

УДК 636:611.018.1

UDC 636: 611.018.1

16.00.00 Ветеринарные науки

Veterinary science

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ
ФИБРОБЛАСТОВ РАЗНЫХ ВИДОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ****MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
AUTOLOGOUS DERMAL FIBROBLASTS OF
DIFFERENT KINDS OF AGRICULTURAL
ANIMALS**

Левченко Владимир Михайлович
аспирант кафедры терапии и фармакологии
ID-автора в РИНЦ: 516725
*Ставропольский государственный аграрный
университет, Ставрополь, Россия*
vovka190591@mail.ru

Levchenko Vladimir Mikhailovich
graduate student of chair of therapy and pharmacology
AuthorID: 516725
Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia
vovka190591@mail.ru

Уровень развития техники современной медицины на протяжении последних 20-30 лет находится в постоянном развитии, многие технологии и способы лечения тех или иных заболеваний, которые ранее были доступны только для лечения человека, с успехом стали внедряться в ветеринарную практику. Целью работы на начальном этапе являлась апробация и установление пригодности для культивирования аутологичных дермальных фибробластов животных ранее известных методик, модернизация существующих методик. Далее, перед нами была поставлена задача - провести измерения морфометрических показателей и выявить особенности строения и функциональной активности фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных. Выводы: проведенные морфометрические исследования аутологичных дермальных фибробластов позволили нам получить корреляционную линейку. Выявить общие закономерности в развитии и росте фибробластов полученных от разных видов сельскохозяйственных животных. А так же, получить материал для проведения сравнительной оценки качества полученных культур клеток с использованием энтропийного эквивалента

The level of development of modern medical equipment for the past 20-30 years is in constant development, many of the technologies and methods of treatment of certain diseases that were previously only available for the treatment of a person with success began to penetrate in the veterinary practice. The objective aim at the initial stage was the establishment of testing and suitability for the cultivation of autologous dermal fibroblasts animals of previously known techniques and the modernization of the existing techniques. Next, we had to carry out measurements of morphometric parameters and to identify structural features and functional activity of fibroblasts of different kinds of agricultural animals. Conclusions: The study showed the conducted morphometric autologous dermal fibroblasts tests allowed us to obtain the correlation line. In addition, to identify common patterns in the development and growth of fibroblasts derived from different species of agricultural animals. And also, to obtain material for comparative evaluation of the quality of the obtained cell cultures using entropy equivalent

Ключевые слова: КУЛЬТУРА КЛЕТОК,
МОНОСЛОЙ, АУТОЛОГИЧНЫЕ ДЕРМАЛЬНЫЕ
ФИБРОБЛАСТЫ, МОРФОЛОГИЯ,
ЭНТРОПИЙНЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ
Doi: 10.21515/1990-4665-121-055

Keywords: CELL CULTURE, A MONOLAYER OF
AUTOLOGOUS DERMAL FIBROBLASTS
MORPHOLOGY, ENTROPY EQUIVALENT

Уровень развития техники современной медицины на протяжении последних 20-30 лет находится в постоянном развитии, многие технологии и способы лечения тех или иных заболеваний, которые ранее были доступны только для лечения человека, с успехом стали внедряться в ветеринарную практику.[1,2]

Для ветеринарии как одной из динамически развивающихся направлений сельского хозяйства основной целью является сокращение финансовых затрат на выполнение тех или иных ветеринарных манипуляций. Хороший «толчок» в этом плане может дать внедрение клеточных технологий в процесс лечения заболеваний животных.

Цель работы: на начальном этапе являлось апробация и установление пригодности для культивирования аутологичных дермальных фибробластов животных ранее известных методик, модернизация существующих методик. Далее перед нами была поставлена задача провести измерения морфометрических показателей и выявить особенности строения и функциональной активности фибробластов.

Работа проводилась в период с сентября 2013 года по март 2015 на базе Научно-диагностического и Лечебно-ветеринарного центра СтГАУ, нами была модернизирована и апробирована методика культивирования аутологичных дермальных фибробластов, которая позволяет получать чистую культуру в течение 4-х суток, были проведены морфометрические исследования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы.

