

Оптимизация протокола получения культуры дермальных фибробластов крыс

Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова, К.А. Артемьева, А.Ю. Шелков

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. Получение первичных культур фибробластов необходимо для проведения экспериментальных исследований по изучению базовых механизмов реакции клеток на различные стимулы. Несмотря на широкое использование культур фибробластов, методы их получения из кожи не стандартизированы. Целью исследования был подбор оптимальных условий для получения культуры фибробластов из соединительнотканной основы кожи – дермы крыс с помощью ферментативной дезагрегации ткани.

Материалы и методы. Культуру фибробластов получали из дермы крыс Вистар массой тела 60–65 граммов в возрасте 5–6 недель и массой 160–180 граммов в возрасте 8–10 недель. Проведена серия экспериментов по получению культуры фибробластов с подбором типа коллагеназы, ее концентрации и времени воздействия.

Результаты. Представлен оптимизированный протокол получения дермальных фибробластов крыс, обсуждаются проблемы получения культуры и практические аспекты ее использования.

Заключение. При получении первичной культуры фибробластов кожи крыс следует учитывать ряд факторов – тип фермента, его концентрацию, время воздействия, возраст животных, зону забора кожного лоскута. У молодых крыс оптимальный результат получен при выделении клеток из аксиллярной зоны с применением коллагеназы II типа в концентрации 1 мг/мл и времени воздействия 90 минут. При использовании лоскута кожи, полученного со спины взрослого животного, ферментативное воздействие коллагеназой II типа в концентрации 5 мг/мл в течение 120 минут было оптимальным.

Ключевые слова: культура фибробластов, дерма, протоколы получения, крысы

Для корреспонденции: Елена Алексеевна Пономаренко. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

Для цитирования: Пономаренко Е.А., Диатроптова М.А., Артемьева К.А., Шелков А.Ю. Оптимизация протокола получения культуры дермальных фибробластов крыс. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):62–69. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.62-69.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А17-117013050045-5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.12.2020. Получена после рецензирования 25.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Protocol optimization for obtaining the culture of rat dermal fibroblasts

Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova, К.А. Artemyeva, А.Ю. Shelkov

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Obtaining primary cultures of fibroblasts is necessary for conducting experimental studies to investigate the basic cell response mechanisms to various stimuli. Despite the widespread use of fibroblast cultures, methods for obtaining them from the skin are not standardized. The aim of the study was to find the optimal conditions to obtain a fibroblast culture from rat skin using enzymatic tissue disaggregation.

Materials and methods. The fibroblast culture was obtained from the dermis of 18 male Wistar rats (N=12, 5–6-week-old, and 60–65 g body weight; N=6, 8–10-week-old rats, and 160–180 g body weight). A series of experiments was carried out to obtain a fibroblast culture with selecting the collagenase type and defining its concentration and exposure time.

Results. An optimized protocol to obtain rat dermis fibroblasts is presented. Moreover, the problems of obtaining a culture and practical aspects of its use are discussed.

Conclusion. When obtaining a primary culture of rat skin fibroblasts we should consider the following factors: the type of the enzyme, its concentration, and exposure time; the age of the animals; the area of skin graft collection. In young rats, the optimal result was achieved when the cells were isolated from the axillary zone using collagenase type II at a 1 mg/ml concentration during a 90-minute exposure. In adult animals,

the enzymatic effect of collagenase type II on the skin graft obtained from the back was optimal at a 5 mg/ml concentration during a 120-minute exposure.

Keywords: fibroblast culture, dermis, preparation protocols, rats

Corresponding author: Elena A. Ponomarenko. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

For citation: Ponomarenko E.A., Diatropova M.A., Artemyeva K.A., Shelkov A.Yu. Protocol optimization for obtaining the culture of rat dermal fibroblasts. *Clin. exp. morphology* 2021;10(2):62–69. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.62-69 (In Russ.).

Funding. The work was carried out within the framework of State Assignment to Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A17-117013050045-5).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 30.12.2020. **Received in revised form** 25.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Первичные культуры различных клеток, используемые в экспериментальной работе, получают из нормальных и патологически измененных тканей животных. Для последующей работы клетки при выделении и субкультивировании должны максимально сохранять свои морфологические характеристики и функциональную активность. Таким образом, создаются условия для моделирования клеточных реакций *in vitro*. Универсальной биологической моделью для изучения процессов, лежащих в основе роста и пролиферации клеток, их метаболизма и передачи внутри- и внеклеточных сигналов, являются фибробласты [1]. Культура фибробластов также позволяет изучать *in vitro* секреторную активность клеток как в физиологических условиях, так и при воздействии различных факторов по уровню продукции специфических белков, цитокинов, факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса [2]. Фибробласты локализованы в соединительнотканном каркасе всех органов и тканей – сердца, желудочно-кишечного тракта, легких, скелетных мышц и т.д. Одним из источников их получения является кожа. Выявлены значительные отличия в архитектонике и регенераторном потенциале дермы разных участков тела [1].

