

Разработка современной методики культивирования аутологичных дермальных фибробластов

В.М. Левченко, аспирант, Н.А. Гвоздецкий, аспирант, ФГБОУ ВО Ставропольский ГАУ

С переходом экономики Российской Федерации на рыночные отношения возникает необходимость экономически эффективного и целесообразного ветеринарного обслуживания животноводства. Поэтому перед ветеринарной наукой поставлены актуальные задачи по поиску и внедрению в производство доступных, дешёвых и эффективных лекарственных средств [1, 2].

Учёные ветеринарного факультета Ставропольского ГАУ и Института биологии гена занимаются исследованиями переноса гена роста крупного рогатого скота овцам с целью резкого увеличения показателей мяса и шерсти. В связи с этим возникла потребность в создании модели для отработки технологии построения генетического вектора, позволяющей проверить наследуемость необходимого гена в нескольких поколениях. Также были изучены вопросы репаративной хирургии с применением аутологичных дермальных фибробластов.

Созданию оптимальных условий регенерации повреждённых тканей уделялось большое внимание исследователями во все времена. Раневые процессы у животных вызывают расстройство обмена веществ, в результате чего снижается продуктивность. Ослабление резистентности организма животного, активизация условно-патогенной микрофлоры являются основными факторами в патогенезе ран. Поэтому одна из задач ветеринарной науки — поиск эффективных и недорогих лекарственных препаратов из местного сырья, оказывающих комплексное воздействие на организм животных,

вызывающих быстрое заживление ран, что должно положительно отражаться на общем их состоянии и продуктивности [3].

В настоящее время одной из самых актуальных проблем современной ветеринарной медицины является разработка клеточных технологий, применяемых для восстановления структурной и функциональной целостности повреждённых органов и тканей животных. Идею о целесообразности использования культивируемых кератиноцитов для лечения ран впервые высказал Р. Medawar в 1948 г. [4].

Спустя некоторое время J. Rheinwald и H. Green разработали технологию серийного культивирования больших количеств кератиноцитов человека, что тоже увенчалось успехом. В 1988 г. установлены перспективы лечебного применения клеточной культуры в реконструкции тканей [5].

Фибробласты — это клетки соединительной ткани. Количество их в разных типах тканей варьируется. Фибробласты веретенообразной формы, с отходящими тонкими длинными отростками. По строению фибробласты представляют собой клетку с овальным ядром, зернистой эндоплазматической сетью и хорошо развитым комплексом Гольджи. Клетки имеют свой возраст, и по мере старения они превращаются в фиброциты. Фиброцит выглядит как веретенообразная клетка с крупным эллипсоидным ядром, мелким ядрышком. В отличие от фибробластов, у фиброцитов остальные органеллы, такие, как эндоплазматическая сеть и комплекс Гольджи, развиты слабо [6].

Главной функцией фибробластов является образование основного вещества и волокон, за-

живление ран. Это связано с активным синтезом компонента межклеточного вещества. Фибробласты синтезируют тропоколлагены, предшественники коллагена нескольких типов, межклеточный матрикс (ламинин, нидоген, тинасцин, протеогликан, фибронектин). Также интенсивно протекает метаболизм гиалуроновой кислоты. Одним из наиболее важных факторов в процессах адгезии и стимуляции пролиферативных процессов в ране, является фибронектин – высокомолекулярный гликопротеин, который синтезируют фибробласты [7].

Движение поляризованного фибробласта – это анизотропное распластывание только в одном из выбранных направлений. Прикрепление псевдоподии и подтягивание тела клетки в направлении выбрасываемой псевдоподии двигает фибробласт вперёд. Направление движения регулируется нескелетными группами внешних факторов: структурой субстрата, контактами с соседними клетками и хемотаксисом [5]. К позитивным внешним факторам относятся хемотаксис и адгезивные субстраты, а негативным – контакт с соседними клетками и неадгезивные субстраты. Выбрасывание псевдоподий на активном крае является результатом локальной полимеризации актина, сопровождающейся формированием сети микрофиламентов. Активный край клетки (круговорот актина) считается основной зоной полимеризации микрофиламентов в клетке. В настоящее время общепризнанной является теория постоянного тока или круговорота актина в клетке между клеточным краем и эндоплазмой [6, 7].

