

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК МАНТИИ МИДИИ *MYTILUS EDULIS* L.© М. А. Даугавет,<sup>1</sup> М. И. Блинова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: kabtanka@yandex.ru

До настоящего времени не существует постоянных линий клеток морских беспозвоночных. Поэтому в качестве модельных систем для различных экспериментов применяют первичные культуры клеток. В настоящей работе получена первичная культура клеток мантии мидии *Mytilus edulis* L. Клетки были выделены двумя методами — свободной миграции их из фрагмента ткани и ферментативной диссоциации ткани. Независимо от способа выделения клетки в первичной культуре оставались жизнеспособными до 22 мес. При культивировании клетки, перенесенные в новые культуральные сосуды, успешно прикреплялись к поверхности, сохраняя функциональную активность. Физиологическая активность клеток подтверждалась также формированием кристаллов, которые появлялись через 4—6 мес культивирования. Клетки, культивируемые длительное время, криоконсервировали с использованием 5%-ного DMSO. Выживаемость клеток после размораживания составляла не менее 50 %. Результаты работы показывают, что клетки мантии *M. edulis* остаются жизнеспособными и сохраняют физиологическую активность на протяжении длительного времени и могут сохраняться в атмосфере жидкого азота для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: морские беспозвоночные, моллюски, мантия, культивирование клеток, криоконсервация.

Принятые сокращения: CMFSS — искусственная морская вода, не содержащая кальция и магния, DMSO — диметилсульфоксид.

Клеточные культуры широко используются в различных областях биологии и медицины. Существует большое количество постоянных клеточных линий позвоночных (Prelle et al., 1999), клещей и насекомых (Mitsuhashi, 2002). Тем не менее до настоящего времени не удалось создать ни одной линии клеток морских беспозвоночных (Rinkevich, 1999). Несмотря на многочисленные попытки, сделанные в этом направлении, большинство культур морских беспозвоночных удается поддерживать лишь в течение короткого времени — от нескольких недель (Awaji, Suzuki, 1998; Sud et al., 2001; Quinn et al., 2009) до нескольких месяцев (Pan et al., 1996; Rinkevich et al., 1998; Chen, Wang, 1999; Pennec et al., 2002). В работе Франка с соавторами (Frank et al., 1994) клетки кишечнорастворимых культивировали на протяжении 1 года, однако это не привело к созданию постоянной клеточной линии.

В отсутствие постоянных клеточных линий в настоящий момент большинство исследований направлено на использование первичных культур. В частности, на клетках моллюсков исследовали механизмы биоминерализации (Sud et al., 2001; Barik et al., 2004; Endoh, Hasegawa, 2006; Gong et al., 2008a, 2008b; Auzoux-Bordenave, Domart-Coulon, 2010), дифференцировки эмбриональных клеток (Odintsova et al., 2010), инфицирования паразитическими организмами (Villena, 2003) и оценивали токсичность окружающей среды (Domart-Coulon et al., 2000; Le Pennec, Le Pennec, 2001, 2003; Pennec et al., 2002; Latire et al., 2012; Kwok et al., 2013).

Однако существует ряд недостатков использования первичных клеточных культур. В частности, клетки в первичных культурах не способны к неограниченному делению. За счет гибели части клеток их популяция постоянно сокращается. По этой причине первичные культуры могут служить лишь временной моделью для выполнения определенной задачи. Таким образом, проблема создания долгоживущей культуры клеток морских беспозвоночных остается актуальной.

В упомянутых выше и других работах источниками для выделения клеток моллюсков служили представители классов Bivalvia, Gastropoda и Cephalopoda (Odintsova, Khomenko, 1991; Renault et al., 1995; Lebel et al., 1996; Awaji, Suzuki, 1998; Buchanan et al., 1999; Domart-Coulon et al., 2000; Cheng et al., 2001; Sud et al., 2001; Pennec et al., 2002; Faucet et al., 2004; Suja, Dharmaraj, 2005; Rinkevich, 2005; Endoh, Hasegawa, 2006; Hanquet-Dufour et al., 2006; Pernice et al., 2007; Van der Merve et al., 2010; Latire et al., 2012). Однако разнообразие моллюсков, использованных в качестве источника культивируемых клеток, ограничивается в основном коммерчески значимыми видами. При этом чаще всего в литературе описывают культуры клеток моллюсков, обитающих в теплых морях, — *Haliotis midae* (van der Merve et al., 2010), *H. tuberculata* (Sud et al., 2001; Poncet et al., 2002), *Patinopecten yessoensis* (Endoh, Hasegawa, 2006), *Crassostrea virginica* (Buchanan et al., 1999), *C. gigas* (Domart-Coulon et al., 2000), в то время как животные, обитающие в северных морях, го-

раздо реже становились объектами исследований (Chen, Wang, 1999).

Источником клеток для культивирования служили различные ткани моллюска — как личинок (Odintsova, Khomenko, 1991; Odintsova et al., 2010; Van der Merwe et al., 2010), так и взрослого организма: жабры (Domart-Coulon et al., 2000), сердце (Renault et al., 1995; Le Marrec-Croq et al., 1998; Chen, Wang, 1999; Domart-Coulon et al., 2000; Pennec et al., 2002), гепатопанкреас (Le Pennec, Le Pennec, 2001), гемоциты (Brewster, Nicholson, 1979; Lebel et al., 1996; Latire et al., 2012) и мантия (Awaji, Suzuki, 1998; Barik et al., 2004; Suja, Dharmaraj, 2005; Endoh, Hasegawa, 2006). В случае мантии чаще всего использовали центральную ее часть, находящуюся за паллиальной линией. Периферическую часть мантии, контактирующую с краем раковины, использовали для выделения клеток только в одной работе (Sud et al., 2001). Тем не менее край мантии, контактирующий с раковинной, представляет большой интерес, так как выполняет сразу несколько функций.