За прототип экспериментальной части работы была взята методика изложенная в патенте: **«Способ культивирования фибробластов для заместительной терапии (RU 2320720)»** [5]. Сущность данной методики заключалась в том, что биоптат кожи инкубируют в растворе ферментов диспазы и коллагеназы I типа на основе среды культивирования DMEM с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) в течение 1,5 часов при постоянном помешивании и пипетировании. Получаемую суспензию клеток далее центрифугируют, осадок клеток ресуспендируют в стандартной среде для фибробластов (DMEM/10% ЭБС /100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 100 ед./мл фунгизона) и высевают

на чашки Петри. После прикрепления клетки переводят на длительное культивирование в среде, содержащей собственную сыворотку крови пациента (ССКП): ДМЕМ/10% ССКП /100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 100 ед./мл фунгизона.

При использовании данного способа, у нас возникли следующие проблемы:

- отсутствие адгезии фибробластов к поверхности субстрата (фото);
- отсутствие или задержка роста первичной культуры (данный показатель оценивался спустя 72 часа с момента начала культивирования);
- контаминация культуры;

Описание модернизированной нами методики изложено в цикле статей которые были опубликованы в 2015 – 2016 гг.[4,5]

В качестве модели для лабораторных исследований были использованы овцы северо–кавказкой породы в возрасте 1-1,5 года, живой массой 50 ± 2 кг в количестве 10 голов, 10 голов крупного-рогатого скота, 10 голов свиней, животные содержались в одинаковых условиях вивария факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

Результаты исследований.

В ходе экспериментальной части исследования были получены культуры, представленные на рисунках (Рис.1, Рис.2), и проведен их морфометрический анализ и была дана оценка жизнеспособности культур по таким показателям как: скорость адгезии клеток к субстрату определялась нами визуально на инвертированном микроскопе Olympus IX71 (Япония), при использовании ЭВМ совместимой программы «Видео-Тест Морфология 5.0»,

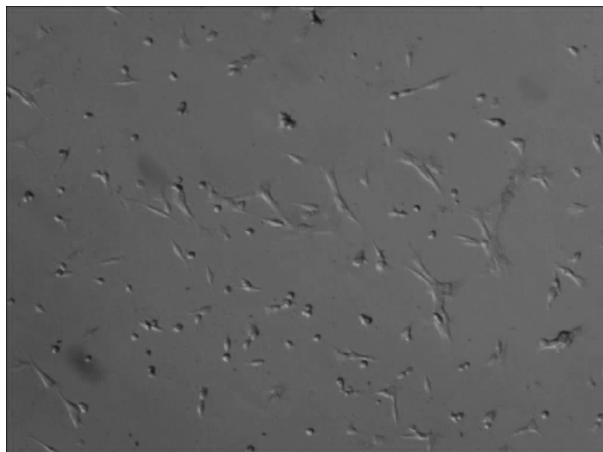


Рис.1. Культура аутологичных дермальных фибробластов овцы северокавказкой породы, культивируемая по методике патента RU 2320720 через 72 часа.

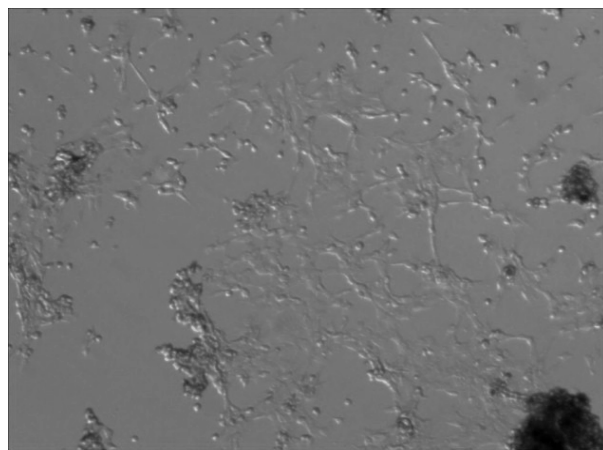


Рис.2. Культура аутологичных дермальных фибробластов овцы северокавказкой породы, культивируемых по усовершенствованной методике, через 72 часа.