Фибробласты, помещённые в культуру и распластавшиеся на плоской подложке, например на дне чашки Петри со средой, приобретают форму веера или веретена. Они поляризованы, т.е. образуют псевдоподии лишь на одном или двух полюсах. Эти клетки могут ползти направленно в сторону одного из активных полюсов. Их боковые края неактивны. Благодаря динамике цитоскелета фибробласт может менять форму и направление движений в ответ на изменения окружающего внешнего мира, например в ответ на изменения питательной среды и поверхности подложки. Ориентировка этих клеток начинается с того, что клетка получает направленный сигнал из внешнего мира. Например, поместим возле одного из краёв клетки капилляр и будем из него выпускать в среду раствор веществ, который, попадая на поверхность клетки, вызывает в этом месте поверхности образование псевдоподий; в результате клетка начинает направленно двигаться в сторону сигнала. Это явление называется положительным химиотаксисом. Веществами, вызывающими такой химиотаксис у фибробластов, являются некоторые специальные белки, так называемые факторы роста. Химиотаксические вещества связываются со специальными белками – рецепторами в наружной мембране клетки и активизируют их. Такая активация через

какие-то ещё неясные промежуточные химические реакции вызывает полимеризацию актина под соответствующим местом мембраны и выпячивание псевдоподии. Если концентрация активирующих веществ с разных сторон клетки различна, то на одном конце клетки будет образовываться и прикрепляться к подложке больше псевдоподий, чем на другом. Контакт с другой клеткой может действовать противоположно химиотаксису: если какой-то участок активного края фибробласта касается поверхности другой клетки, то образование псевдоподий в этом месте края немедленно прекращается; происходит «контактное торможение», или «контактный паралич» этого участка.

Материал и методы исследования. Для культивирования фибробластов мы использовали питательную среду DMEM с аланил-глутамином. В ламинарном боксе разливали среду по пробиркам (приблизительно по 10 мл). Готовили фосфатный буфер: 10 мл на 200 мл диализированной воды.

Готовили 0,25-процентный раствор трипсина (разводили в 4 мл буфера). В каждую пробирку (без среды) добавляли антибиотик (стрептомицин) по 10 мкл, далее – по 4,5 мл соответствующих сред, затем – 0,5 мл ЭБС. В состав среды для промывки вошли: 20 мкл антибиотика (стрептомицина) + фосфатный буфер до полноты пробирки (разливали на 2 пробирки примерно пополам). Биоптат помещали в промывочную среду и ставили в термостат на 5 мин., затем переносили во вторую пробирку с промывочной средой также на 5 мин. и помещали в термостат. В чашке Петри биоптат измельчали на части. Далее переносили в чашку Петри, куда добавляли 400 мкл трипсина, и помещали на магнитную мешалку на 20 мин. Кусочки биоптата убирала, а надосадочную жидкость помещали в пробирку Эпиндорфа и центрифугировали при 2000 оборотов в течение 3 мин., затем убирала надосадочную жидкость, добавляли 400 мкл среды DMEM и тщательно перемешивали, после чего пробирку центрифугировали при тех же параметрах. Снова снимали надосадочную жидкость, добавляли 400 мкл среды DMEM с аланил-глутамином, перемешивали, снова центрифугировали, снимали надосадочную жидкость, добавляли 400 мкл среды DMEM, тщательно перемешивали, центрифугировали. В ламинарном боксе разливали по культуральным матрацам среды и переносили туда содержимое пробирки Эпиндорфа, культуральные матрацы помещали в термостат при $t -37^{\circ}\text{C}$ и содержанием $\text{CO}_2 - 5\%$. Далее через двое суток начинали наблюдать в инвертированный микроскоп заполнение дна матраца монослоем фибробластов. Матрацы содержались в термостате до полного заполнения дна монослоем. Как правило, это наступало на 4–5-е сутки, после чего производили пересев культуры.

В ламинарном боксе из культурального матраца пипеткой убирала среду (в пустую чашку Петри)

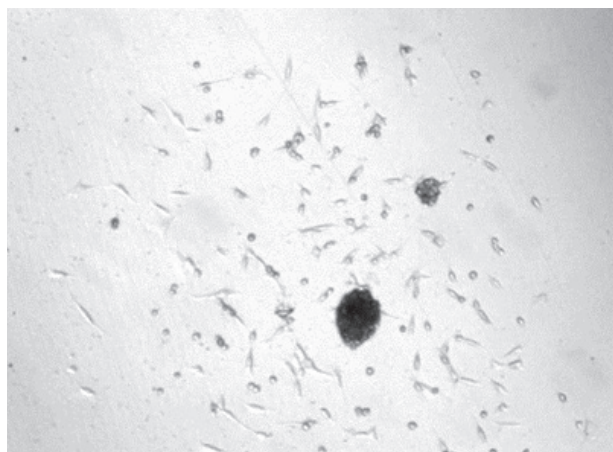


Рис. 1 – Культура фибробластов морской свинки, 1-й пассаж

и добавляли раствор Версен + трипсин. Готовили раствор Версен + трипсин (из 0,25 в 0,025%): для этого брали 250 мкл трипсина + 2,25 Версена + 5 мкл антибиотика. Затем сливали раствор и добавляли раствор Версена, промывали, сливали и снова добавляли раствор Версен + трипсин и помещали в термостат на 3–5 мин. Наблюдали под микроскопом образование монослоя. Скребок снимали фибробласты (чтобы они плавали по чашке), затем наблюдали в инвертированный микроскоп, насколько хорошо отделилась культура. В ламинарном боксе пипеткой из культурального матраса раствор вместе с фибробластами переносили в Эпиндорф, ставили в центрифугу (2000 об.; 3 мин.). Слив надосадочную жидкость, наливали 600 мкл среды DMEM (перемешивали), центрифугировали, сливали, добавляли среду, центрифугировали, сливали, добавляли среду, перемешивали и переносили в культуральный матрас (распределяя по всей площади) и ставили в термостат.