Край мантии образован тремя складками. Внутренняя складка содержит мускулатуру (Richardson et al., 1981). Средняя складка мантии несет на своей поверхности щупальца и, по всей видимости, выполняет сенсорную функцию (Paillard, Le Pennec, 1993). Клетки борозды, разделяющей среднюю и наружную складки, секретируют органический материал самого наружного конхиолинового слоя раковины (Saleuddin, 1974; Richardson et al., 1981). Эпителий наружной складки, обращенный в сторону раковины, участвует в формировании призматического слоя, состоящего из органического матрикса и кристаллов карбоната кальция (Bubel, 1973; Richardson et al., 1981). Кроме того, край мантии моллюсков находится в постоянном контакте с внешней средой и может служить местом инвазии паразитических организмов (Allam et al., 2000). Показано, что мантия моллюска *Crassostrea gigas* является зоной синтеза нескольких антимикробных пептидов (Gonzalez et al., 2007; Schmitt et al., 2012). На личиночной стадии *Mytilus galloprovincialis* экспрессия генов, отвечающих за иммунный ответ, происходит именно в клетках края мантии (Balseiro et al., 2013). Таким образом, можно предполагать, что наряду с другими функциями мантия является барьером на пути патогенных организмов. Описанные выше физиологические особенности мантии могли бы дать определенные преимущества для поддержания ее клеток в культуре.

Цель данной работы — поиск метода длительного культивирования клеток морских беспозвоночных с сохранением их жизнеспособности и функциональной активности на примере культивирования клеток мантии двустворчатого моллюска *Mytilus edulis* (мидия съедобная), обитающего в Белом море. Для этого решали следующие задачи: 1) выбор условий культивирования — способа выделения клеток из ткани, температуры и способа посева клеток; 2) оценка функциональной активности клеток в процессе культивирования (способности к адгезии на поверхности культурального сосуда и появление кристаллов); 3) выбор режима криоконсервации клеток в атмосфере жидкого азота.

### Материал и методика

Объект. Мидии *M. edulis* L. были собраны в Белом море в марте 2010 г. и привезены в лабораторию Института цитологии РАН. До проведения эксперимента мол-

люски находились в лабораторных условиях на протяжении 3 мес. Животных содержали при 10 °С в искусственной морской воде (Sera, Германия) соленостью 25 ‰, соответствующей солености воды Белого моря, с постоянной аэрацией. Для выделения клеток были взяты 3 экземпляра с длиной раковины около 7 см.

Подготовка материала для культивирования. Раковины моллюсков отмывали в пресной воде и очищали от эпибионтов. В стерильных условиях раковины протирали спиртом и вскрывали. Край мантии с заднего конца моллюска отделяли стерильным скальпелем. Отделенный участок ткани вместе с периостракумом переносили в стерильную морскую воду CMFSS (см. ниже) и разрезали на 10 фрагментов длиной 1—2 мм. Полученные фрагменты ткани промывали последовательно в шести лунках со стерильной CMFSS, содержащей антибиотиками. 5 из 10 фрагментов мантии культивировали для получения клеток методом их миграции из ткани. Другие 5 фрагментов использовали для выделения клеток ферментативным способом.

Используемые реактивы. Искусственную морскую воду CMFSS, не содержащую кальция и магния, приготавливали, растворяя соли в деионизированной воде SuperQ: 25.5 г/л NaCl, 0.8 г/л KCl, 3.0 г/л Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.86 г/л HEPES (Sigma, США) и 2 N NaOH для достижения pH раствора 7.4. Раствор стерилизовали автоклавированием. Для культивирования клеток использовали питательную среду на основе L-15 (MP Biomedicals, США), содержащую 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и 0.6 мг/мл глутамин. Для соответствия осмотичности питательной среды осмотичности воды Белого моря к среде добавляли следующие соли: 18.05 г/л NaCl, 0.29 г/л KCl, 5.48 г/л MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 4.28 г/л MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 2.86 г/л HEPES (Sigma, США) и 1.2 г/л CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O. Устанавливали pH раствора 7.4—7.5 с помощью 2 N NaOH. После этого в стерильных условиях среду фильтровали через стерильный бактериальный фильтр с размером пор 0.22 мкм (Osmonics INC, США). К питательной среде и к CMFSS добавляли 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США), 2.5 мкг/мл амфотерицина (из маточного раствора 5 мг/мл; Синтез, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия). Для выделения и посева клеток использовали стерильный 0.1%-ный раствор лиофилизированной коллагеназы краба (Биолот, Россия). Клетки культивировали в стерильных одноразовых 4-, 24- и 96-луночных планшетах (Nunc, США) и чашках Петри диаметром 3.5 см (Nunc, США).

### Результаты

Выделение клеток. Клетки выделяли двумя различными способами — методом их миграции из культивируемого фрагмента ткани или ферментативным способом. Для выделения клеток методом миграции пять фрагментов мантии помещали в две лунки 4-луночного планшета, обозначив их *A* и *B* (см. таблицу), и в каждую добавляли по 500 мкл питательной среды на основе L-15 (см. раздел «Материал и методика»). В процессе культивирования этих фрагментов из них активно мигрировали клетки. Через 6 сут культивирования в обеих лунках клетки занимали всю поверхность. Часть из них была представлена в виде агрегатов, состоящих из большого числа клеток (рис. 1, *a*). По периферии лунки клетки были расположены реже, чем в центре (рис. 1, *б*). Мигри-

Схема культивирования клеток края мантии мидии

Способ выделения	Исходная лунка	1-й перенос клеток в новые лунки		2-й перенос клеток в новые лунки	
		время от начала культивирования, мес	новая лунка	время от начала культивирования, мес	новая лунка
Миграция из фрагмента ткани	<i>A</i>	6	<i>A1</i>	—	—
		19	<i>A2</i>	—	—
	<i>B</i>	12	<i>B1</i>	—	—
		12	<i>B2</i>	—	—
		17	<i>B3</i>	18	<i>B3.1</i>
17	<i>B4<sup>a</sup></i>	18	<i>B4.1</i>		
Ферментативная диссоциация ткани	<i>C</i>	Клетки не пересеивали			
	<i>D</i>	15	<i>D1<sup>a</sup></i>	18	<i>D1.1</i>
	<i>E</i>	6	<i>E1</i>	7	<i>E1.1</i>
				9	<i>E1.2</i>
		12	<i>E2</i>	—	—
		16	<i>E3</i>	—	—
		16	<i>E4</i>	—	—
		16	<i>E5</i>	—	—
		16	<i>E6</i>	—	—
		19	<i>E6</i>	—	—

Пр и м е ч а н и е. Клетки, находящиеся в суспензии, переносили с помощью пипетки в новые лунки; <sup>a</sup> клетки пересеивали с помощью коллагеназы.

