

УДК 619:616-003.93

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-49-55>**Костюк Н.И.**, кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Николаевич Л.Н.**, кандидат биологических наук, доцент¹**Барсукова М.В.**, младший научный сотрудник¹**Руколь В.М.**, доктор ветеринарных наук, профессор²**Слепцов Ю.В.**, ассистент кафедры общей и частной хирургии²**Борисик Р.Н.**, ассистент кафедры клинической диагностики²**Андреева Е.Г.**, студентка 5 курса²¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ЖИВОТНЫХ

Резюме

В статье описаны методы выделения фибробластов из кожно-мышечной ткани эмбриона коровы с целью практического применения в ветеринарной медицине в рамках применения новых медицинских технологий. Изучена морфологическая характеристика и функциональная активность, оценена жизнеспособность кожно-мышечных фибробластов.

Ключевые слова: эмбрион, кожно-мышечная ткань, фибробласты, морфология, жизнеспособность, эффективность клонирования, пролиферация.

Summary

The article describes the methods of isolation of fibroblasts from the musculoskeletal tissue of a cow embryo for practical use in veterinary medicine as part of the application of new medical technologies. The morphological characteristics and functional activity were studied the viability of musculoskeletal fibroblasts was assessed.

Keywords: embryo, musculoskeletal tissue, fibroblasts, morphology, viability, cloning efficiency, proliferation.

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная терапия является новым подходом к стимулированию регенерации кожи при заживлении ран, которая включает восстановление структуры и функций поврежденных тканей, путем трансплантации клеток, выращенных в условиях *in vitro*. Успехи клеточной терапии показали возможность лечения ряда ранее неизлечимых заболеваний с помощью клеточных технологий [2, 6, 8].

Основным достижением современной биологии, иммунологии и медицины является создание оптимальных условий культивирования клеток различного происхождения в условиях *in vitro*, открытием стволовых и прогениторных клеток, а также перспектива их применения в регенера-

тивной медицине. [3, 7, 9]. Существуют многочисленные способы выделения популяций фибробластов из различных тканей организма, которые применяются в основном в научных исследованиях [4, 7].

После того, как было установлено, что дермальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип, имеют ограниченную продолжительности жизни, низкую экспрессию антигенов гистосовместимости и не проявляют онкогенных и туморогенных свойств, их широко начали использовать в терапевтических целях. Показано, что фибробласты при нанесении на поврежденные участки кожи оказывают стимулирующее воздействие на заживление и эпителизацию ран [3, 6]. Многими авторами предлагаются различные спосо-

бы регенерации тканей человека и животных с использованием фибробластов или фибробластоподобных клеток, выделенных из различных источников организма. Однако при разработке биотехнологических способов восстановления дефектных тканей не существует оптимального метода выделения и размножения клеток и адекватного носителя с целью их доставки в область повреждения и адаптации в дефектной области [4, 5].

Цель исследования – оптимизация условий культивирования кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы для применения в ветеринарной медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Материалом для выделения фибробластов служила кожно-мышечная ткань эмбриона коровы. В стерильных условиях из эмбриона коровы извлекали кожно-мышечную ткань и помещали в стерильные чашки Петри, измельчали на кусочки размером около 3 мм³, которые двукратно отмывали стерильным раствором Хенкса с антибиотиками. Подготовленные образцы переносили в стерильную колбу с 2,5%-ным раствором трипсина (Gibco, Великобритания) в соотношении 1:3. Помещали в шейкер-инкубатор (Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Латвия) и перемешивали на скорости 100 об/мин при температуре (37±1) °C в течение 30–40 минут. После инкубации супернатант переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15–20 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а конечный осадок ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды 199, содержащей 30 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Жизнеспособность клеток оценивали тестом, основанным на нарушении мембранной целостности, измеряемой по проникновению красителя трипанового синего. Окрашенные и неокрашенные клетки подсчитывали в ка-

мере Горяева по общепринятой методике [1]. Суспензию клеток рассеивали в культуральные флаконы с посевной концентрацией 600 тыс. клеток/мл ростовой среды 199. Клетки культивировали в термостате (SHELLAB, США) при температуре (37±1) °C. Замену ростовой питательной среды осуществляли спустя 2–4 суток в зависимости от изменения pH среды. Фибробласты культивировали до монослоя с конфлюентностью 95–100 % в течение 7–9 суток. Проводили ежедневный контроль под инвертированным микроскопом при увеличении ×100 (Nikon TS 100, Япония).