Результаты исследования. При морфометрии фотографий, полученных с живых препаратов культуры клеток морской свинки в программе «Морфо-Видео» тест, были установлены следующие различия в размерах клеток (рис. 1, 2).

С достижением 3-суточного возраста среднее значение площади аутологичных дермальных фибробластов морской свинки составило 472,93 мкм, причём max значения составили 699,13 мкм, min – 325,49 мкм.

Среднее значение периметра составило 131,67 мкм, max значение длины – 192,61 мкм, min – 102,58 мкм. Среднее значение длины было равно 54,96 мкм, max – 89,915 мкм, min – 40,91 мкм.

Среднее значение ширины составило 17,7 мкм, max – 30,93 мкм, min – 9,74 мкм. В процентном соотношении разница между максимальным и минимальным показателями площади составила 53,4%, между максимальными и минимальными значениями периметра достигала 47,2%, длины – 52,7%, а ширины составила 68,5%.

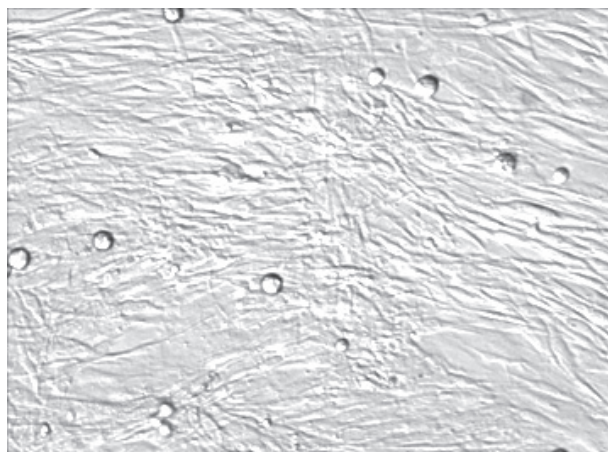


Рис. 2 – Чистая культура фибробластов морской свинки, 2-й пассаж

Размах вариаций показателей площади равнялся 373,64, показателей периметра – 90,03, показателей длины – 48,977, ширины – 21,19.

Среднее квадратичное отклонение показателей площади было равно 111,05, показателей периметра – 27,20, длины – 14,68, ширины – 5,29.

Коэффициент вариации показателей площади составлял 0,23, периметра – 0,20, длины – 0,26, ширины – 0,29.

Значение коэффициента осцилляции показателей площади составляло 0,79, периметра – 0,68, длины – 0,89, ширины – 1,19. Коэффициент асимметрии показателей площади был равен 0,99, периметра – 1,10, длины – 1,34, ширины – 0,94.

Значения коэффициента условной поляризации показателей площади 2,14, периметра – 1,87, длины – 2,19, ширины – 3,17.

Вывод. Разработана и апробирована современная методика получения и культивирования дермальных фибробластов морской свинки, которая позволила получить нам чистую культуру активных фибробластов в необходимом для дальнейших экспериментов количестве в максимально сжатые сроки – 3 сут.

Литература

1. Трухачев В.И., Селионова М.И. Использование иммуногенетических маркеров в селекции и воспроизводстве овец // Вестник АПК Ставрополя. 2013. № 2 (10). С. 88–91.
2. Любченко Е. Н. Морфофункциональная оценка заживления ран у животных при применении «БиоэффектДВ-1»: дисс. ... канд. вет. наук. Благовещенск–Уссурийск, 2003. 130 с.
3. Короблева Т.А. Клеточные технологии в лечении детей с глубокими ожогами // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2003. Том III. № 3. С. 35–42.
4. Гаврилюк Б.К., Рочев Ю.А., Николаева Т.Н. Культура клеток и реконструкция тканей (на примере кожи): монография. Пушино, 1988. 123 с.
5. Condelis J., et al; Mechanisms of Amoeboid Chemotaxis: An Evaluation of the Cortical Expansion Model. *Developmental Genetics*. 11: 33–340; 1990.
6. Danowski V.A., Harris A.K. Changes in fibroblast contractility, morphology and adhesion in response to a phorbol ester promoter. *Expl. Cell Res.*, 177, 47–49, 1988.
7. Криворучко А.Ю., Беляев В.А., Некрасова И.И. и др. Опыт культивирования фибробластов овцы // Вестник АПК Ставрополя. 2013. № 3 (11). С. 139–141.