

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ РОСТА ТКАНЕЙ ПОЧЕК
ОТ ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *in vitro***

В.П. Пащенко*, Е.В. Тихонова*, А.Б. Гудков*/**

*Северный государственный медицинский университет
(г. Архангельск)

**Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова
(г. Архангельск)

Метод культивирования клеток и тканей *in vitro* широко используется для изучения структурных цитофизиологических свойств клеток организма. Перемещение фрагментов ткани в искусственные условия питательной среды позволяет оценить жизнеспособность тканей, способность клеток к регенерации и адаптации. В связи с этим в данной работе представлены результаты количественной оценки способности к росту *in vitro* фрагментов тканей почек, взятых у животных (мышей) различного возраста, при использовании метода множественных тканевых культур. Культивирование фрагментов тканей почек проводили в идентичных условиях, на поверхности перфорированных миллиметровых фильтров. Для однократной оценки роста культур использовали до 315 микрофрагментов ткани, что позволило более точно установить их количественные параметры. Оценку роста осуществляли путем фотометрирования с применением компьютерной программы ImageJ. Показано, что по мере старения происходит значительное уменьшение способности тканей к образованию растущих клеточных колоний и замедление их роста. Так, при сопоставлении тканей животных возрастом 30 и 140 дней количество выросших культур от более старых животных было меньше в 4,7 раза, а средняя площадь образовавшихся культур – в 1,8 раза; при сопоставлении культур тканей от животных возрастом 10 и 160 дней различие составляло в 15,7 и 4,3 раза соответственно. Проведенные исследования позволили уточнить выраженную зависимость роста эпителиальных клеток фрагментов тканей почек от возраста животных, проявляющуюся как в снижении образования количества культур, так и в задержке роста клеточной колонии.

Ключевые слова: *рост тканей, культура тканей, регенерация, старение.*

Зависимость роста тканей *in vitro* от возраста животных-доноров была установлена на самых ранних этапах развития метода ткане-

вых культур [1, с. 170–176; 2]. Высказывалось мнение, что зависимость роста клеток *in vitro* от возраста донора у фибробластов выражена

Ответственный за переписку: Пащенко Владимир Петрович, адрес: 163000, г. Архангельск, просп. Троицкий, д. 51; e-mail: paschenkow@mail.ru

Для цитирования: Пащенко В.П., Тихонова Е.В., Гудков А.Б. Количественные особенности роста тканей почек от животных различного возраста при культивировании *in vitro* // Журн. мед.-биол. исследований. 2019. Т. 7, № 1. С. 16–22. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.1.16

больше, чем у эпителиальных клеток [1, 3]. Это явление может быть обусловлено уменьшением в тканях организма активных органных стволовых клеток в процессе старения [3–6]. Показаны также возрастные изменения чувствительности тканей в отношении состава питательных сред, биологически активных веществ, лекарственных препаратов и др. [7–10].

При культивировании удается обнаружить потенциальные возможности клеток тканей к росту, регенерации, трансформации и приспособлению к новым условиям существования. Метод культивирования тканей применяют для оценки жизнеспособности тканей, используемых для трансплантации [8–10].

Между тем количественные особенности и закономерности роста тканей животных и человека различного происхождения *in vitro* изучены недостаточно. Цель нашего исследования – уточнить особенности роста эпителиальных клеток тканей почек, взятых у животных различного возраста, при культивировании *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании была применена методика множественных тканевых культур, которая позволяет более точно оценить количественные параметры роста клеток при культивировании [11].

В опытах использовали беспородных мышей. В первую группу наблюдений вошли животные массой тела 10 г (возраст 25–30 дней) и 25 г (возраст 140 дней); культивирование проводили в течение 3 дней. Во вторую группу вошли мыши массой 5 г (возраст 7–14 дней), 15 г (возраст 35–49 дней) и 27 г (возраст 140–200 дней); культивирование проводили в течение 4 дней. Возраст животных оценивали по массе тела.