Суспензию клеток исследовали на микробиологическую стерильность методом посевов на селективные питательные среды (тиогликолевая среда, среда Сабуро).

Анализ динамики роста первичной культуры кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы проводили на 2 пассаже культивирования. Суспензию клеток в концентрации 100 000 клеток/мл вносили в пенициллиновые флаконы. Прирост клеток в популяции подсчитывали в камере Горяева после обработки монослоя 0,25%-ным раствором трипсина на всех стадиях роста культуры. Для определения концентрации клеток и подсчета живых клеток использовали метод окраски трипановым синим. Для этого 0,5 мл клеточной суспензии разводили в 5 раз 0,2%-ным раствором трипанового синего и инкубировали при 37 °C в течение 3–5 мин. Суспензию тщательно перемешивали и вносили в камеру Горяева. Рассчитывали показатели, характеризующие популяцию клеток:

1) Общее количество клеток (X) [5]:

$$X \text{ кл/мл} = N \times S \times 10\,000,$$

где X – количество клеток в 1 мл суспензии, N – количество клеток в 25 больших квадратах камеры Горяева, S – кратность разведения суспензии красителем, 10 000 – величина постоянная.

2) Процентное содержание живых клеток (неокрашенных трипановым синим) (ЖК, %) [5]:

ЖК = общее количество клеток – количество мертвых клеток / общее количество клеток × 100 %.

Содержание живых клеток в суспензии не должно быть меньше 60 %.

3) Индекс пролиферации клеток (ИП, отн. ед.):

$\text{ИП} = \frac{\text{число клеток окончательного роста}}{\text{число посеянных клеток}} \times 100 \%$.

4) Апоптотический индекс (АИ, %):

$\text{АИ} = \frac{\text{количество мертвых клеток}}{\text{число посеянных клеток}} \times 100 \%$.

5) Эффективность клонирования (ЭК, %):

$\text{ЭК, \%} = \frac{\text{количество клонов}}{\text{количество посеянных клеток}} \times 100 \%$.

Эффективность клонирования оценивали по способности клеток образовывать индивидуальные клеточные клоны. Суспензию единичных клеток получали методом серийных разведений исходной суспензии клеток. В чашки Петри диаметром 35 мм вносили суспензию единичных клеток (300 клеток в мл) для получения индивидуальных клонов. Для клонирования использовали среду F10 с 30 % эмбриональной сыворотки телят. Чашки Петри с клетками инкубировали в условиях CO_2 инкубатора при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Витальный анализ клонов проводили под инвертированным микроскопом (Nikon TS 100, Япония). Эффективность клонирования фибробластов оценивали спустя 6 суток после посева единичных клеток.

Колонии были зафиксированы 70%-ным этиловым спиртом и окрашены по Романовскому-Гимзе. Количественный анализ клонов проводили под микроскопом МБС-10, при увеличении $\times 32$. Для кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы колонии определяли как изолированную группу, состоящую из дочерних клеток одной материнской клетки. Учитывали многоклеточные и малоклеточные колонии. Анализировали морфологию клеток в клонах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения экспериментов использовали клетки 2–5-го пассажей культивирования. Выделенные кожно-мышечные фибробласты обладали способностью адгезироваться к поверхности культурального

флакона, демонстрировали типичную фибробластоподобную форму (рисунок 1).

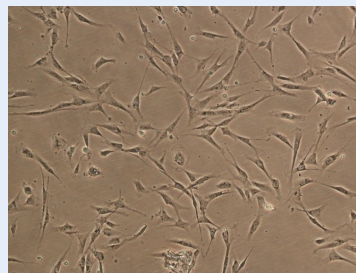


Рисунок 1. – Морфология фибробластов эмбриона коровы в первичной культуре. Фазовый контраст $\times 10$

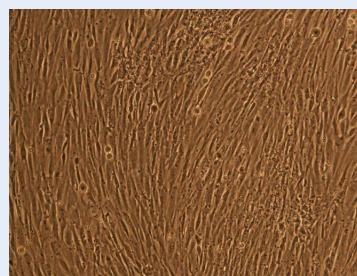


Рисунок 2. – Морфология фибробластов эмбриона коровы с конфлюэнтным монослоем. Фазовый контраст $\times 10$

Среди свежеизолированных клеток наблюдали низкий уровень клеточной гибели. Фибробласты обладали высоким потенциалом пролиферации, стабильностью и формировали высококонфлюэнтный клеточный монослой (95–100 %) на 5–7-е сутки культивирования. Доля жизнеспособных клеток составила 97 %.

