 %), количество пластинок хорошего качества при встречаемости 2 пластинок на стекле составило 6,52 %, в то время как 1, 4, 6, 13 и 25 пластинок соответственно достигало 2,17 %. В то же время у тура встречаемость на предметном стекле метафазных пластинок с частотой 4 пластинки составила 100 %, у коз 8 и 15 пластинок – соответственно 66,7 и 33,3 %.

Для анализа полученных данных была проведена оценка качества метафазных пластинок в

Таблица 1

Состав используемых в эксперименте сред

Состав среды	Среда RPMI 1640	Среда DMEM	Сыворотка BSA	Конканавалин	ФГА	Гентамицин
№ 1	5	–	1,0	55	–	40
№ 2	–	6	1,5	55	–	40
№ 3	5	–	1,0	–	100	40
№ 4	–	6	1,5	–	100	40
№ 5	5 С глутамином	–	1,0	35	–	40
№ 6	5	–	–	27,5	13,5	40
№ 7	5 С глутамином	–	–	55	50	40

Таблица 2

Результаты данных в зависимости от вида животных

Вид	Метафазные пластины, шт.									Всего, шт.
	0	1	2	4	6	8	13	15	25	
Коза	0	0	0	0	0	2	0	1	0	3
Овца	38	1	3	1	1	0	1	0	1	46
Тур	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

процентном соотношении (табл. 3). Количество препаратов хромосом хорошего качества составило 69,4 %. В ходе эксперимента при использовании различных сред для культивирования лимфоцитов крови встречались высококонденсированные хромосомы (30,6 %), клетки с плохой гипотонией (29,2 %) и клетки, находящиеся в цитоплазматической оболочке (13,9 %).

Данные полученных результатов в зависимости от используемой среды представлены на рис. 1, 2. Использование сред № 3, № 4 и № 5 не позволило получить метафазные пластинки. При исследовании среды № 1 было отмечено, что в 85,3 % не было получено хромосом, в то время как выявление 2, 4, 8, 11 и 13 метафазных пластинок на препаратах хорошего качества составило 2,9 % хромосом. Частота встречаемости хромосом с наложениями составила 11,1 %, препараты с 1 и 3 метафазными пластинками – 22,2 %, с 2 пластинками – 33,3 % и 14 пластинками – 11,1 %.

Исследование среды № 2 позволило получить 1, 2 и 4 метафазные пластинки – 11,1 % в каждом случае, 66,7 % приходилось на предметные стекла без хромосом. Наложения хромосом встречались на препаратах с 1, 3, 6, 12 и 21 метафазными пластинками (12,5 % на каждую). Процентное отношение предметных стекол, на которых не было хромосом, в этом случае составило 37,5 %.

При использовании сред № 6 и № 7 не было стекол без метафазных пластинок. В последнем случае было получено 8 хороших пластинок (100 %), а при применении среды № 6 – 2, 6 и 13 метафазных пластинок, что составило около 33,4 % в каждом случае.

Плохая гипотония встречалась при использовании сред № 2–5, при этом частота встречаемости метафазных пластинок с гипотонией при использовании среды № 1 при выявлении 1 и 14 пластинок составляла 14,3 % и 2 пластинок – 71,4 %; среды № 2 – 2 (25,0 %) и 6 пластинок (12,5 %); среды № 6 – 2 (66,7 %) и 3 пластинки (33,3 %). При использовании среды № 7 гипотония не наблюдалась.

Следует отметить, что клетки в цитоплазматической оболочке были выявлены только при применении сред № 1 и № 2. На долю с 1, 5, 6 и 7 метафазными пластинками в среде № 1 приходилось 25 %, в среде № 2 – с 1, 2, 8 и 15 метафазными пластинками на предметном стекле – 16,7 % и с 6 метафазными пластинками – 33,3 %.