Из эксперимента животных выводили в соответствии с предусмотренными правилами экспериментальных исследований (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях) путем эвтаназии под глубоким эфирным наркозом. Для культивирования были использованы ткани почек – как наиболее хорошо изученные, зона роста которых

состоит преимущественно из эпителиоподобных клеток. Почки животных извлекали и после удаления капсулы и фрагментов мозгового вещества измельчали ножницами в растворе Хенкса, содержащем по 200 ЕД пенициллина и стрептомицина, после чего фрагменты ткани переносили на перфорированные миллиметровые фильтры (Millipore, размер пор 0,22 мкм). Фрагменты ткани от каждого животного размещали на 5 миллиметровых фильтрах, которые затем помещали в отдельные пробирки. На каждом миллиметровом фильтре диаметром 12 мм размещали 3 микрофрагмента ткани размером 0,1–0,05 мм² [8].

Культивирование проводили в закрытых резиновыми пробками пробирках, содержащих 1 мл среды 199 с добавлением 5 %-й сыворотки рогатого скота и 100 ЕД пенициллина и стрептомицина, при температуре 38 °С в бактериологическом термостате с водяной рубашкой. Пробирки размещали в неподвижных штативах (ШСА-1) в наклонном положении. Культивирование тканей осуществляли в течение 3 и 4 дней в зависимости от цели исследования. При культивировании в таком режиме рост клеток, выселившихся из центрального эксплантата на поверхность миллиметрового фильтра, происходит преимущественно в виде монослоя эпителиоподобных клеток и отдельных фибробластоподобных клеток. Первые признаки образования зон роста вокруг фрагментов ткани наблюдаются через 48 ч культивирования. В дальнейшем зоны роста увеличиваются за счет митотического деления клеток в них, а также миграции клеток из центрального эксплантата. Вокруг фрагмента ткани образуется от 1 до 3–4 очагов роста, которые при дальнейшем культивировании могут сливаться.

После экспозиции в термостате культуры на фильтрах фиксировали в смеси Буэна и окрашивали гематоксилином Карацци и эозином. Влияние препарата на клетки оценивали по отношению числа выросших клеточных колоний к исходному числу эксплантированных фрагментов ткани (в процентах) и по площади зон роста культур, образовавшихся около эксплантирован-

ных фрагментов ткани в процессе культивирования. Площадь клеточной колонии определяли путем микрофотографирования с использованием микроскопа при увеличении $\times 100$ и компьютерной программы ImageJ [12, 13], площадь зоны роста выражали в условных единицах данной программы (18 626,8 усл. ед. = 0,16 мм²).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica 6. Для сопоставления параметров применяли непараметрический критерий Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. При идентичных условиях культивирования выявлены значительные различия в количестве образовавшихся колоний клеток (рис. 1) от культивируемых фрагментов

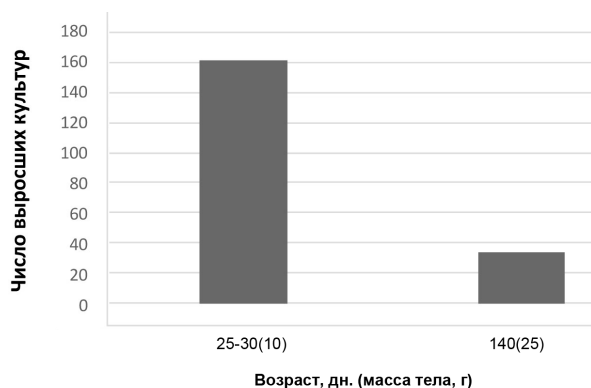


Рис. 1. Число выросших культур от исходного количества (315) фрагментов тканей почек мышей разного возраста (первая группа, культивирование в течение 3 дн.)

тканей почек животных первой группы различного возраста ($p < 0,05$): от молодых животных из 315 фрагментов ткани за 3 дня растущие колонии клеток образовались у 161 (51 %) фрагмента, тогда как от животных массой 25 г – только у 34 (10,8 %). Образовавшихся колоний клеток у более старых животных было в 4,7 раза меньше.

Суммарная общая площадь выросших культур от фрагментов тканей старых животных была меньше в 8,6 раз (табл. 1). Подобные значительные различия ($p < 0,05$) наблюдались и в среднем размере выросших клеточных культур. По сравнению с более молодыми животными, средний размер клеточных колоний у более старых был в 1,8 раза меньше. Несколько менее значительные различия выявлялись в максимальной площади колоний клеток – лишь на 28,6 % меньше (в 1,4 раза), чем в случае молодых животных ($p < 0,05$).