Клетки имели веретенообразную мультиполярную форму, на 2–4-е сутки хорошо распластаны на поверхности субстрата. По мере культивирования в конфлюэнтном слое клетки биполярны и менее распластаны (7–9-е сутки), образовывали характерные параллельные решетки и завитки. Ядро фибробластов овальной формы с содержанием 2–3 ядрышек. Грануляция и вакуолизация вокруг ядра отсутствуют. В культуральной среде единичные клетки во взвешенном состоянии имели шаровидную форму.

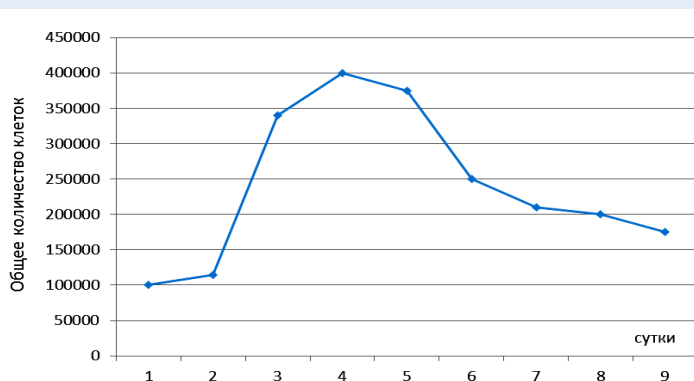
Результаты исследований по определению стерильности выделенных фиб-

робластов показали, что в течение 14 суток в пробирках с посевами на бактериологических питательных средах рост бактерий и грибов отсутствовал, изменений (цвета, наличия осадка и т.д.) не выявлено.

Изучена динамика роста фибробластов эмбриона коровы. Результаты исследований показали, что после посева клеток во флакон в концентрации 100 000 клеток/мл они входят в лаг-период продолжительностью 24–48 ч, сменяющийся на 3–4-е сутки периодом экспоненциального роста (логарифмическая фаза). В конце этого периода клетки достигают полного монослоя и к 6-м суткам входят в период замедленного роста или покоя (стационарная фаза),

за которым следует фаза снижения количества клеток и их гибель (рисунок 3).

Обычно после короткого периода экспоненциального роста тот или иной фактор становится лимитирующим. Это может происходить в результате истощения какого-либо фактора среды или в результате того, что культивируемые клетки полностью покрывают поверхность, на которой растут. Скорость роста замедляется, и количество клеток в культуре достигает насыщения (конечная плотность клеток). Когда дальнейшие деления клеток прекращаются, наступает стационарная фаза роста культуры.



1–2-е сутки – лаг-фаза; 2–3-и сутки – фаза логарифмического роста; 3–5-е сутки – стационарная фаза; 6–9-е сутки – фаза снижения количества клеток и их гибели

Рисунок 3. – Фазы роста культуры кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы

Кроме того, на различных фазах роста фибробластов изучена жизнеспособность, пролиферация и гибель клеток при длительном культивировании в динамике. На ранних этапах роста культуры (1–3-и сутки) наблюдается высокая доля живых клеток (89–95 %) в популяции фибробластов, а начиная с 4-х суток резко снижается до 20–25 % (рисунок 4).

Выявлена закономерность в изменении пролиферации клеток и их гибели в

условиях длительного роста культуры фибробластов *in vitro*. По мере культивирования наблюдается снижение пролиферации клеток в отдельный период (рисунок 5).

Снижение пролиферации клеток обусловлено высоким уровнем их гибели. Начиная со стационарной фазы роста (3–5-е сутки), апоптотический индекс составил 80 % (рисунок 6).