Для поддержания роста и размножения клеток в зависимости от цели необходима определенная питательная среда, обеспечивающая клетки питанием и веществами, необходимыми для их жизнеспособности. Несмотря на разнообра-

зие сред, их выбор при культивировании имеет очень большое значение [2]. Периферические лимфоциты при культивировании представлены популяцией клеток, находящихся на пресинтетической стадии клеточного цикла, большинство из них находится в стадии покоя. Для клеточного деления в культуру клеток добавляют такие митогены, как конканавалин и ФГА.

В отличие от других культур клеток *in vitro* культивирование клеток лимфоцитов с целью кариотипирования не является таким обязательным к среде, хотя и имеет свои нюансы. Для культивирования лимфоцитов крови используют искусственные среды, которые сбалансированы по солевому составу и являются комплексными [18]. Искусственные среды обеспечивают как поддержание жизнеспособности, длительное культивирование, так и неограниченный рост культуры или других специализированных функций. Необходимо учитывать как особенности, так и функции компонентов, входящих в их состав [14, 15].

Как уже было отмечено ранее, для определенного типа клеток были разработаны наиболее подходящие питательные среды. Среда DMEM содержит практически в 2 раза больше аминокислот по концентрации и в 4 раза витаминов по сравнению с другими, а также дополнительные аминокислоты, позволяющие улучшать рост клеток. Изначально эту среду использовали для культур эмбриональных стволовых клеток мыши, позже стали применять и для других целей.

Среду RPMI 1640 применяют для лимфоцитов периферической крови. У этой среды очень большой спектр применения при культивировании клеток человека и животных. Она обеспечивает определенную ростовую активность клеток.

Аминокислота L-глутамин является очень важным компонентом при культивировании клеток. Добавление ее необходимо для повышения содержания в среде питательных компонентов. Одним из недостатков сред, содержащих L-глутамин, является его нестабильность. Через 21 день происходит его разложение [17], вследствие чего он оказывает токсическое действие на клетки. Исследователи используют глутамин в средах перед непосредственным их использованием.

Немаловажным фактором является применение питательных сред для различных видов животных. Нами проведены исследования на козах, овцах и туре. T.L. Silva et al. [16] использовали среду DMEM для получения препаратов хромосом черепах. Исследования этих ученых, направленных на

Таблица 3

Процентное соотношение метафазных пластин разного качества

Качество метафазных пластинок	Валидные		Пропущенные	
	n	%	n	%
Мет. пластинки хорошего качества	50	69,4	22	30,6
Конденсированные пластинки	22	30,6	50	69,4
Плохая гипотония	21	29,2	51	70,8
Хромосомы в цитоплазматической оболочке	10	13,9	62	86,1

Рис. 1. Диаграммы результатов использования сред:
А – хорошие метафазные пластинки; Б – хромосомы
в цитоплазматической оболочке;
В – конденсируемые хромосомы;
Г – плохая гипотония

Рис. 2. Изображения метафазных пластинок
в зависимости от результатов использования
питательных сред (ув. $\times 100$, имерсия):
А – хорошие метафазные пластинки;
Б – хромосомы в цитоплазматической оболочке;
В – конденсируемые хромосомы,
Г – плохая гипотония

оптимизирование условий культивирования, позволили получить хорошие результаты. Разработанный метод был лучше тех, которые применяли для млекопитающих и человека, и позволил получить метафазные пластинки хорошего качества.

V.T. Okomoda et al. [13] проводили исследования, направленные на оптимизацию протокола получения цитогенетических препаратов. Их исследования были связаны с подбором концентрации колхицина и экспозиции, а также использованием различных растворов для гипотонии у разных видов рыб.

P.U. Devi et al. [5] была изучена цитогенетическая характеристика макабубнарских коз с использованием культуральной среды RPMI 1640, обогащенной L-глутамином, а также фетальной бычьей сыворотки и ФГА, что позволило получить хорошие препараты. Исследователи в эксперименте на козах использовали 0,75%-й гипотонический раствор KCl (инкубирование в течение 30 мин). Все последующие манипуляции были проведены так же, как и в нашем исследовании. Клеточную суспензию наносили на чистые сухие стекла. G. Ciptadi et al. [4] был провели генетический анализ хромосом коз Сандуро по подобному протоколу получения метафазных пластинок.