При культивировании фрагментов тканей почек от мышей второй группы (весом 5, 15 и 27 г) через 4 дня (в начальную фазу логарифмического роста культуры) в идентичных условиях также выявлена тенденция к снижению числа выросших культур и размеров клеточных колоний с увеличением возраста животных (рис. 2, табл. 2).

Доля выросших клеточных культур от исходного количества культивируемых фрагментов ткани составляла у животных: массой 5 г – 69,8 %; 15 г – 27,6 %; 27 г – 4,4 %. Число выросших культур у животных массой 15 г по сравнению с более молодыми (5 г) было в 2,6 раза меньше, а у животных массой 27 г – меньше в

Таблица 1

РОСТ КУЛЬТУР ОТ ФРАГМЕНТОВ ТКАНЕЙ ПОЧЕК МЫШЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА
(первая группа, культивирование в течение 3 дн.), усл. ед. (%)

Параметр	Возраст 25–30 дн. (масса тела 10 г)	Возраст 140 дн. (масса тела 25 г)
Общая площадь клеточных зон роста	43 44 688 (100)	507 273 (11,6)
Средняя площадь клеточной зоны роста	26 985 (100)	14 919 (55,2)
Минимальная площадь клеточной зоны роста	1 813 (100)	1 348 (74,4)
Максимальная площадь клеточной зоны роста	124 660 (100)	88 951 (71,4)

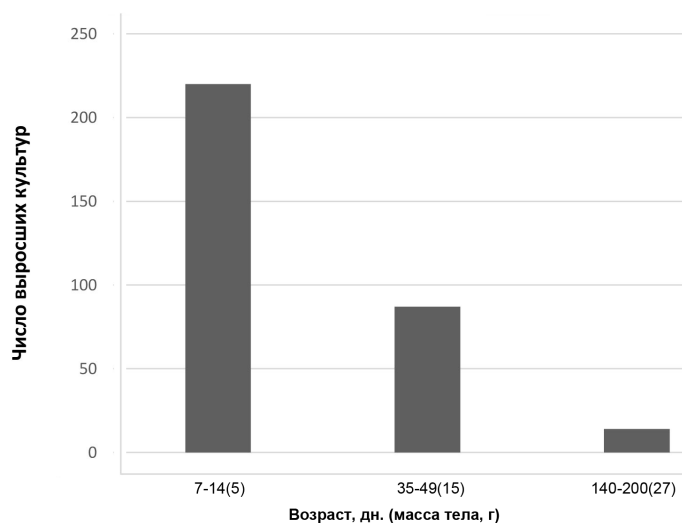


Рис. 2. Число выросших культур от исходного количества (315) фрагментов тканей почек мышей разного возраста (вторая группа, культивирование в течение 4 дн.)

Таблица 2

РОСТ КУЛЬТУР ОТ ФРАГМЕНТОВ ТКАНЕЙ ПОЧЕК МЫШЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА
(вторая группа, культивирование в течение 4 дн.), усл. ед. (%)

Параметр	Возраст 7–14 дн. (масса тела 5 г)	Возраст 35–49 дн. (масса тела 15 г)	Возраст 140–200 дн. (масса тела 27 г)
Общая площадь клеточных зон роста	9 672 912 (100)	2 211 260 (22,9)	140 417 (1,5)
Средняя площадь клеточной зоны роста	43 967,78 (100)	25 416 (57,8)	10 029 (22,8)
Минимальная площадь клеточной зоны роста	2 542 (100)	1 816 (71,4)	1 990 (78,3)
Максимальная площадь клеточной зоны роста	591 215 (100)	100 078 (78,3)	60 480 (10,2)

15,7 раза. Средний размер клеточных колоний у более старых животных по сравнению с более молодыми (5 г) был ниже соответственно в 1,8 и 4,3 раза. Максимальный размер выросших колоний у старых и молодых животных различался соответственно в 1,3 и 9,8 раза.

Обсуждение. В представленной работе проведен анализ роста культур от фрагментов тканей почек, взятых у животных (мышей) различного возраста, при культивировании. Процессы, происходящие в первичной тканевой культуре, имеют много общего с физиологическими механизмами регенерации ткани в организме [14].