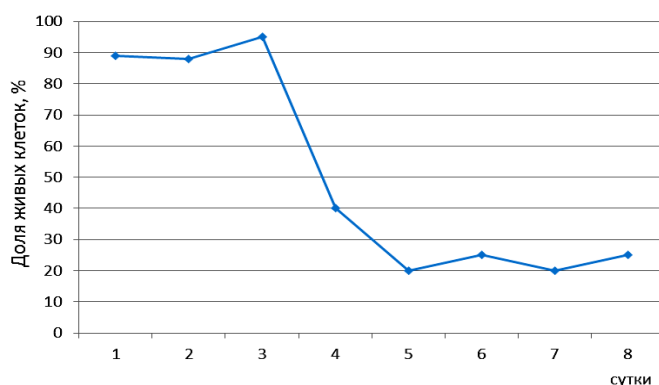


Рисунок 4. – Изменение доли живых клеток на фазах роста кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы на 2-м пассаже культивирования *in vitro*

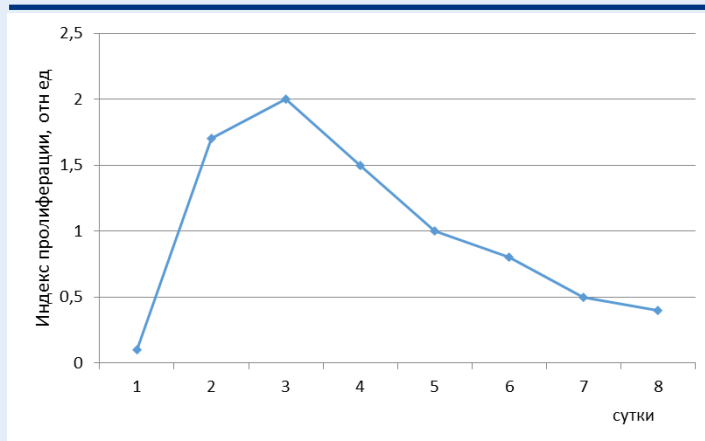


Рисунок 5. – Изменение индекса пролиферации в популяции кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы

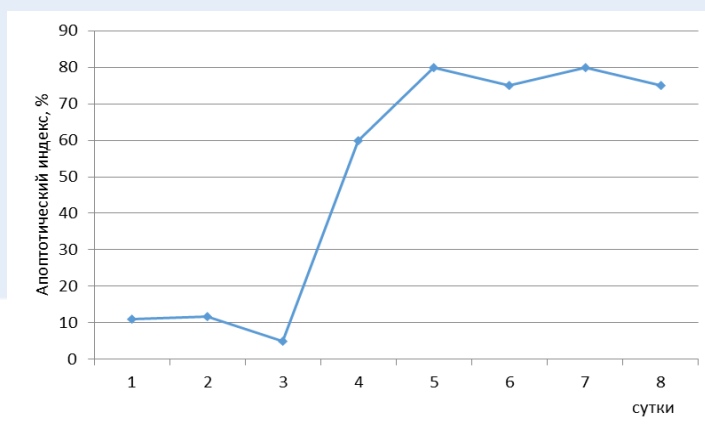


Рисунок 6. – Изменение апоптотического индекса в культуре кожно-мышечных фибробластов в зависимости от времени культивирования *in vitro*

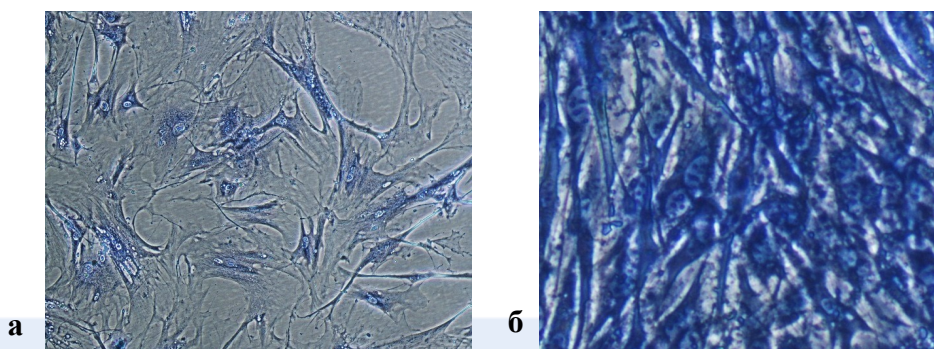
В условиях субкультивирования первичной культуры эмбриональных фибробластов, выделенных из кожно-мышечной ткани эмбриона коровы, показано, что на 2-м пассаже они характеризуются ярко выраженной гетерогенностью (рисунки 7, 8).

Методом клонирования популяция эмбриональных фибробластов коровы была разделена на две субпопуляции клеток, различающихся пролиферативным потен-

циалом и эффективностью клонирования (рисунок 8).

