

## ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

**Руколь В.М.<sup>1</sup>, Костюк Н.И.<sup>2</sup>, Николаевич Л.Н.<sup>2</sup>, Андреева Е.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*В настоящее время, несмотря на применяемые терапевтические препараты, проблема заживления ран остается актуальной. В статье рассмотрен возможный механизм выделения субпопуляций фибробластов, которые играют разные роли в восстановлении тканей.*

**Ключевые слова:** фибробласты, клетки, биоматериал, биопат, монослой.

**Для цитирования:** Руколь В.М., Костюк Н.И., Николаевич Л.Н., Андреева Е.Г. Текущая эпизоотическая ситуация по бешенству в Российской Федерации и меры борьбы с ним // Стуловские чтения» : сб. науч. тр. Кинель : ИБЦСамарскогоГАУ, 2022.С. 34-37.

## ISOLATION OF FIBROBLASTS FOR USE IN VETERINARY MEDICINE

**Rukol V. M.<sup>1</sup>, Kostyuk N.I.<sup>2</sup>, Nikolaevich L.N.<sup>2</sup>, Andreeva E. G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UE "Vitebsk Order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine", Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>RUP "S.N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine", Minsk, Republic of Belarus

*Currently, despite the therapeutic drugs used, the problem of wound healing remains relevant. The article discusses a possible mechanism for isolating subpopulations of fibroblasts that play different roles in tissue repair.*

**Keywords:** fibroblasts, cells, biomaterial, biopsy, monolayer.

**For citation:** Grishina P.S. The current Epizootic situation of rabies in the Russian Federation and measures to combat it // Stulovsky readings '22 : collection of scientific papers. (pp. 34-37). Kinel : PLC Samara SAU (in Russ.).

Основным перспективным направлением в заместительной терапии является клеточная терапия, цель которой состоит в восстановлении структуры и функций поврежденных тканей, путем трансплантации клеток, выращенных в условиях *in vitro*. Успехи регенеративной медицины показали возможность лечения ряда ранее неизлечимых заболеваний с помощью клеточных технологий [1, 2, 3, 7].

Известен способ выделения и культивирования аутологичных дермальных фибробластов, в котором клетки выделяют из биоптатов без ферментативной и механической обработки исходного материала, где биоптат помещается под покровное стекло и инкубируется на чашке Петри, покрытой синтетическим аналогом внеклеточного матрикса, поли-D-лизином (RU 2382077, МПК C12N 5/071). Недостаток этого метода в том, что в результате получается гетерогенная популяция клеток, состоящая из фибробластов и эпителиоподобных клеток. Некоторыми авторами предложен способ получения биотрансплантата для лечения косметических дефектов кожи, который заключается в том, что кожу или липоаспират ферментативно дезагрегируют в 0,25% растворе трипсина [4, 5, 6]. Этот метод обеспечивает низкую эффективность дезагрегации ткани, что снижает количество первичного клеточного материала.

**Цель исследования** – разработать технологию выделения фибробластов из кожно-мышечной ткани эмбриона коровы.

**Материалы и методы.** Работа была выполнялась 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 (ламинарном шкафу) из эмбриона коровы извлекали кожно-мышечную ткань и помещали в стерильные чашки Петри. Далее измельчали на кусочки размером около 3 мм<sup>3</sup>, которые двукратно отмывали раствором Хенкса с антибиотиками. Подготовленные образцы переносили в стерильную колбу, с 2,5% раствора трипсина (Gibco, Великобритания) в соотношении 1:3. Помещали в шейкер инкубатор (EnvironmentalShaker-IncubatorES-20 (BioSan) и перемешивали на скорости 100 об/мин. при температуре 37<sup>0</sup>C (±0,1) в течение 30-40 минут. После инкубации супернатант переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали собранные на этапе клетки в течение 15-20 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а конечный осадок ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды содержащую 30% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭСТ).