Процесс культивирования тканей связан с состоянием как самой ткани, так и ее клеток, что обуславливает возможность адаптации их к новым условиям существования. Итоги культивирования зависят также от питательной среды, ее состава, подложки, на которой происходит образование колонии клеток [14, 15]. Все это позволяет рассматривать особенности роста клеток в культуре *in vitro* как интегративный показатель состояния клеток в организме (способность к адаптации, репаративной трансформации, влияние на клетки организма различных факторов окружающей среды) [16–19]. Использование

в этом случае метода множественных культур дает возможность более точно количественно оценить эти параметры.

Выявленная в работе четкая динамика угнетения способности тканей почек к росту при увеличении возраста животных может быть обусловлена неравномерным распределением в тканях клеток, которые сохраняют способность к делению и активной миграции, значительную часть их могут составлять органические стволовые клетки. Важно отметить, что, несмотря на возрастные особенности роста и развития организма в целом, рост тканей при культивировании снижается прямолинейно, достигая наименьшей величины в поздний

возрастной период. Проведенные исследования также показали, что обновление не только фибробластов, но и клеток эпителиальных тканей резко сокращается в возрастной динамике старения.

Таким образом, путем использования метода множественных тканевых культур удалось установить общую количественную динамику и характер изменений функционального состояния клеток тканей в процессе роста и старения организма. Показано последовательное, зависящее от возраста животных снижение способности тканей почек к образованию растущих клеточных структур (колоний клеток) и их росту *in vitro*.

Список литературы

1. Пол Д. Культура клеток и ткани. М.: Медгиз, 1963. 347 с.
2. Пинаев Г.П. Клеточные культуры в фундаментальных и прикладных исследованиях // Методы культивирования клеток. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. С. 7–22.
3. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., Кольцова А.М., Кропачева И.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Получение и характеристика неиммортизированных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста // Цитология. 2016. Т. 58, № 11. С. 850–864.
4. Hayflick L. The Limited *in vitro* Lifetime of Human Diploid Cell Strains // Exp. Cell Res. 1965. Vol. 37, № 3. P. 614–636.
5. Спасокукоцкий Ю.А., Барченко Л.И. Влияние биологически активных веществ на процессы старения // Биология старения. Л.: Наука, 1982. С. 586–600.
6. Николенко Н.С. Стволовые клетки взрослого организма в культуре // Методы культивирования клеток. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. С. 188–201.
7. Пинаев Г.П. Проблемы и перспективы развития клеточных технологий // Клеточные технологии для регенеративной медицины. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. С. 8–24.
8. Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Скорина А.Д., Смирнова С.А., Кудрявцев Б.Н. Метод получения изолированных клеток печени человека из материала прижизненных пункционных биопсий // Лаб. дело. 1983. № 9. С. 21–23.
9. Лопухин Ю.М., Коган Э.М. Критерии жизнеспособности органов и тканей перед трансплантацией. М.: Медицина, 1975. 280 с.
10. Хей Р. Сохранение и оценка качества клеток // Культура животных клеток: методы. М.: Мир, 1989. С. 108–165.
11. Устройство для посадки на подложку микрофрагментов биологических тканей: пат. СССР № 1785530, МПК С12М3/00 / В.П. Пашенко; заявитель и патентообладатель Арханг. гос. мед. ин-т. Заявка № 4898950 от 03.01.1991, опубл. 30.12.1992.
12. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
13. Noursadeghi M., Tsang J., Haustein T., Miller R.F., Chain B.M., Katz D.R. Quantitative Imaging Assay for NF-κB Nuclear Translocation in Primary Human Macrophages // J. Immunol. Methods. 2008. Vol. 329, № 1-2. P. 194–200. DOI: 10.1016/j.jim.2007.10.015
14. Новое в учении о регенерации / под ред. Л.Д. Лиознера. М.: Медицина, 1977. 358 с.