M.E.A. El-Gawad et al. [6] проводили исследования, направленные на изучение кариотипирования трех пород египетских овец (Barki, Rahmani и Ossimi), с использованием метода [9] с небольшими изменениями. Эта методика была адаптирована с использованием питательной среды RPMI 1640 в количестве 5 мл и 2%-м ФГА в качестве митогена, на 72 ч культивирования добавляли колхицин на 30 мин. В качестве гипотонического раствора применяли 0,75%-й раствор KCl (инкубация 30 мин), клетки фиксировали также в свежем растворе охлажденного фиксатора (3 части метанола: 1 часть ледяной уксусной кислоты) и повторяли до тех пор, пока супернатант не станет прозрачным. Для нанесения суспензии на холодное предметное стекло был использован воздушно-сухой метод с последующим окрашиванием 20%-м раствором Гимзы в течение 30 мин.

Закключение. Полученные результаты показывают, что рост и деление клеток лимфоцитов, выделенных из периферической крови сельскохозяйственных животных, зависят от состава среды и видовой особенности животных.

В ходе исследований установлено, что из изучаемых сред лучшей была среда № 7. Она позволила получить наилучшие результаты с минимальной потерей хромосом во время приготовления препаратов.

Работа выполнена в рамках государственного задания при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований Минобрнауки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василевич Н.И., Честков В.В. Бессывороточные питательные среды: научные, этические и биотехнологические аспекты // Лаборатория и производство. – 2019. – № 6(10). – С. 64–71.
2. Трухан И.С. Питательная среда как ключевой фактор культивирования клеток млекопитающих // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. – № 12 (Ч. 1). – С. 165–172.
3. Armstrong S.J., Jones G.H. Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot., 2003, 54: 1–10.
4. Ciptadi G., Putri A.R.I., Rahayu S., Wahjuningsih S. et al. phenotypic and genetic character variations of a new breed of genetic resource of Senduro Goat, Indonesia. – URL: <https://doi.org/10.1063/1.5061916>.