ровавшие клетки содержали вместе с фрагментами мантии в течение 6 и 5 мес в этих же лунках *A* и *B*, после чего фрагменты ткани убирала.

Для выделения клеток ферментативным методом к пяти фрагментам мантии добавляли 1 мл 0.1%-ного раствора коллагеназы гидробионтов в CMFSS и осторожно встряхивали в течение 40 мин до образования мутного раствора. Полученную суспензию клеток фильтровали через газовый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 200 *g*. Супернатант удаляли, после чего осадок клеток ресуспендировали в питательной среде и высеивали в две лунки 4-луночного планшета (с обозначениями *C* и *D*; см. таблицу) и в одну чашку Петри диаметром 3.5 см, обозначив ее *E* (см. таблицу). Через 6 сут после посева часть клеток оказалась прикрепленной к поверхности лунки. Часть оставалась в виде

взвеси отдельных клеток или в виде небольших плавающих агрегатов из нескольких клеток. Внешний вид клеток был такой же, как у клеток, мигрировавших из фрагмента ткани (рис. 1). Морфологию клеток определяли по визуальным прижизненным наблюдениям за клетками под инвертированным микроскопом. Прикрепленные клетки через 6 сут после выделения во всех исходных лунках имели эпителиоподобную форму.

Условия культивирования. В течение всего эксперимента клетки содержали при 10 °С в планшетах, герметично закрытых с помощью парафильма. Когда в процессе культивирования питательная среда закислялась в результате жизнедеятельности клеток и приобретала желтый оттенок, в лунку добавляли порцию свежей среды или часть старой среды заменяли свежей, объем которой составлял от 200 мкл до 1.7 мл. Интервалы меж-

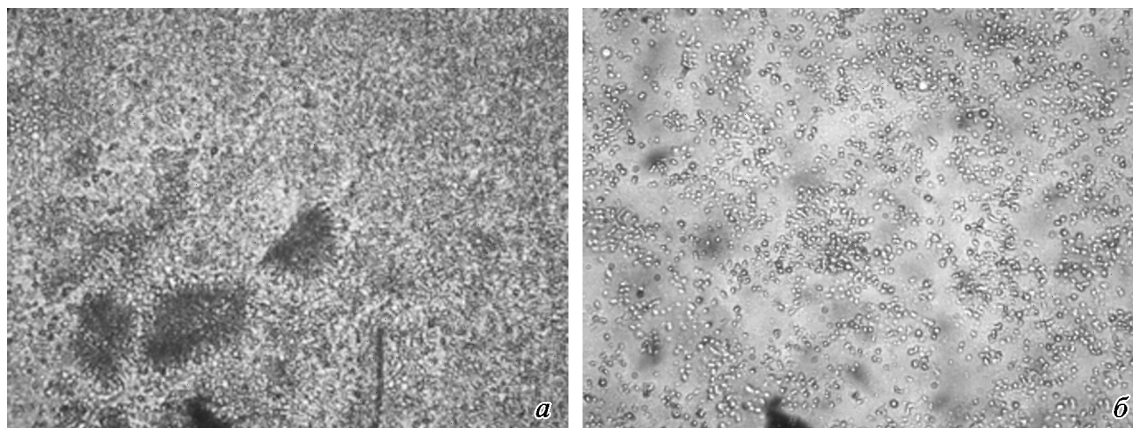


Рис. 1. Распределение клеток, мигрировавших из фрагментов мантии мидии, по поверхности лунки планшета через 6 сут культивирования.

*a* — участок в центре лунки, густо заселенный клетками; *b* — участок периферии, редко заселенный клетками. Об. 10×.



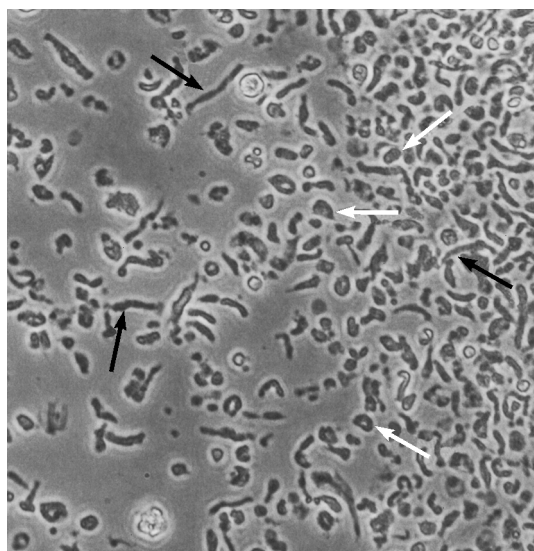


Рис. 2. Эпителиоподобные (белые стрелки) и фибробластоподобные (черные стрелки) клетки в лунке В через 5 мес культивирования.

Фазовый контраст, об. 20×.

ду добавлением среды составляли от 1 до 6 мес. В исходную лунку С свежую среду добавляли только один раз за все время культивирования.

Жизнеспособность клеток в процессе длительного культивирования. Клетки мантии культивировали в течение 22 мес. Через 5 мес во всех исходных лунках наряду с эпителиоподобными клетками можно было заметить появление фибробластоподобных клеток (рис. 2). Среди клеток, выделенных ферментативным способом, фибробластоподобные клетки встречались реже, чем среди клеток, полученных методом миграции. Остатки погибших клеток (cell debris) появлялись в исходных лунках только через 7—9 мес культивирования. При этом подавляющее большинство клеток оставалось жизнеспособным до конца эксперимента.

Во всех исходных лунках часть клеток находилась в прикрепленном состоянии, а часть присутствовала в виде взвеси. В лунке А находились клетки, выделенные из фрагмента ткани способом миграции. В этой лунке боль-

шое количество клеток присутствовало во взвеси. Для проверки способности этих клеток к адгезии (как критерия жизнеспособности) за все время культивирования их дважды отбирали из лунки А и переносили в новые лунки. Прикрепленные к поверхности клетки в этой лунке не пересевали ни разу за все время культивирования. К концу эксперимента, через 22 мес, в лунке А большая часть клеток оставалась в прикрепленном состоянии. В центре лунки клетки образовывали участок плотного монослоя (рис. 3, а). По мере удаления от центра к периферии лунки ее поверхность занимали все более разрозненные клетки. Но небольшое количество клеток все-таки присутствовало и во взвеси. Кроме того, создавалось впечатление, что клетки во взвеси находились в густом матриксе, поскольку при передвижении планшета по столику микроскопа они не могли свободно перемещаться в жидкости, а оставались неподвижными относительно дна лунки.