15. Пащенко В.П., Балашов В.К., Сивков А.Н., Пащенко А.В. Использование метода тканевых культур для оценки качества питьевой воды // Экология человека. 2003. № 3. С. 27–29.
16. Пащенко В.П., Гудков А.Б. Влияние питьевой воды «Акварель» на клетки ткани почек при культивировании *in vitro* // Экология человека. 2006. № 4 (прил. 2). С. 396.
17. Залкинд С.Я. Динамика цитологических изменений культивируемых вне организма клеток в норме и патологии // Вопросы цитологии, гистологии и эмбриологии. Рига, 1960. С. 15–20.
18. Залкинд С.Я., Цыпкин Л.Б. Некоторые вопросы дифференцировки и адаптации в клеточных культурах // Цитология. 1971. Т. 13, № 5. С. 547–563.
19. Онищенко Н.А. Клеточные технологии и современная медицина // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2004. № 4. С. 2–11.

References

1. Paul J. *Cell and Tissue Culture*. Edinburgh, 1960 (Russ. ed.: Pol D. *Kul'tura kletok i tkani*. Moscow, 1963. 347 p.).
2. Pinaev G.P. Kletochnye kul'tury v fundamental'nykh i prikladnykh issledovaniyakh [Cell Cultures in Basic and Applied Research]. *Metody kul'tivirovaniya kletok* [Cell Culture Methods]. St. Petersburg, 2008, pp. 7–22.
3. Krylova T.A., Musorina A.S., Zenin V.V., Kol'tsova A.M., Kropacheva I.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. Poluchenie i kharakteristika neimmortalizovannykh kletochnykh liniy dermal'nykh fibroblastov cheloveka, vydelennykh iz kozhi vek vzroslykh donorov raznogo vozrasta [Derivation and Characteristic of Non-Immortalized Cell Lines of Human Dermal Fibroblasts, Generated from Skin of the Eyelids of Adult Donors of Different Age]. *Tsitologiya*, 2016, vol. 58, no. 11, pp. 850–864.
4. Hayflick L. The Limited *in vitro* Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.*, 1965, vol. 37, no. 3, pp. 614–636.
5. Spasokukotskiy Yu.A., Barchenko L.I. Vliyanie biologicheskii aktivnykh veshchestv na protsessy stareniya [The Influence of Biologically Active Substances on the Processes of Ageing]. *Biologiya stareniya* [The Biology of Ageing]. Leningrad, 1982, pp. 586–600.
6. Nikolenko N.S. Stvolovye kletki vzroslogo organizma v kul'ture [Stem Cells of an Adult Body *in vitro*]. *Metody kul'tivirovaniya kletok* [Cell Culture Methods]. St. Petersburg, 2008, pp. 188–201.
7. Pinaev G.P. Problemy i perspektivy razvitiya kletochnykh tekhnologiy [Problems and Prospects of the Development of Cell Technologies]. *Kletochnye tekhnologii dlya regenerativnoy meditsiny* [Cell Technologies for Regenerative Medicine]. St. Petersburg, 2011, pp. 8–24.
8. Kudryavtseva M.V., Zavadsкая E.E., Skorina A.D., Smirnova S.A., Kudryavtsev B.N. Metod polucheniya izolirovannykh kletok pecheni cheloveka iz materiala prizhiznennykh punktsionnykh biopsiy [The Method of Obtaining Isolated Human Liver Cells from the Material of Intravital Needle Biopsies]. *Laboratornoe delo*, 1983, no. 9, pp. 21–23.
9. Lopukhin Yu.M., Kogan E.M. *Kriterii zhiznesposobnosti organov i tkaney pered transplantatsiyey* [Criteria of Viability of Organs and Tissues Prior to Transplantation]. Moscow, 1975. 280 p.
10. Khey R. Sokhraneniye i otsenka kachestva kletok [Preservation and Quality Assessment of Cells]. *Kul'tura zhivotnykh kletok: metody* [Culture of Animal Cells: Methods]. Moscow, 1989, pp. 108–165.
11. Pashchenko V.P. *Ustroystvo dlya posadki na podlozhku mikrofragmentov biologicheskikh tkaney* [Device for Planting Microfragments of Biological Tissues on a Substrate]. Patent USSR no. 1785530, 1991.
12. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, no. 7, pp. 671–675.
13. Noursadeghi M., Tsang J., Hausteин T., Miller R.F., Chain B.M., Katz D.R. Quantitative Imaging Assay for NF-κB Nuclear Translocation in Primary Human Macrophages. *J. Immunol. Methods*, 2008, vol. 329, no. 1-2, pp. 194–200. DOI: 10.1016/j.jim.2007.10.015
14. Liozner L.D. (ed.). *Novoe v uchenii o regeneratsii* [New Developments in the Theory of Regeneration]. Moscow, 1977. 358 p.
15. Pashchenko V.P., Balashov V.K., Sivkov A.N., Pashchenko A.V. Ispol'zovanie metoda tkanevykh kul'tur dlya otsenki kachestva pit'evoy vody [Using the Method of Tissue Cultures to Assess Drinking Water Quality]. *Ekologiya cheloveka*, 2003, no. 3, pp. 27–29.

