

## Оптимизация условий получения первичной культуры эмбриональных фибробластов овец

Научный руководитель – Сингина Галина Николаевна

*Ворожбит Тимофей Александрович*

*Выпускник (магистр)*

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,  
Зоотехнии и биологии, Пчеловодства и рыбоводства, Москва, Россия

*E-mail: tima\_voron2008@mail.ru*

Культура эмбриональных фибробластов овец может быть использована для генерации индуцированных стволовых клеток, в качестве фидерного слоя, как источник ядер для клонирования и создания животных с заданными свойствами, а также многих других целей. На сегодняшний день прочно укрепился классический способ получения первичной культуры эмбриональных фибробластов. Этот способ предполагает механическое измельчение эмбриона с последующей ферментативной обработкой трипсином. Классический способ позволяет эффективно выделять первичную культуру эмбриональных фибробластов, однако длительная обработка трипсином может негативно влиять на адгезивные свойства клеток, нарушать их морфологию, снижать устойчивость к криоконсервации. Все это ухудшает качество выделяемой культуры клеток, и решением данной проблемы может стать бесферментативный способ выделения первичной культуры фибробластов овец.

Целью работы являлось получение культуры эмбриональных фибробластов без ферментативной обработки и оценка ее жизнеспособности, в том числе при пассаживании и после криоконсервации

Для выделения первичной культуры эмбриональных фибробластов были получены эмбрионы возрастом 37 дней от романовских овец (post mortem). После извлечения из матки эмбрион многократно промывался в физиологическом растворе с антибиотиком.

Выделение первичной культуры производилось двумя методами: классическим - с использованием трипсина, и механическим - без ферментативной обработки.

При классическом методе - подготовленный эмбрион механически измельчали и подвергали обработке 0,25% трипсином ЭДТА при температуре 38°C в течение 30 минут. Суспензию клеток в трипсине нейтрализовывали двойным объемом DMEM с 5% FCS. Суспензию клеток дважды промывали центрифугированием 7 минут при 2000 оборотов/мин с последующим ресуспендированием в DMEM с 15% FCS и антибиотиком. Суспензию одиночных фибробластов рассеивали в культуральные планшеты с DMEM с 15% FCS и антибиотиком.

При механическом способе выделения фетальных фибробластов подготовленный эмбрион протирали через культуральное ситечко с шириной ячейки 0,22 мкм в чашке Петри с 0,1 молярным раствором PBS. Полученную суспензию клеток промывали центрифугированием, ресуспендировали и рассеивали как в первом случае.

При достижении 80-100% монослоя клетки снимали с поверхности культуральных планшетов 0.25% трипсином ЭДТА и криоконсервировали, либо пассировали, а после криоконсервировали в среде 50% FCS + 10% DMSO + 40% DMEM для создания банка фибробластов ранних пассажей.

После криоконсервации был поднят образец культуры эмбриональных фибробластов овец, полученный механическим способом, для использования в качестве карิโอпласта для переноса ядер соматических клеток. Культура клеток достигла 15 пассажа, сохраняя высокую скорость роста и фибробластоподобную морфологию.

В результате проведенных работ большая часть первичной культуры эмбриональных фибробластов (59,53%) была получена без использования ферментов с помощью механического метода выделения фибробластов. Клетки, полученные механическим способом, имели веретеновидную форму, хорошо проявляли адгезивные свойства, успешно достигли монослоя в 80-100% на 4-5 день культивирования. В первичной культуре помимо одиночных клеток встречаются единичные конгломерации как в механическом, так и ферментативном методе. Рост культуры и пассирование проходили без затруднений как до, так и после криоконсервации.