В лунке С находились клетки, выделенные ферментативным методом. Клетки из лунки С не отбирали и не пересевали в течение всего эксперимента. Через 22 мес культивирования подавляющее большинство клеток в этой лунке оставалось прикрепленным к поверхности. В центре лунки, как и в лунке А, тоже сформировался участок плотного монослоя (рис. 3, б).

Перенос суспензии клеток в новые лунки. Один из способов посева — это перенос в новые лунки клеток, находящихся во взвеси. Клетки забирали из лунки пипеткой вместе со средой для культивирования и переносили в новую лунку. Если суспензия клеток находилась в небольшом объеме среды, то в эту лунку добавляли свежую порцию среды в пределах 0.5—1 мл. Таким образом, в новой лунке было достаточное количество среды для дальнейшего культивирования клеток. В том случае, если суспензия клеток находилась в достаточном для культивирования объеме среды, свежую среду в эту лунку не добавляли. После того как клетки в новой лунке переходили в прикрепленное состояние, при необходимости среду заменяли частично или полностью.

Клетки из исходных лунок А, В и Е, находящиеся в суспензии, переносили в новые лунки, обозначая их соответственно А1 и А2, В1, В2 и В3, Е1—Е3 и т. д. В лунки А1 и А2 клетки переносили через 6 и 19 мес культивирования соответственно; в лунки В1—В3 — через 12 или 17 мес (см. таблицу). Из лунок, в которые была перенесена суспензия клеток, через некоторое время культивиро-

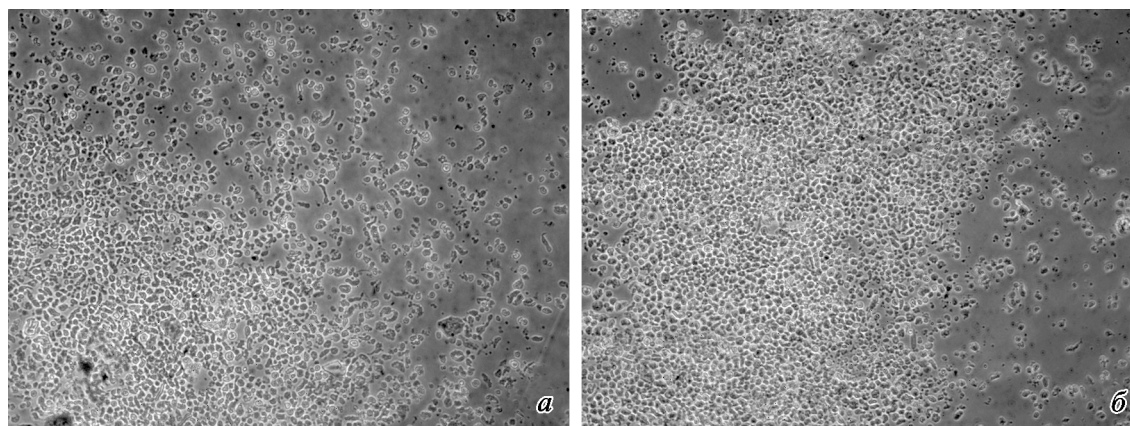


Рис. 3. Участок монослоя, образованный клетками мантии мидии, через 22 мес культивирования.

а — клетки, выделенные путем миграции (лунка А); б — клетки, выделенные ферментативным способом (лунка С). Фазовый контраст, об. 20×.

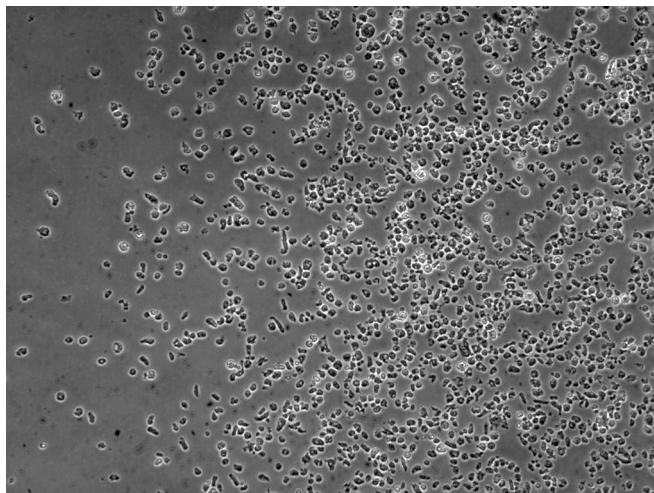


Рис. 4. Клетки мантии, прикрепленные к поверхности, в лунке D1 через 7 мес после посева.

Фазовый контраст, об. 20×.

вания в процессе замены среды также забирали часть клеток и переносили в новые лунки. Таким образом, из лунки B3 через 1 мес после посева клетки переносили в лунку B3.1 и из лунки E1 через 1 и 3 мес после посева — в лунки E1.1 и E1.2 соответственно (см. таблицу), таким образом как бы осуществлялся процесс пассирования клеточной популяции.

Через 2 сут после переноса все клетки в новых лунках прикреплялись к поверхности, т. е. были способны к адгезии. Обычно осевшие клетки формировали один густо заселенный многослойный участок (за исключением лунки A2, в которой клетки осели равномерно), а оставшаяся часть поверхности была занята разрозненными клетками. При длительном культивировании по центру или вдоль края лунок, как правило, сохранялось компактное скопление клеток. Все клетки оставались в прикрепленном состоянии вплоть до 10 мес после переноса — до начала процедуры криоконсервации. К этому моменту клетки формировали участки плотного монослоя.

Пересев клеток с помощью коллагеназы. Клетки, ранее выделенные из ткани ферментативным способом (лунка D), или клетки, выделенные методом миграции из фрагментов ткани (лунка B), в процессе культивирования находились в прикрепленном состоянии на поверхности лунки, но некоторое количество их — во взвеси. Клетки в лунке D до посева культивировали в течение 15 мес, а в лунке B — 17 мес (см. таблицу). Для посева клеток в лунку D добавляли 500 мкл 0.1%-ного раствора коллагеназы, а из лунки B предварительно убрали взвесь клеток и действию коллагеназы подвергались только прикрепленные к поверхности клетки. В обоих случаях, после того как большая часть клеток округлилась, среду, в которой находились клетки, пипетировали и образовавшуюся суспензию клеток переносили в пробирку для центрифугирования, затем проводили центрифугирование в течение 5 мин при 200 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл свежей среды и полученные клеточные суспензии высевали в лунки 24-луночного планшета, соответственно в лунки D1 и B4.

