

Список используемой литературы: 1.) Акбашиева А.З. Показания для кесарева сечения у собак. Подготовка к операции // *Материалы XIV Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум»*; 2.) Вилковьский И.Ф., Жукова К.А., Трофимцов Д.В. и др. *Абдоминальная хирургия мелких домашних животных: учеб. пособие / Ветеринар. центр «МЕДВЕТ». 2-е изд., перераб. и доп. М.: Научная библиотека. 2016. 198 с;* 3.) Дюльгер Г.П. *Физиология размножения и репродуктивная патология собак : учеб. пособие. 3-е изд. Спб.: Лань. 2021. 236 с.* 4.) Попов В.А. *Гемостаз и герметизация швов (операции на внутренних органах). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 320 с.*

УДК 619:616-071:636.2

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ЖИВОТНЫХ

Филиппов В. М., Сукач В. А., УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь

Научный руководитель: Борисик Р.Н., Костюк Н.И.

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

Исследования проводились 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. Из эмбриона коровы извлекали кожно-мышечную ткань и помещали в чашки Петри, измельчали и двукратно отмывали раствором Хенкса с антибиотиками. Данные образцы переносили в колбу с 2,5% раствором трипси-на в соотношении 1:3. Помещали в шейкер-инкубатор и перемешивали на скорости 100 об/мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30–40 минут. После инкубации супернатант переносили в пробирки и центрифугировали в течение 15–20 мин при 1000 об/ мин. Надосадочную жидкость удаляли, конечный осадок ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды. Жизнеспособность клеток оценивали тестом, основанным на нарушении мембранной целостности, измеряемой по проникновению красителя трипанового синего. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Суспензию клеток рассеивали в флаконы с концентрацией 600 тыс. кл/мл ростовой среды 199. Клетки культивировали в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Замену питательной среды осуществляли спустя 2–4 суток в зависимости от изменения рН среды. Фибробласты культивировали до монослоя с конfluence 95–100 % в течение 7–9 суток. Проводили ежедневный контроль под инвертированным микроскопом. Суспензию клеток исследовали на стерильность методом посевов на селективные питательные среды. Анализ динамики роста первичной культуры кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы проводили на 2 пассаже культивирования. Суспензию клеток вносили в пенициллиновые флаконы. Прирост клеток в популяции подсчитывали в камере Горяева. Суспензию тщательно перемешивали и вносили в камеру Горяева. Суспензию единичных клеток получали методом серийных разведений. В чашки Петри вносили суспензию единичных

клеток для получения индивидуальных клонов. Чашки Петри с клетками инкубировали в условиях CO₂ инкубатора при температуре (37±1) °С. Витальный анализ клонов проводили под инвертированным микроскопом. Эффективность клонирования фибробластов оценивали спустя 6 суток после посева единичных клеток. Колонии были зафиксированы 70% этиловым спиртом и окрашены по Романовскому-Гимзе. Количественный анализ клонов проводили под микроскопом. 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.

Выделенные кожно-мышечные фибробласты обладали способностью адгезироваться, демонстрировали фибробластоподобную форму, обладали высоким потенциалом пролиферации, стабильностью и формировали высококонфлюэнтный клеточный монослой. Доля жизнеспособных клеток составила 97%. На ранних этапах роста культуры (1–3 сутки) наблюдается высокая доля живых клеток, а начиная с 4-х суток резко снижается. Выявлена закономерность в изменении пролиферации клеток и их гибели в условиях длительного роста культуры фибробластов. Также наблюдается снижение пролиферации клеток в отдельный период, которое обусловлено высоким уровнем их гибели. Начиная со стационарной фазы роста (3–5 сутки), апоптотический индекс составил 80%. Методом клонирования популяция эмбриональных фибробластов коровы была разделена на две субпопуляции клеток, различающихся пролиферативным потенциалом и эффективностью клонирования. Фибробласты с высоким потенциалом пролиферации формировали многоклеточные клоны, состоящие из различных морфотипов клеток. Фибробласты с низким потенциалом пролиферации формировали малоклеточные клоны, состоящие из фиброцитов. 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.

В результате была получена жизнеспособная 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.

Список используемой литературы: 1.) Способ выделения фибробластов, способ создания биотрансплантата на их основе (варианты) и способ регенерации тканей человека (варианты): Патент РФ 2567004 / Г. В. Козлов. – Опыл. 27.10.2015.; 2.) Freshney, R. Ian. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition* / R. Ian Freshney. – John Wiley & Sons, Inc., 2005. – 580 p.; 3.) Hayflick, L. *The serial cultivation of human diploid cell strains* / L. Hayflick, P. S. Moorhead // *Exp. Cell. Res.* – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.