Перед определением скорости адгезии клеток нами было подсчитано исходное количество клеток в 1 мл. среды которое будет высеваться на культуральный матрас.

Количество клеток в суспензии рассчитывали в камере Горяева, одновременно определяя количество жизнеспособных клеток методом исключения красителя (трипановый синий, эритрозин В, нигрозин). Живые клетки не проницаемы для красителей, а мертвые клетки проницаемы и окрашиваются.

При подсчете клеток в исходной среде были получены следующие значения: в 1 мл среды усовершенствованной нами методике было 150

клеток, в 1 мл среды подготовленной по патенту **RU 2320720** было 120 клеток.

Скорость адгезии клеток к субстрату культурального матраса подсчитывали в камере Горяева и нами были получены следующие данные.

При культивировании на поверхности пластикового культурального матраса без специальной обработки через 30 мин фибробласты полученные от овец северо-кавказкой породы прикрепились к культуральной подложке в количестве 34,28%, Через 1 ч культивирования адгезия фибробластов всех 3 видов, достигала своего максимума по количеству прикрепленных клеток 86,20 % для аутологичных дермальных фибробластов овец, 85,90% для фибробластов крупного рогатого скота и контрольной группы, 85,30% и соответственно 85,30% для фибробластов свиней. На временной точке (1 ч 30 мин) было обнаружено, что показатели адгезии клеток контрольного штамма и опытных групп уже существенно не меняются в этот период времени.

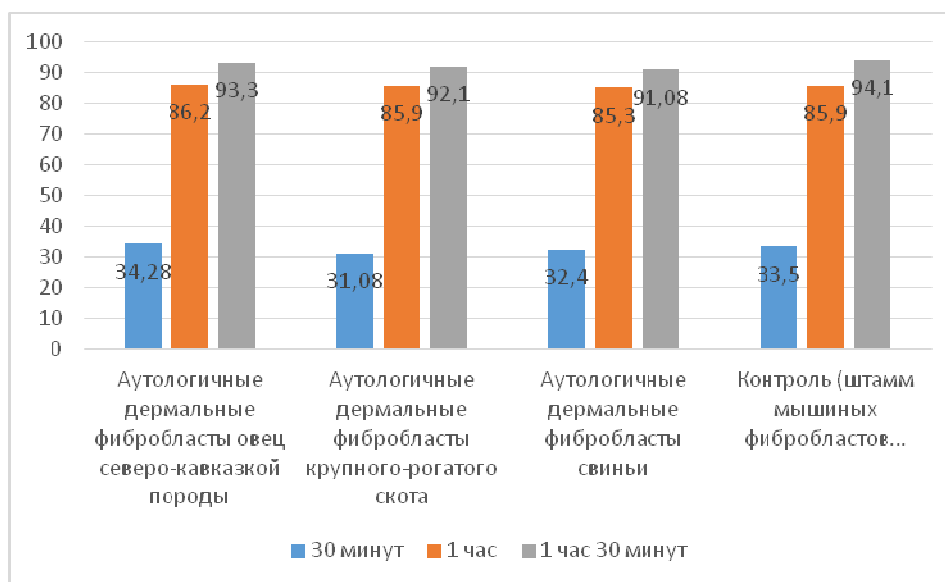


Рис. 3. Доля клеток (в % от общего числа), прикрепившихся к необработанной поверхности культуральной платы через различные промежутки времени.

При подсчете клеток для пересева было установлено что в смыве с монослоя культивированного по используемой на сегодняшний день методике (патентRU2320720) в 1 мл содержится 80 тыс. клеток фибробластов, а в смыве с монослоя культивированного по модифицированной нами методике в 1 мл содержится 120 тыс. клеток фибробластов.

Полученные данные позволили нам судить о том что количество клеток в смыве с монослоя по усовершенствованной методике на 66,6% больше чем количество клеток в смыве с монослоя культуры полученной по методике изложенной в патенте **RU 2320720**.