Через 3 нед после посева все клетки в обоих вариантах вновь прикреплялись к поверхности и оставались жизнеспособными до конца эксперимента (рис. 4), хотя

небольшое количество погибших клеток присутствовало в виде cell debris (прижизненные наблюдения под микроскопом). Таким образом, клетки в лунке D1 культивировали далее на протяжении 7 мес после посева, а в лунке B4 — на протяжении 5 мес. При замене среды в лунках D1 и B4 часть клеток оказывалась во взвеси, что может свидетельствовать о том, что не все клетки были прочно прикреплены к поверхности. Такие открепившиеся клетки переносили в новые лунки через 1 мес (из лунки B4 в лунку B4.1) или через 3 мес после посева (из лунки D1 в лунку D1.1) (см. таблицу), и они вновь переходили в прикрепленное состояние.

Формирование кристаллов. Через 4 мес культивирования клеток в лунках B—D и через 6 мес в лунке A появились кристаллы, которые предположительно могут являться аналогами кристаллов призматического слоя раковины. Это были либо одиночные мелкие кристаллы округлой формы, либо более крупные, ромбической формы, с хорошо выраженными гранями (рис. 5). Все кристаллы были окружены плотным скоплением клеток. Их появление может свидетельствовать о том, что культивируемые клетки синтезируют белки раковины, а значит, остаются жизнеспособными и функционально активными.

Криоконсервация. Для проверки возможности криоконсервации клетки из лунки A1 (см. таблицу) открепляли от поверхности с помощью коллагеназы. Для этого, убрав из лунки большую часть среды, добавляли 500 мкл 0.1%-ного раствора коллагеназы гидробийонтов в CMFSS. Округлившиеся клетки пипетировали и переносили в пробирку для центрифугирования. Клетки центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 1 мл питательной среды, содержащей 5 % DMSO от общего объема. Клетки замораживали со скоростью 1 °C за 1 мин, доводили до температуры -70 °C и далее хранили в жидком азоте.

Жизнеспособность клеток до замораживания оценивали по окраске аликвоты клеточной суспензии трипановым синим сразу после их открепления от поверхности. Через 5 мин после добавления красителя к клеточной суспензии количество неокрашенных (живых) и окрашен-

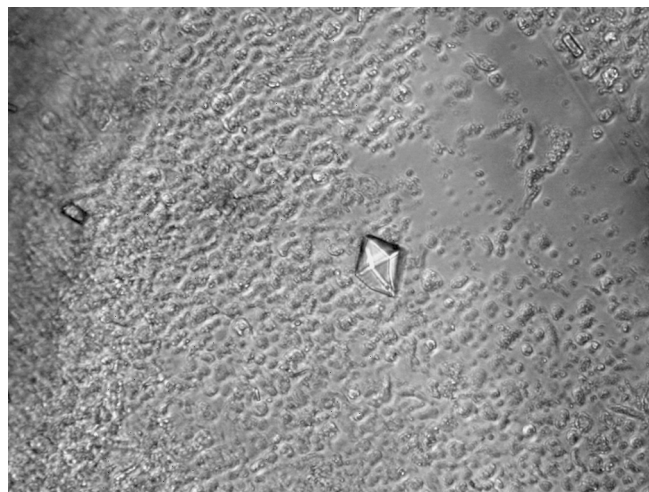


Рис. 5. Одиночный кристалл ромбической формы, окруженный клетками мантии, в исходной лунке A через 6 мес культивирования.

Об. 20×.



ных (мертвых) клеток подсчитывали в камере Горяева. Доля живых клеток до замораживания составляла 80 %.

Через 2 сут после криоконсервации все клетки размораживали во льду при комнатной температуре и центрифугировали 5 мин при 200 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл питательной среды, не содержащей сыворотки. Затем суспензию клеток разбавляли в 10 раз такой же средой для удаления остатков DMSO и оставляли на 2 ч при 10 °С. После этого клетки вновь центрифугировали 5 мин при 200 g, после удаления супернатанта осадок клеток ресуспендировали в свежей порции питательной среды (400 мкл), содержащей 2 % фетальной сыворотки. Долю жизнеспособных клеток определяли с помощью окраски трипановым синим. Она составляла не менее 50 %. Затем суспензию клеток высевали в новые лунки такой же площади, как и до криоконсервации. Через 3 сут часть клеток в новых лунках прикреплялась к поверхности. Клетки оставались в таком состоянии до конца эксперимента (в течение 7 сут). Через 22 мес культивирования все сохранившиеся клетки были криоконсервированы.

Таким образом, полученные результаты показали, что использованный нами метод культивирования клеток мантии мидии позволяет длительно сохранять жизнеспособность клеток морских беспозвоночных в условиях *in vitro*. В описанных условиях удалось культивировать клетки мантии мидии на протяжении 22 мес с сохранением их функциональной активности, о чем свидетельствовали способность к адгезии, способность формировать кристаллы, а также сохранение жизнеспособности в процессе кратковременной криоконсервации.

### Обсуждение

Проблема длительного культивирования клеток морских беспозвоночных и получения постоянных клеточных линий остается насущной в течение уже длительного времени. В нашей работе были предприняты попытки ее решения. Нам удалось показать, что клетки края мантии мидии *M. edulis* могут существовать *in vitro* на протяжении длительного времени, вплоть до 22 мес. Сроки культивирования клеток морских беспозвоночных, описанные в литературе, не превышают 9 мес (Rinkevich et al., 1998). Для морских моллюсков самый длительный срок культивирования составлял 5 мес и был описан для клеток мантии *Patinopecten yessoensis* (Chen, Wang, 1999). Доля живых клеток в первичных культурах моллюсков, описанных другими авторами, обычно снижалась на 30–80 % за первые несколько суток культивирования (Poncet et al., 2000; Gong et al., 2008a; Quinn et al., 2009; Latire et al., 2012). Эти авторы использовали для культивирования температурный режим от 15 до 24 °С. В нашей работе клетки культивировали при 10 °С, при этом через 21 мес культивирования доля живых клеток составляла 80 %. Можно предполагать, что для клеток данного моллюска, обитающего в Белом море, такая температура культивирования оптимальна.