5. Devi P.U., Gupta B.R., Devi K.S., Lakshmi K.D. Cytogenetic characterization of Mahabubnagar goats // *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*, 2011, Vol. 7 (6), P. 268–276.
 6. El-Gawad M.E.A., El-Itriby H.A., Sobhy H.M. and Hussein E.H.A. FISH-mapping and standard GTG-banding karyotype of three Egyptian sheep breeds // *J. Adv. Res.*, 2019, Vol. 7(4), P. 374–387.
 7. Henegariu O., Heerema N.A., Lowe Wright L., Bray-Ward P., Ward D.C., Vance G.H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing // *Cytometry*, 2001, Vol. 43, P. 101–109.
 8. Karami A., Araghi P.E., Syed M.A., Wilson S.P. Chromosome preparation in fish: effects of fish species and larval age // *Int. Aquat. Res.*, 2015, Vol. 7, P. 201–210.
 9. Kenthao A., Tanomtong A., Supanuam P., Pinyotepratan C. et al. Standardized karyotype and idiogram of mehsani buffaloes *Bubalus bubalis* by conventional staining, GTG-banding, CBG-banding and AG-NOR-banding techniques // *Buffalo Bull.*, 2012, Vol. 31(1), P. 2–39.
 10. Lomax B., Tang S., Separovic E., Phillips D. et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions // *Am J. Hum. Genet.*, 2001, Vol. 66, P. 1516–1521.
 11. McKinney S., Guerrero-Hernandez C., Guo L., Gibson M. et al. An adaptable chromosome preparation methodology for use in invertebrate research organisms // *BMC Biol.*, 2018, Vol. 16 (1), P. 25.
 12. Naha B.C., Prakesh C., Boro P. Review article application of cytogenetic techniques in livestock // *Int. J. Sci. Nat.*, 2016, Vol. 7(1), P. 30–33.
 13. Okomoda V.T., Koh I.C.C., Hassan A., Amornsakun T. et al. Optimization of the cytogenetic protocol for Pangasianodon hypophthalmus (Sauvage, 1878) and Clarias gariepinus (Burchell, 1822) // *Peer. J.*, 2018, Vol. 6, P. 5712.
 14. Oyeleye O.O., Ogundéji S.T., Ola S.I., Omitogun O.G. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. Biotechnol // *Mol. Biol. Rev.*, 2016, Vol. 11(2), P. 6–16.
 15. Rodriguez-Hernandez C.O., Torres-Garcia S.E., Olvera-Sandoval C., Ramirez-Castillo F.Y. et al. Cell culture: history, development and prospects // *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.*, 2014, Vol. 2(12), P. 188–200.
 16. Silva T.L., Silva M.I.A., Venancio L.P.R., Zago C.E.S. et al. Simple method for culture of peripheral blood lymphocytes of Testudinidae // *Genetics and Molecular Research.*, 2011, Vol. 10(4), P. 3020–3025.
 17. Swain P., Nanda P.K., Nayak S.K., Mishra S.S. Basic techniques and limitations in establishing cell culture: A mini review. *Adv. // Anim. Vet. Sci.*, 2014, Vol. 2, P. 1–10.
 18. Yao T., Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues // *Reprod. Med. Biol.*, 2017, Vol. 16(2), P. 99–117.
- Новгородова Инна Петровна**, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Россия.
- Иолчиев Байлар Садраддин оглы**, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Россия.
- Кленовицкий Павел Михайлович**, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Россия.
- Прытков Юрий Александрович**, канд. биол. наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Россия.
- 142132, г. Подольск, пос. Дубровицы, 60.
Тел.: (4967) 65-11-51.
- Ключевые слова:** хромосома; метафазные пластинки; культура клеток; животные; колхицин.

FEATURES OF OBTAINING METAPHASE CHROMOSOMES CAPROVINEA

Novgorodova Inna Petrovna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst. Russia.

Iolchiev Bailar Sadraddin ogly, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst. Russia.

Klenovitskiy Pavel Mikhailovich, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst. Russia.

Prytkov Yuriy Aleksandrovich, Candidate of Biological Sciences, Researcher, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst. Russia.

Keywords: chromosome; metaphase plates; cell culture; animals; colchicine.

Obtaining cultures of lymphocyte cells for studying of animal karyotypes is an easily accessible, relatively cheap method and allows obtaining results in a short time. We optimized the usual method with corrected some adjustments to the protocol to obtain metaphase plates of chromosomes of various animal species of good quality. At the same time, such criteria as the use of different media for the cultivation of blood cell cultures and the possibility of us-

ing them in different species of animals were taken into account. Blood samples were collected from the jugular vein in goats (n=15), sheep (n=30) and round (n=1). The cell culture was cultivated for 72 h; colchicine was added for 70 h in an amount of 0.5 µl / ml. The study used nutrient media such as DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) и RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) and mitogens phytohemagglutinin and Concanavalin A in different concentrations. Optimal parameters for the preparation of metaphase plates with good chromosome distribution were obtained using RPMI 1640 medium supplemented with dry L-glutamine and the simultaneous use of mitogens such as concanavalin and PHA (phytohemagglutinin). The number of plates of good quality when obtaining a culture of lymphocyte cells, depending on the type of animals, ranged from 2.17 to 6.52% in sheep, 33.3–66.7% in goats, and reached 100% in tur. The modified technique made it possible to reduce the loss of cells during the preparation of chromosome preparations. Thus, the results of our study show that the growth and division of lymphocyte cells isolated from the peripheral blood of farm animals depends on the composition of the environment and the species characteristics of the animals.