На диаграммах приведены динамические изменения показателей длины и ширины клеток в монослое культивируемых по

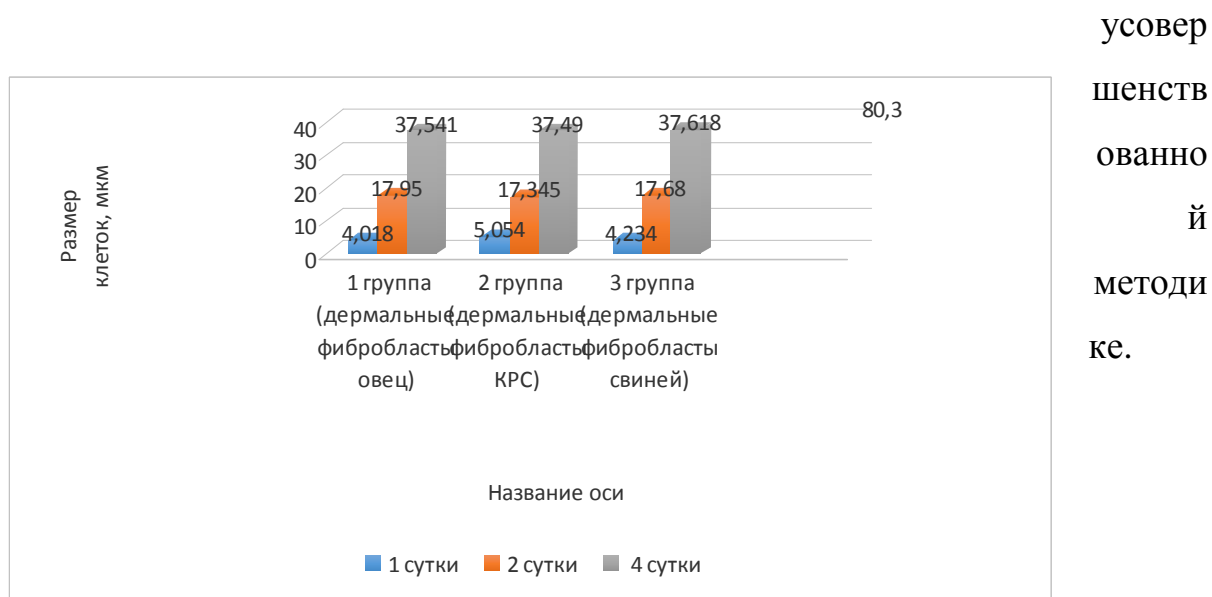


Рис. 4. Динамические изменения показателей длины аутологических дермальных фибробластов в процессе культивирования.

Проанализировав данные представленные на Рис.4 установлено, что аутологичные дермальные фибробласты овец через 24 часа после начала культивирования имеют длину 4,018 мкм, крупного рогатого скота 5,054 мкм., свиней 4,234 мкм.. На вторые сутки культивирования длина

фибробластов овец была равной 17,950 мкм., увеличение длины клеток на вторые сутки культивирования 13,932 мкм., что составило 22,4%. Длина аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота на вторые сутки культивирования составляла 17,345 мкм., увеличение значения длины по сравнению с первыми сутками культивирования на 12,291 мкм. (что составляет 29,1%). Длина аутологичных дермальных фибробластов свиньи на вторые сутки культивирования составляла 17,680 мкм., увеличение показателя длины на 13,446 мкм. (что составляет 23,9%). На четвертые сутки культивирования длина аутологичных дермальных фибробластов овец равнялась 37,541 мкм., крупного рогатого скота 37,490 мкм, свиней 37,618 мкм., увеличение длины клеток относительно второго дня составила для овец 19,668 мкм., для КРС 20,145 мкм, для свиней 19,938 мкм., что соответственно в процентном соотношении равняется 47,8%, 46,3% 47%. Анализируя данные представленные на диаграмме видно, что в первые сутки культивирования максимальная длина была у аутологичных дермальных фибробластов крупного-рогатого скота и она равнялась 5,054 мкм., максимальное значение длины аутологичных дермальных фибробластов на вторые сутки отмечалась у овец и она равняется 17,950 мкм., на четвертые сутки культивирования максимальный показатель длины отмечен у аутологичных дермальных фибробластов свиней 37,618 мкм..