При двух разных методах выделения клеток из ткани (ферментативная обработка или свободная миграция из фрагментов ткани) клетки оставались жизнеспособными на протяжении всего времени культивирования. Следовательно, способ выделения клеток не влияет на их жизнеспособность.

По данным литературы, из мантии различных моллюсков в процессе ее культивирования мигрируют фиброб-

ластоподобные и эпителиоподобные клетки, гемоциты и гиалиноциты (Chen, Wang, 1999; Endoh, Hasegawa, 2006; Gong et al., 2008a). При ферментативной обработке мантии в культуре присутствуют эпителиоподобные клетки, гемоциты и мышечные клетки, входящие в состав соединительной ткани (Sud et al., 2001). Визуальные прижизненные наблюдения во время наших экспериментов позволили обнаружить, что как при ферментативном выделении, так и при выделении клеток методом миграции через 6 сут после посева в культуре присутствовали клетки только эпителиоподобной формы. На ранних сроках культивирования фибробластоподобных клеток было мало, но через 5 мес появлялось большое их количество. Среди клеток, выделенных ферментативным способом, было меньше клеток с фибробластоподобной морфологией, чем среди клеток, полученных методом миграции. Это совпадает с данными тех же авторов (Sud et al., 2001), которые продемонстрировали, что ферментативное выделение клеток мантии *Haliotis tuberculata* приводит к обогащению популяции эпителиоподобными клетками.

Функциональное состояние клеток в культуре оценивали по их способности к адгезии. Этот параметр использовали и другие исследователи (Le Marrec-Croq et al., 1998; Quinn et al., 2009). В наших экспериментах в процессе миграции клеток из фрагмента мантии через 6 сут после начала культивирования большая часть клеток прикреплялась к поверхности лунки. Клетки мантии, выделенные ферментативным способом и посеянные в лунки в виде суспензии одиночных клеток, тоже через 6 сут переходили в прикрепленное состояние. Через 22 мес культивирования в исходных лунках большая часть клеток была прикреплена ко дну лунки, где они образовали участки плотного монослоя. Таким образом, можно полагать, что клетки сохраняли способность к адгезии как через короткое время после выделения, так и при более длительном культивировании, что говорит о сохранении функциональной активности в процессе культивирования.

В процессе длительного культивирования клетки, выделенные и ферментативным способом, и методом миграции, успешно пересеивались с помощью коллагеназы. Раствор коллагеназы (0.1 %) добавляли либо в лунку, содержащую в том числе плавающие клетки, либо в лунку, из которой предварительно убирали суспензию клеток. Несмотря на то что при добавлении фермента в лунку, содержащую среду с плавающими клетками, происходило его некоторое разбавление, большая часть прикрепленных клеток округлялась и могла быть перенесена в новую лунку. В обоих случаях через 3 нед после посева все клетки в новых лунках оказывались прикрепленными к поверхности лунки, в то время как, по данным других авторов, например при пересеве клеток сердца *Crassostrea gigas*, только 50–60 % клеток вновь прикреплялись к поверхности (Chen, Wang, 1999).

Что касается функционального состояния клеток, открепившихся от поверхности культурального сосуда, то ряд авторов считают, что такие клетки утратили жизнеспособность (Buchanan et al., 1999; Van der Merwe et al., 2010). В нашем случае при переносе в новую лунку клеток, находившихся во взвеси, все они вновь через 2 сут прикреплялись к поверхности и оставались в таком состоянии до конца эксперимента, т. е. перенос клеток, открепившихся от поверхности, можно интерпретировать как метод пересева части популяции клеток. При этом мы показали, что клетки, пересеянные с использованием коллагеназы, вновь адгезируют к поверхности через 3 нед,

тогда как клетки, перенесенные вместе со средой, вновь адгезируют уже через 2 сут. Тем не менее оба метода посева можно считать приемлемыми и использовать в эксперименте в зависимости от его целей.

Таким образом, способность к адгезии сохраняется клетками как при длительном культивировании, так и при посеве обоими способами. В то же время в процессе культивирования часть популяции клеток присутствовала во взвешенном состоянии, как в каком-то студенистом матриксе. И то и другое может зависеть от способности клеток синтезировать внеклеточный матрикс, что говорит об их активном функциональном состоянии в течение всего срока культивирования.

Через 4—6 мес культивирования клеток мантии во всех исходных лунках стали обнаруживаться кристаллы. В литературе описано образование кристаллов в культурах клеток животных, имеющих твердый карбонатный скелет, например в культуре клеток моллюсков (Suja, Dharmaraj, 2005; Gong et al., 2008b; Van Phuc et al., 2011) и кораллов (Domart-Coulon et al., 2001). Кристаллы, сформировавшиеся *in vitro*, так же как и кристаллы, сформированные в организме, состоят из карбоната кальция (Gong et al., 2008b). Помимо минерального компонента раковина моллюсков на 5 % состоит из белков и углеводов, которые окружают кристаллы карбоната кальция (Marin et al., 2008). Мантия является местом синтеза нескольких белков раковины (Miyamoto et al., 1996; Sudo et al., 1997; Miyashita et al., 2000; Takeuchi, Endo, 2006). Один из них — белок накреин, который является структурным компонентом, а также обладает ферментативной активностью (Miyamoto et al., 1996), может синтезироваться в культуре клеток мантии (Gong et al., 2008a). Возможно, что и другие органические компоненты раковины могут синтезироваться и секретироваться клетками в процессе культивирования (Poncet et al., 2000). Поскольку в результате длительного культивирования во всех исходных лунках наших экспериментов образовывались кристаллы, можно сделать вывод о том, что клетки края мантии *M. edulis*, находясь в культуре, были способны синтезировать макромолекулы, участвующие в образовании раковины, что в свою очередь также свидетельствует о сохранении ими не только жизнеспособности, но и функциональной активности.