16. Pashchenko V.P., Gudkov A.B. Vliyanie pit'evoy vody "Akvarel'" na kletki tkani poчек pri kul'tivirovani *in vitro* [The Influence of Akvarel Drinking Water on Kidney Cells Cultivated *in vitro*]. *Ekologiya cheloveka*, 2006, no. 4 (suppl. 2), p. 396.

17. Zalkind S.Ya. Dinamika tsitologicheskikh izmeneniy kul'tiviruemykh vne organizma kletok v norme i patologii [Dynamics of Cytological Changes in Normal and Pathological Cells Cultivated *in vitro*]. *Voprosy tsitologii, gistologii i embriologii* [Issues of Cytology, Histology and Embryology]. Riga, 1960, pp. 15–20.

18. Zalkind S.Ya., Tsypkin L.B. Nekotorye voprosy differentsirovki i adaptatsii v kletochnykh kul'turakh [Some Issues of Differentiation and Adaptation in Cell Cultures]. *Tsitologiya*, 1971, vol. 13, no. 5, pp. 547–563.

19. Onishchenko N.A. Kletochnye tekhnologii i sovremennaya meditsina [Cell Technologies and Modern Medicine]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*, 2004, no. 4, pp. 2–11.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.1.16

Vladimir P. Pashchenko*, **Elena V. Tikhonova***, **Andrey B. Gudkov****

*Northern State Medical University (Arkhangelsk, Russian Federation)

**Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov (Arkhangelsk, Russian Federation)

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF GROWTH OF KIDNEY TISSUES CULTIVATED *in vitro* FROM ANIMALS OF DIFFERENT AGES

The method of cell and tissue culture *in vitro* is widely used for the study of structural cytophysiological properties of body cells. Placing tissue fragments into artificial culture media allows one to assess the viability of tissues as well as the regenerative and adaptive ability of cells. This paper presents the results of quantitative assessments of *in vitro* growth capacity of kidney tissue fragments from animals (mice) of different ages, using the method of multiple tissue cultures. Renal tissue fragments were cultivated under identical conditions on the surface of perforated Millipore filters. For a single assessment of culture growth, up to 315 tissue microfragments were used, allowing us to perform a more accurate assessment of their quantitative parameters. The growth was estimated by photometry using the ImageJ computer program. The research revealed that with ageing the ability of tissues to form growing cell colonies decreases significantly and their growth slows down. The comparison of tissues of animals aged 30 and 140 days showed that 4.7 times less cultures were produced from older animals and their mean area was 1.8 times less than that of cultures from older animals; whereas in cultures from animals aged 10 and 160 days, the difference was 15.7 times and 4.3 times, respectively. The research helped to clarify the pronounced dependence of the growth of epithelial cells of kidney tissue fragments on the age of animals, which is manifested in the decreased number of formed cultures and inhibited growth of cell colonies.

Keywords: *tissue growth, tissue culture, regeneration, ageing.*

Поступила 19.07.2018

Принята 06.12.2018

Received 19 July 2018

Accepted 6 December 2018

Corresponding author: Vladimir Pashchenko, *address:* prosp. Troitskiy 51, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; *e-mail:* paschenkow@mail.ru

For citation: Pashchenko V.P., Tikhonova E.V., Gudkov A.B. Quantitative Characteristics of Growth of Kidney Tissues Cultivated *in vitro* from Animals of Different Ages. *Journal of Medical and Biological Research*, 2019, vol. 7, no. 1, pp. 16–22. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.1.16