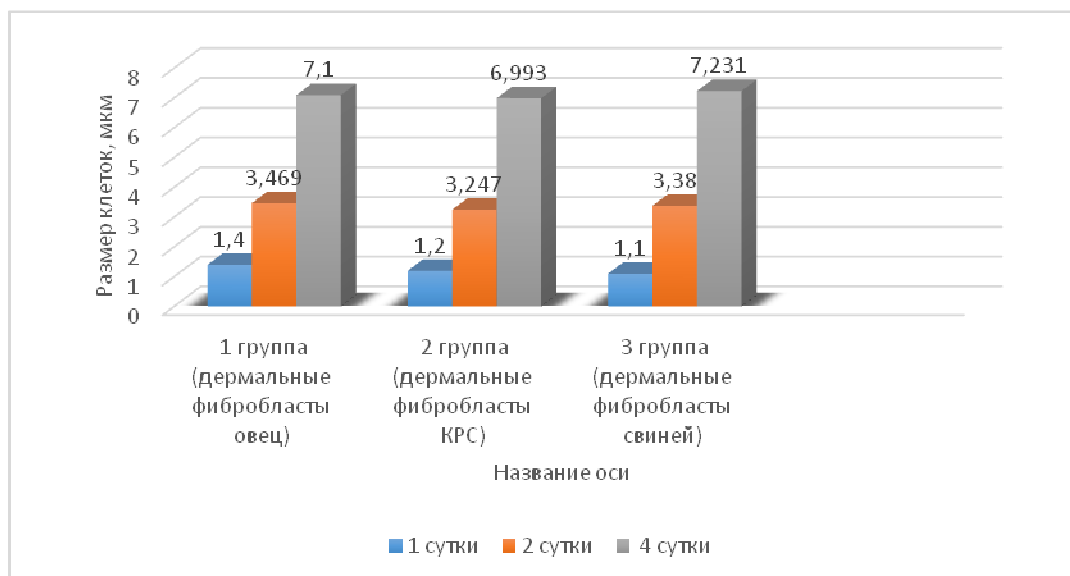


Рис. 5. Динамические изменения показателей ширины аутологичных дермальных фибробластов в процессе культивирования.

На основании анализа диаграммы Рис.5. «Динамические изменения показателей ширины аутологичных дермальных фибробласов в процессе культивирования» получены следующие данные: показатели ширины культивируемых нами фибробластов через 24 часа после начала культивирования составляли у овец 1,4 мкм., у крупно-рогатого скота 1,2 мкм, у свиней 1,1 мкм. Ширина клеток через 48 часов составляла 3,469 мкм. у аутологичных дермальных фибробластов овец, для аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота 3,247 мкм. и для аутологичных дермальных фибробластов свиней 3,380 мкм, отмечено увеличение ширины клеток овец на 2,069 мкм у крупного рогатого скота на 2,047 мкм что в процентном отношении составило 40,3%, у свиней изменение ширины составило 2,280 мкм. (32,5%). На четвертые сутки культивирования ширина аутологичных дермальных фибробластов овец северо-кавказкой породы равнялась 7,100 мкм, увеличение ширины клеток на четвертые сутки относительно вторых суток составил 3,631 мкм (что равняется 48,8%) у крупного рогатого скота 3,746 мкм. (что составляет 46,4%) и у свиней 3,851 мкм (что составляет 46,7%)

Следует отметить, что максимальный показатель ширины аутологичных фибробластов в первые 24 часа культивирования отмечался у фибробластов овец и равнялся 1,4 мкм, а минимальный у фибробластов свиней 1,1 мкм. Через 48 часов с начала культивирования максимальный показатель ширины клеток был свойственен аутологичным дермальным фибробластам овец и равен 3,469 мкм, а минимальный аутологичным дермальным фибробластам крупного рогатого скота (3,247 мкм.). На четвертые сутки культивирования максимальный показатель ширины клеток был у аутологичных дермальных фибробластов свиней (7,231 мкм.), а минимальный у аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота (6,993 мкм.).