Чтобы сохранить для дальнейших экспериментов клетки, культивируемые столь длительное время, их подвергали процедуре криоконсервации. Клетки хранили в атмосфере жидкого азота в течение 2 сут. Доля живых клеток после размораживания составляла не менее 50 %. Для криоконсервации клеток использовали среду, содержащую 5 % DMSO. В работах других авторов с клетками моллюсков сообщается об использовании 10%-ного DMSO. В этом случае доля живых клеток после размораживания составляла от 68 до 90 % (Odintsova, Tsal, 1995; Le Margec-Croq et al., 1998; Cheng et al., 2001; Poncet et al., 2002; Nanquet-Dufour et al., 2006). Возможно, более высокая концентрация DMSO способствует сохранению жизнеспособности таких клеток. Тем не менее полученные результаты показывают, что клетки края мантии *M. edulis*, прожившие в культуре 22 мес, переносят криоконсервацию с выживаемостью не менее 50 %.

Таким образом, сравнивая полученные результаты с данными других авторов, можно заключить, что наш метод культивирования клеток мантии мидии позволяет более длительно сохранять жизнеспособность и функциональную активность клеток морских беспозвоночных в условиях

*in vitro*. Описанная нами первичная культура могла бы послужить моделью для дальнейшего исследования клеток беспозвоночных и создания постоянных клеточных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01739) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

### Список литературы

- Allam B., Paillard C., Howard A., Le Pennec M. 2000. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Dis. Aquat. Organ.* 41 : 105—113.
- Awaji M., Suzuki T. 1998. Monolayer formation and DNA synthesis of the outer epithelial cells from pearl oyster mantle in coculture with amoebocytes. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Anim.* 34 : 486—491.
- Auzoux-Bordenave S., Domart-Coulon I. 2010. Marine invertebrate cell cultures as tools for biomineralization studies. *J. Sci. Hal. Aquat.* 2 : 42—47.
- Balseiro P., Moreira R., Chamorro R., Figueras A., Novoa B. 2013. Immune responses during the larval stages of *Mytilus galloprovincialis*: metamorphosis alters immunocompetence, body shape and behavior. *Fish Shellfish Immunol.* 3 : 1—10.
- Barik S. K., Jena J. K., Janaki Ram K. 2004. CaCO<sub>3</sub> crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel. *Curr. Sci.* 86 : 730—734.
- Brewster F., Nicholson B. L. 1979. *In vitro* maintenance of amoebocytes from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Fish Res. Board Can.* 36 : 461—467.
- Bubel A. 1973. An electron-microscope study of periostracum formation in some marine bivalves. *Mar. Biol.* 20 : 213—221.
- Buchanan J. T., La Peyre J. F., Cooper R. K., Tiersch T. R. 1999. Improved attachment and spreading in primary cell cultures of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *In Vitro Cell Develop. Biol. Animal.* 35 : 593—599.
- Chen S. N., Wang C. M. 1999. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding. *Methods Cell Sci.* 21 : 183—192.
- Cheng T. C., La Peyre J. F., Buchanan J. T., Tiersch T. R., Cooper R. K. 2001. Cryopreservation of heart cells from the eastern oyster. *In Vitro Cell Develop. Biol. Animal.* 37 : 237—244.
- Domart-Coulon I., Auzoux-Bordenave S., Documenc D., Khalanski M. 2000. Cytotoxicity assessment of antifouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. *Toxicol. In Vitro* 14 : 245—251.
- Domart-Coulon I. J., Elbert D. C., Scully E. P., Calimlim P. S., Ostrander G. K. 2001. Aragonite crystallization in primary cell cultures of multicellular isolates from a hard coral, *Pocillopora damicornis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 11 885—11 890.
- Endoh M., Hasegawa Y. 2006. Culture of mantle epithelial cells expressing shell matrix proteins from scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Sci.* 72 : 1277—1285.
- Faucet J., Maurice M., Gagnaire B., Renault T., Burgeot T. 2004. Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods Cell Sci.* 25 : 177—184.
- Frank U., Rabinowitz C., Rinkevich B. 1994. *In vitro* establishment of continuous cell cultures and cells lines from ten colonial cnidarians. *Mar. Biol.* 120 : 491—499.
- Giard W., Lebel J.-M., Boucaud-Camou E., Favrel P. 1998. Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L.: an *in vitro* study. *J. Comp. Physiol. B.* 168 : 81—86.
- Gricourt L., Bonnet G., Boujard D., Mathieu M., Kellner K. 2003. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134 : 44—56.