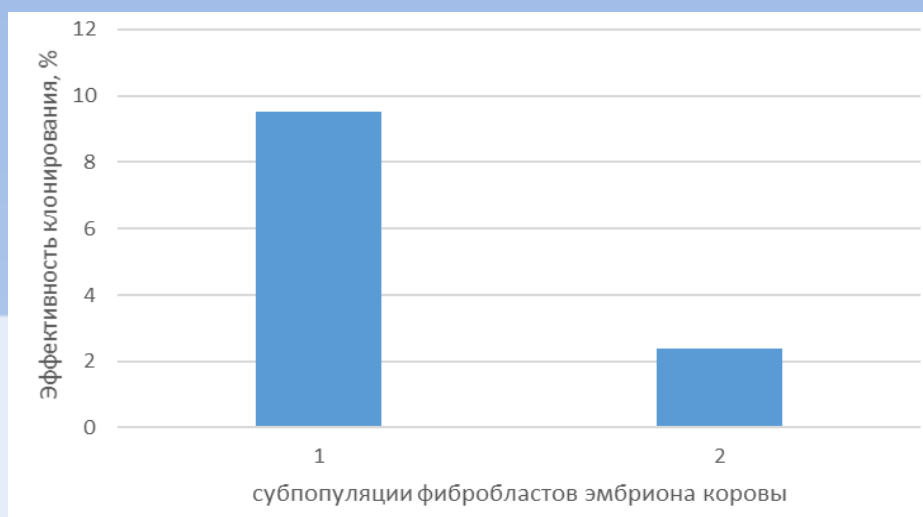
Фибробласты с высоким потенциалом пролиферации формировали многоклеточные клоны, состоящие из различных морфотипов клеток (рисунок 9).

Фибробласты с низким потенциалом пролиферации формировали малоклеточные клоны, состоящие из фиброцитов (рисунок 10).



а – фаза логарифмического роста субкультуры фибробластов на 3-и сутки культивирования, ув. $\times 100$; **б** – фаза стационарного роста субкультуры фибробластов на 5-е сутки культивирования, ув. $\times 100$

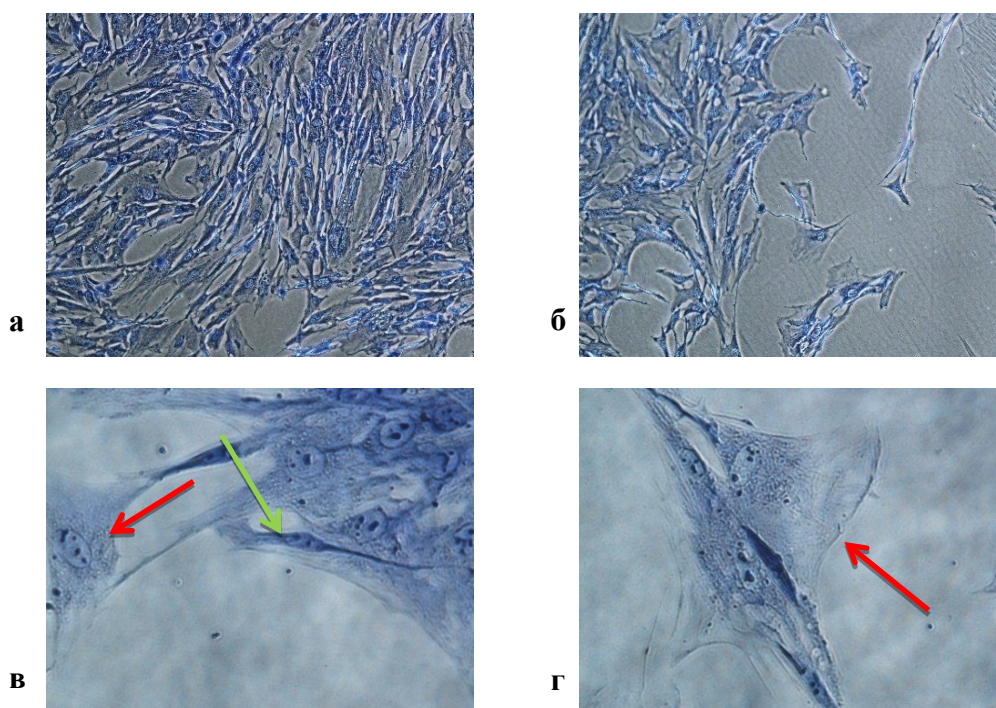
Рисунок 7. – Гетерогенная популяция кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы



1 – эффективность клонирования субпопуляции фибробластов с высоким потенциалом пролиферации;

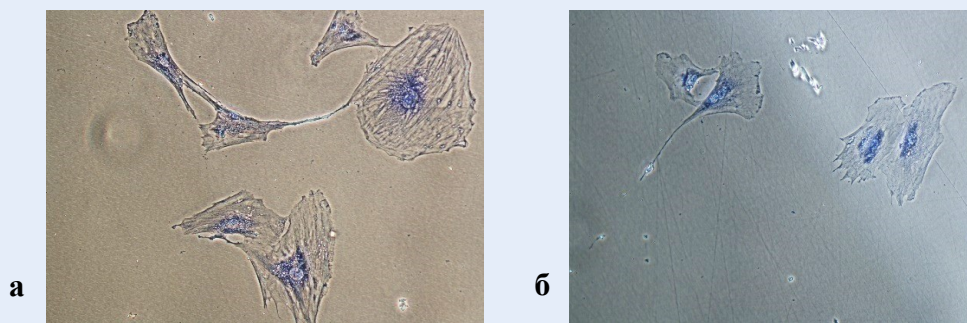
2 – эффективность клонирования субпопуляции фибробластов с низким потенциалом пролиферации

Рисунок 8. – Эффективность клонирования субпопуляций кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы (2 пассаж)



а – центральная часть многоклеточного клона, ув. $\times 100$; б – периферия многоклеточного клона, ув. $\times 100$; в – морфология клеток в многоклеточном клоне (красная стрелка – фибробласт; зеленая стрелка – фиброцит), ув. $\times 400$; г – поделившийся в клоне фиброцит, ув. $\times 400$

Рисунок 9. – Характеристика субпопуляции эмбриональных фибробластов с высоким потенциалом деления, формирующих многоклеточные клоны



а – малоклеточный клон фибробластов с низким потенциалом пролиферации, ув. $\times 100$;
б – двухклеточные клоны клеток с низким потенциалом пролиферации, ув. $\times 100$

Рисунок 10. – Характеристика субпопуляции фибробластов, состоящей из слабопролиферирующих клеток с низкой эффективностью клонирования

Таким образом, предложенная технология позволяет выделить многоклеточную фракцию эмбриональных фибробластов коровы, которая является гетерогенной популяцией и состоит из активно пролиферирующих клеток, что имеет существенное значение для применения их в регенеративной медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы из биоматериала была получена жизнеспособ-

ная популяция эмбриональных фибробластов коровы с высокой адгезивной способностью, образующая конфлюэнтный монослой, обладающая высокой пролиферативной активностью и клоногенностью.

Научные исследования, направленные на совершенствование методов выделения и технологий производства клеточного субстрата из культуры эмбриональных фибробластов, являются актуальными и перспективными для применения в ветеринарной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьяконов, Л. П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Л. П. Дьяконов. – М. : Спутник⁺, 2009. – 656 с.
2. Культуры клеток в заместительной терапии / Е. М. Петручук [и др.] // БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, № 4. – С. 197–206.
3. Левченко, В. М. Сравнительная оценка морфофункциональных свойств фибробластов сельскохозяйственных животных : дисс. ... канд. биол. наук : 06.02.01 / В. М. Левченко. – Ставрополь, 2017. – 116 л.
4. Получение аттестованных фибробластов человека, пригодных для научных и медицинских исследований / Т. Д. Колокольцева [и др.] // Биотехнология. – 2007. – С. 58–64.
5. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В. П. Божкова [и др.]. – 2-е изд. – М. : Наука, 1988. – 318 с.
6. Способ выделения фибробластов, способ создания биотрансплантата на их основе (варианты) и способ регенерации тканей человека (варианты) : Патент РФ 2567004 / Г. В. Козлов. – Оpubл. 27.10.2015.
7. Freshney, R. Ian. Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique, Fifth Edition / R. Ian Freshney. – John Wiley & Sons, Inc., 2005. – 580 p.
8. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P. S. Moorhead // Exp. Cell. Res. – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.
9. «Neutral allografts» – lack of allogeneic stimulation by cultured human cell expressing MHC class I and class II antigens / V. A. Theobald [et al.] // Transplant. – 1993. – Vol. 55, № 1. – P. 128–133.