Полученную суспензию клеток окрашивали 0,5% раствором трипанового синего. Определяли жизнеспособность клеток и подсчитывали в камере Горяева (по Дьяконову). Рассевали в культуральные флаконы с посевной концентрацией 600 тыс. клеток в мл.ростовой среды (среда 199). Клетки культивировали в термостате (ShellLab, США) при температуре 37°C ( $\pm 0,1$ ). Замену ростовой питательной среды осуществляли каждые 2-4 дня в зависимости от снижения pH. Фибробласты культивировали до моно-слоя с конfluenceностью 95-100% в течение 7-9 суток. Проводили ежедневный визуальный контроль под инвертированным микроскопом x100 (NikonTS 100, Япония).

**Результаты.** В результате наших исследований установлено, что выделенные кожно-мышечные фибробласты обладали способностью адгезироваться к поверхности культурального флакона, демонстрировали типичную фибробласт подобную форму.

Среди свежеизолированных клеток наблюдали низкий уровень клеточной гибели. Фибробласты обладали высоким потенциалом пролиферации и стабильностью. Формировали высококонфлюэнтный клеточный монослой (95-100%) в условиях посевной концентрации при посевной дозе 600 000 в мл среды на 5-7 сутки культивирования. Доля жизнеспособных клеток составила 97%.

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

**Заключение.** В результате проделанной работы из биоматериала была получена жизнеспособная, гетерогенная популяция фибробластов с высокой адгезивной способностью, образующая конfluenceнтный монослой.

#### Список источников

1. Божкова В.П. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы // Наука 2-е изд. Москва. 1988. 318 с.
2. Петручук Е. М. Культуры клеток в заместительной терапии // 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 с.
4. Получение аттестованных фибробластов человека, пригодных для научных и медицинских исследований // Биотехнология, 2007. С. 58-64.

5. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing // Current Research in Translational Medicine. 2016. Vol.64. P. 171-177.

6. Karppinen S.M., Heljasvaara, D. Gullberg, K. Tasanen, T. Pihlajaniemi Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring // Journal F1000 Res. 2019. Vol.8. P. 787.

7. Moore A.L. Scarless wound healing: transitioning from fetal research to regenerative healing // Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2018. Vol.7. P. 309.

#### Referencer

1. Bozhkova V. P. Guidelines for the cultivation of nervous tissue. Methods. Technic. Problems // Nauka 2nd ed. Moscow. 1988. 318 p.

2. Petruchuk E. M. Cell cultures in substitution therapy // BIO preparations. Prevention, diagnosis, treatment. 2017. Vol.17. №4. P. 197-206.

3. Levchenko V. M. Comparative assessment of morphofunctional properties of fibroblasts of farm animals: dissertation of the Candidate. biol. sciences : 06.02.01 / V. M. Levchenko. Stavropol. 2017. 116 p.

4. Obtaining certified human fibroblasts suitable for scientific and medical research // Biotechnology, 2007. P. 58-64.

5. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing // Current Research in Translational Medicine. 2016. Vol.64. P. 171-177.

6. Karppinen S. M., Heljasvaara, D. Gullberg, K. Tasanen, T. Pihlajaniemi Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring // Journal F1000 Res. 2019. Vol.8. P. 787.

7. Moore A.L. Scarless wound healing: transitioning from fetal research to regenerative healing // Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2018. Vol.7. P. 309.

Тип статьи – дискуссионная  
УДК 633.152.47

### **ТЕКУЩАЯ ЭПИЗОТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО БЕШЕНСТВУ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И МЕРЫ БОРЬБЫ С НИМ**

**Полина Сергеевна Гришина<sup>1</sup>, Григорий Валерьевич Мещанинов<sup>2</sup>,  
Хамидулла Балтуханович Баймишев<sup>3</sup>**

<sup>1,2,3</sup> Самарский государственный аграрный университет, Самара, Россия

<sup>1</sup>[trinog.dvunogov@mail.ru](mailto:trinog.dvunogov@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-2312-5992>

<sup>2</sup>[grigori2806@gmail.com](mailto:grigori2806@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-4531-421X>

<sup>3</sup>[baimishev\\_hb@mail.ru](mailto:baimishev_hb@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0003-1944-5651>