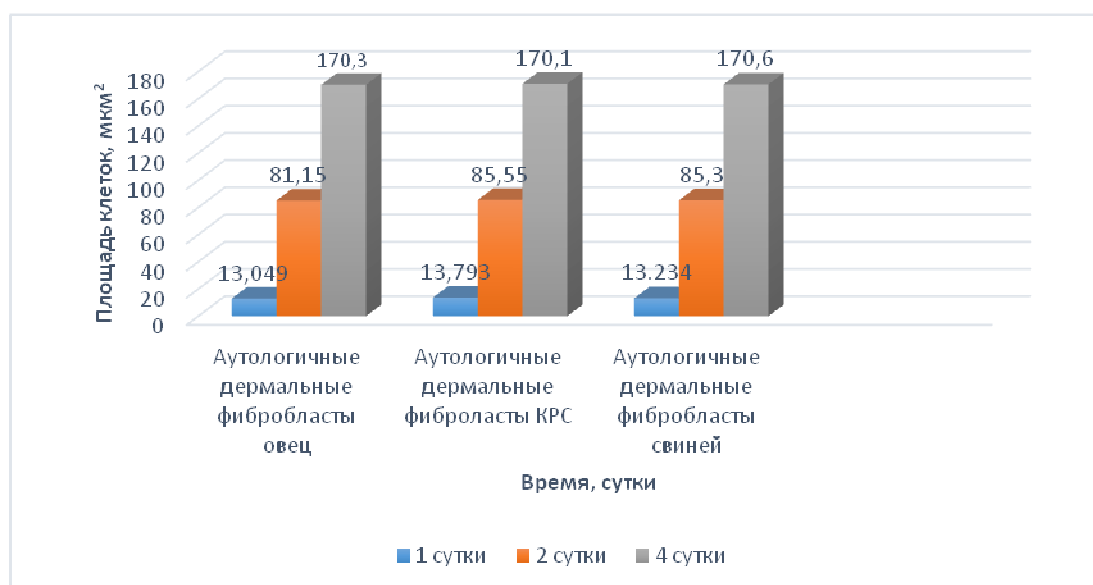


Рис. 6. Динамическое изменение значения площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования.

Проанализировав данные представленные в диаграмме Рис. 6. «Динамические изменения значения площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования» было установлено, что в первые сутки культивирования

значение площади клеток у фибробластов овец равняется $13,049 \text{ мкм}^2$, у крупного рогатого скота $13,793 \text{ мкм}^2$, у фибробластов свиней $13,234 \text{ мкм}^2$. На вторые сутки культивирования показатели площади клеток фибробластов составляли у овец $81,15 \text{ мкм}^2$ увеличение составило $68,101 \text{ мкм}^2$, что равняется 16% , у крупного рогатого скота площадь равнялась $85,55 \text{ мкм}^2$, увеличение значения площади составило $71,757 \text{ мкм}^2$ (что составляет $16,1\%$), у фибробластов свиней значение площади на вторые сутки культивирования составляло $85,3 \text{ мкм}^2$, увеличение показателя площади клеток составило $72,066 \text{ мкм}^2$ (что составляет $15,5\%$). На четверты сутки культивирования площадь фибробластов овец равнялась $170,3 \text{ мкм}^2$, увеличение значения площади на четвертые сутки культивирования по отношению ко вторым суткам культивирования составило $89,15 \text{ мкм}^2$ (что составляет $47,6\%$), у крупного рогатого скота площадь равнялась $170,1 \text{ мкм}^2$, рост значения площади на четверты сутки по отношению ко вторым составил $84,55 \text{ мкм}^2$ (что составляет $50,3\%$). У фибробластов свиней площадь на четверты сутки культивирования составляла $170,6 \text{ мкм}^2$, прирост значения площади относительно вторых суток составил $85,3 \text{ мкм}^2$ (что составляет 50%).