- Gong N., Li Q., Huang J., Fang Z., Zhang G., Xie L., Zhang R. 2008a. Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization. *Cell Tissue Res.* 333 : 493—501.
- Gong N., Ma Z., Li Q., Li Q., Yan Z., Xie L., Zhang R. 2008b. Characterization of calcium deposition and shell matrix protein secretion in primary mantle tissue culture from the marine pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotechnol.* 10 : 457—465.
- Gonzalez M., Gueguen Y., Destoumieux-Garzon D., Romestand B., Fievet J., Pugniere M., Roquet F., Escoubas J.-M., Vandembulcke F., Levy O., Saune L., Bulet P., Bachere E. 2007. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *PNAS.* 104 : 17 759—17 764.
- Hanquet-Dufour A.-C., Kellner K., Heude C., Naimi A., Mathieu M., Poncet J.-M. 2006. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: viability and metabolic activity. *Cryobiology.* 53 : 28—36.
- Hansen E. L. 1976. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics. In: *Invertebrate tissue culture: research applications*. New York: Academic. 77—99.
- Ilan M., Contini H., Carmeli S., Rinkevich B. 1996. Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. *J. Mar. Biotechnol.* 4 : 145—149.
- Kwok A., Lyons B. P., Hodges N. J., Bean T. P. 2013. Cryopreservation and storage of mussel (*Mytilus spp.*) haemocytes for latent analysis by the comet assay. *Mut. Res.* 750 : 86—91.
- Latire T., Le Pabic C., Mottin E., Mottier A., Costil K., Koueta N., Lebel J., Serpentine A. 2012. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliothis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicol.* 109 : 213—221.
- Lebel J.-M., Giard W., Favrel P., Boucaud-Camou E. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biol. Cell.* 86 : 67—12.
- Le Marrec-Croq F. L., Fritayre P., Chesn C., Guillouzo A., Dorange G. 1998. Cryopreservation of *Pecten maximus* heart cells. *Cryobiology.* 37 : 200—206.
- Le Pennec G., Le Pennec M. 2001. Acinar primary cell culture from the digestive gland of *Pecten maximus* (L.): an original model for ecotoxicological purposes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259 : 171—187.
- Le Pennec G., Le Pennec M. 2003. Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquat. Toxicol.* 64 : 131—142.
- Marin F., Luquet G., Marie B., Medakovic D. 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Develop. Biol.* 80 : 209—76.
- Mitsuhashi J. (Ed.). 2002. *Invertebrate tissue culture methods*. Tokyo, Japan: Springer-Verlag. 446 p.
- Miyamoto H., Miyashita T., Okushima M., Nakano S., Morita T., Matsushiro A. 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 9657—9660.
- Miyashita T., Takagi R., Okushima M., Nakano S., Miyamoto H., Nishikawa E., Matsushiro A. 2000. Complementary DNA cloning and characterization of pearlins, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* 2 : 409—418.
- Odintsova N. A., Dyachuk V. A., Nezhlin L. P. 2010. Muscle and neuronal differentiation in primary cell culture of larval *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). *Cell Tissue Res.* 339 : 625—637.
- Odintsova N. A., Khomenko A. V. 1991. Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia). *Cytotechnol.* 6 : 49—54.
- Odintsova N., Kiselev K., Sanina N., Kostetsky E. 2001. Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. *CryoLetters.* 22 : 299—310.
- Odintsova N. A., Tsal L. G. 1995. Cryopreservation of primary cell cultures of *Bivalvia*. *CryoLetters.* 16 : 13—20.
- Paillard C., Le Pennec M. 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue Cell.* 25 : 183—194.
- Pennec J. P., Gallet M., Gioux M., Dorange G. 2002. Cell culture of bivalves: tool for the study of the effects of environmental stressors. *Cell Mol. Biol.* 48 : 351—358.
- Pernice M., Pichon D., Domart-Coulon I., Favet J., Boucher-Rodoni R. 2007. Primary co-culture as a complementary approach to explore the diversity of bacterial associations in marine invertebrates: the example of *Nautilus macromphalus* (Cephalopoda: Nautiloidea). *Mar. Biol.* 150 : 749—757.
- Poncet J. M., Serpentine A., Boucaud-Camou E., Lebel J.-M. 2002. Cryopreservation of mantle dissociated cells from *Haliothis tuberculata* (Gastropoda) and postthawed primary cell cultures. *Cryobiology.* 44 : 38—45.
- Poncet J., Serpentine A., Thiébot B., Villers C., Bocquet J., Boucaud-Camou E., Lebel J. 2000. *In vitro* synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous mollusk, *Haliothis tuberculata*: a new model for study of molluscan extracellular matrix. *Mar. Biotechnol.* 2 : 387—398.
- Prelle K., Vassiliev I. M., Vassilieva S. G., Wolf E., Wobus A. M. 1999. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species — present status and future prospects. *Cells Tissue Organs.* 165 : 220—36.
- Quinn B., Costello M. J., Dorange G., Wilson J. G., Mothersill C. 2009. Development of an *in vitro* culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Cytototechnology.* 59 : 121—134.
- Renault T., Flaujac G., Le Deuff R.-M. 1995. Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Methods Cell Sci.* 17 : 199—205.
- Richardson C. A., Runham N. W., Crisp D. J. 1981. A histological and ultrastructural study of the cells of the mantle edge of a marine bivalve, *Cerastoderma edule*. *Tissue Cell.* 13 : 715—730.
- Rinkevich B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.* 70 : 133—153.
- Rinkevich B. 2005. Marine invertebrate cell cultures: new millennium trends. *Mar. Biotechnol.* 7 : 429—439.
- Rinkevich B., Blisko R., Ilan M. 1998. Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies. *In Vitro Cell Develop. Biol.* 34 : 753—756.
- Saleuddin A. S. M. 1974. An electron microscopic study of the formation and structure of the periostracum in *Astarte* (Bivalvia). *Can. J. Zool.* 52 : 1463—1471.
- Schmitt P., De Lorgeril J., Gueguen Y., Destoumieux-Garzon D., Bachère E. 2012. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Develop. Comp. Immunol.* 37 : 363—370.
- Sud D., Doumenc D., Lopez E., Millet C. 2001. Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliothis tuberculata*). *Tissue Cell.* 33 : 154—160.
- Sudo S., Fujikawa T., Nagakura T., Ohkubo T., Sakaguchi K., Tanaka M., Nakashima K., Takahashi T. 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature.* 387 : 563—564.
- Suja C. P., Dharmaraj S. 2005. *In vitro* culture of mantle tissue of the abalone *Haliothis varia* Linnaeus. *Tissue Cell.* 37 : 1—10.
- Takeuchi T., Endo K. 2006. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotechnol.* 8 : 52—61.
- Van der Merwe M., Auzoux-Bordenave S., Niesler C., Rodt-Wilding R. 2010. Investigating the establishment of primary cell culture from different abalone (*Haliothis midae*) tissues. *Cytototechnology.* 62 : 265—277.
- Van Phuc P., Viet P. Q., Hoang N. M., Tam N. T., Ngo P. K. 2011. Research on *in vitro* culture and inducing nacre crystal formation of freshwater pearl mussel mantle epithelial cell *Sinohyriopsis cumingii*. *Int. J. Fish. Aquaculture.* 3 : 105—113.
- Villena A. J. 2003. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Fish Biol. Fisheries.* 13 : 111—140.



CULTURE OF MUSSEL *MYTIULS EDULIS* L. MANTLE CELLS

*M. A. Daugavet,<sup>1</sup> M. I. Blinova*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; <sup>1</sup> e-mail: ka6tanka@yandex.ru

To date, cell lines derived from marine invertebrates have not been available. Hence primary cell cultures serve as model systems for various experiments. In present study we established primary culture of mussel *Mytilus edulis* L. mantle cells. Cells were isolated by means of explant culture or enzymatic dissociation of mantle tissue. They maintained viability up to 22 months regardless of culture initiation method. In course of culturing, cells, which were transferred onto new plates, successfully attached to a new surface. Physiological activity of cultured cells was also confirmed by formation of crystals, which appeared after 4—6 months. After continuous time of culturing, mantle cells can be cryopreserved using 5 % DMSO with post-freezing survival up to 50 %. These results demonstrate that *M. edulis* mantle cells can maintain viability and physiological activity for exceptionally long time and can be cryopreserved for further examination.

**Key words:** marine invertebrates, mollusks, mantel, cell culture, cryconservation.