Исходя из полученных данных максимальное значение площади фибробластов в первые сутки культивирования было отмечено для фибробластов крупного рогатого скота ($13,793 \text{ мкм}^2$), а минимальное значение у фибробластов овец ($13,049 \text{ мкм}^2$). На вторые сутки культивирования отмечено, что максимальное значение площади было у фибробластов крупного рогатого скота ($85,55 \text{ мкм}^2$), минимальное значение у фибробластов овец ($81,15 \text{ мкм}^2$). На четверты сутки культивирования максимальный показатель площади был у фибробластов свиней ($170,6 \text{ мкм}^2$), минимальный у крупного рогатого скота $170,1 \text{ мкм}^2$.

Выводы:

В первые получены морфометрические показатели аутологичных дермальных фибробластов сельско-хозяйственных животных культивируемых *in vitro* и выявлены следующие закономерности изменения этих показателей в процессе культивирования:

Для фибробластов овец свойственны минимальные значения длины и площади, а так же максимальное значения ширины клеток в первые сутки культивирования, ко вторым суткам культивирования увеличение значения длины на 22,4%, увеличение ширины клеток на 40,3%, увеличение площади на 16%, на четвертые сутки сохраняется тенденция увеличения значения длины и рост составил 47,8% и увеличение ширины на 48,8%, площади на 47,6%.

Для аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота в процессе культивирования было характерно максимальное значение длины клеток при морфометрическом анализе в первые сутки культивирования, который равнялся 5,054 мкм, на вторые сутки культивирования было отмечено увеличение значения длины на 29.1%, ширины 40,3%, площади на 16.1%. На четвертые сутки увеличение длины составило 46,3%, ширины 46,4%, площади на 50,3%.

Для аутологичных дермальных фибробластов свиней отмечалось следующее на первые сутки культивирования клетки достигли следующих размеров длина равнялась 4,234 мкм, ширина 1,1 мкм. Через 48 часов культивирования было отмечено увеличение длины на 23,9%, ширины на 32,5%, площади на 15,5%. На четвертые сутки культивирования клетки достигли своего максимального размера и увеличение длины клеток на четвертые сутки по отношению ко вторым суткам составляло 47%, ширины 46,7%, площади на 50%.

Полученные данные открыли перед нами возможность оценить жизнеспособность культур клеток на основании энтропийного эквивалента, данные результаты будут отражены в следующих работах.

Список литературы:

1. Рунова Г. С. Использование культивированных аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта: дис. ... канд. мед. наук. — М., 2000. — 145 с.
2. Ерохин А. И. Использование культуры фибробластов человека при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2002. С.9-13.
3. Беляев В.А., Левченко В.М. Исследование возможности ведения фибробластов в перевиваемых культурах // Вестник АПК Ставрополья. 2015. №1 (17). С. 80-84.
4. Левченко В.М., Гвоздецкий Н.А. Разработка современной методики культивирования аутологичных дермальных фибробластов // Известия оренбургского государственного аграрного университета 2016. №2 (58). С. 88-90.
5. Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Калинина Н.И., Рубина К.А., Друбич Т.Л., Балашова М. Б. Способ культивирования фибробластов для заместительной терапии// Патент России № 2320720. 2008. Бюл. №9.

References

1. Runova G. S. Ispol'zovanie kul'tivirovannyh allofibroblastov v kompleksnom lechenii zabolevanij parodonta: dis. ... kand. med. nauk. — M., 2000. — 145 s.
2. Erohin A. I. Ispol'zovanie kul'tury fibroblastov cheloveka pri hirurgicheskom lechenii vospalitel'nyh zabolevanij parodonta: Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. — M., 2002. S.9-13.
3. Beljaev V.A., Levchenko V.M. Issledovanie vozmozhnosti vedenija fibroblastov v perevivaemyh kul'turah // Vestnik APK Stavropol'ja. 2015. №1 (17). S. 80-84.
4. Levchenko V.M., Gvozdeckij N.A. Razrabotka sovremennoj metodiki kul'tivirovanija autologichnyh dermal'nyh fibroblastov // Izvestija orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta 2016. №2 (58). S. 88-90.
5. Parfenova E.V., Tkachuk V.A., Kalinina N.I., Rubina K.A., Drubich T.L., Balashova M. B. Sposob kul'tivirovanija fibroblastov dlja zamestitel'noj terapii// Patent Rossii № 2320720. 2008. Bjul. №9.