Фибробласты кожи крысы можно получить методом первичного эксплантата и ферментативной дезагрегации. Метод первичного эксплантата разработан в 1907 году Р.Г. Харрисоном [3]. Этапы этого метода включают получение биоптата кожи, фрагмент которой помещают на покровное стекло в каплю плазмы крови с добавлением гетерологичной сыворотки, и заключение в часовое стекло. Гетерологичная сыворотка индуцирует коагуляцию плазмы. Преципитат плазмы и сыворотка способствуют фиксации тканевого фрагмента на стекле. Компоненты преципитата содержат белки и факторы роста, которые обеспечивают пролиферацию и миграцию фибробластов [3]. Прикреплению эксплантата также способствуют шероховатая поверхность исчерченной чашки Петри, обработка пластика полилизин или фибронектином [3, 4]. Одним из вариантов метода является измельчение кожи на мелкие фрагменты, 3–4 мм, и помещение их под покровное стекло в культуральный сосуд с питатель-

ной средой [5, 6]. Недостатки этого метода – низкая адгезивность тканей, сложности селекции клеток во время роста, а также относительно медленный процесс миграции клеток из первичного эксплантата [3].

Распространенный в исследованиях метод – ферментативная дезагрегация кожи крыс с целью более быстрого получения достаточного количества дермальных фибробластов. Однако при этом существует риск ферментативного повреждения клеток. Метод применяется при достаточном объеме ткани, когда потеря клеток во время дезагрегации не играет значительной роли для получения культуры. В качестве фермента обычно используют коллагеназу. Этот фермент подходит для работы с тканями, содержащими большое количество волокон [3]. Иногда для дезагрегации тканей и получения фибробластов применяют трипсин [5, 7].

Метод ферментативной дезагрегации с целью получения фибробластов включает забор участка кожи с последующим удалением эпидермиса и расщеплением дермы на мелкие фрагменты, инкубацию их с протеолитическими ферментами – коллагеназой, трипсином. При этом тип ферментов, их концентрация и время воздействия широко варьируют [3, 5, 8, 9]. Некоторые авторы рекомендуют в состав полной среды добавлять фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), положительно влияющий на рост клеток и синтез фибронектина, коллагена, эластина, а также трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor, TGF- β), который оказывает модулирующее влияние на функции клеток, включая хемотаксис, и стимулирует синтез коллагена [10, 11].

Способы получения культуры фибробластов как методом первичного эксплантата, так и ферментативной дезагрегации ткани не стандартизированы [4, 5, 8, 9, 12, 13], поэтому целью работы было создание оптимального протокола получения фибробластов кожи крысы.

Материалы и методы

В работе использовали крыс Вистар: 12 самцов массой тела 60–65 граммов в возрасте 5–6 недель и шесть самцов массой 160–180 граммов в возрасте 8–10 недель, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра

биомедицинских технологий ФМБА России. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований (1985), а также правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267). На проведение исследования было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 2 от 19.01.2020). Кожный лоскут у крыс иссекали под общим наркозом. Внутримышечно вводили золетил (Virbac, Франция) в дозе 15 мг/кг.

Проведен ряд экспериментов по подбору времени ферментативного воздействия. Использовали коллагеназу II типа (Gibco № 17101-015, США) в диапазоне доз 0,5–1 мг/мл, время воздействия составляло 1–1,5–2 часа, при этом фрагменты кожи крысы были размерами менее 1 мм. Полученную культуру фибробластов оценивали под цифровым инвертированным микроскопом (Carl Zeiss Axiovert 40 MAT, Германия). Концентрацию клеток после энзиматического снятия с пластика подсчитывали в камере Горяева. Морфологию дермальных фибробластов оценивали в нативных культурах и препаратах, окрашенных по Романовско-Гимзе («Абрис», Россия).

Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием клеточной суспензии 0,4% раствором трипанового синего («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:20.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Sigma Stat 3.5 (Systat Software,

Inc., США). Использовали метод парных сравнений. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выделение фибробластов из кожи крыс осуществляли путем ферментативного воздействия (трипсин, коллагеназа II), затем их культивировали в чашках Петри. Критерием эффективности служило формирование полного монослоя фибробластов через 7–10–14 дней.

Дермальные фибробласты при адгезии выглядели распластанными, приобретали удлинённую, веретеновидную форму и преимущественно образовывали отростки первого и второго порядка. В центральной, наиболее широкой части клетки определялось овальное с четкими контурами ядро, в котором визуализировалось от двух до четырех ядрышек (рис. 1).

Анализ жизнеспособности дермальных фибробластов показал, что доля погибших клеток в ходе выделения невысока, выживаемость составила $\geq 98\%$. Субкультивирование клеток было возможным в группах со сформированным к требуемому сроку монослоем (табл.).

Несмотря на полученный положительный результат, хотелось бы обсудить ряд методических сложностей и вопросов, которые возникали при получении фибробластов кожи у крыс. При выделении фибробластов кожи крыс определяется ряд методических сложностей, что требует обсуждения.

Таблица | Table

Подбор условий выделения фибробластов кожи крыс разного возраста |
Selecting conditions for dermal fibroblast isolation in rats of different ages

Возраст животных Age of animals	Концентрация коллагеназы II типа, мг/мл Concentration of type II collagenase, mg/ml	Время воздействия фермента, ч Time of enzyme exposure, h	Результат, наличие монослоя клеток через 7 суток Result, presence of a cell monolayer after 7 days	Результат, наличие монослоя клеток через 10 суток Result, presence of a cell monolayer after 10 days	Результат, наличие монослоя клеток через 14 суток Result, presence of a cell monolayer after 14 days	Количество клеток, полученных из 1 см ² кожи, ×10 ⁶ Number of cells obtained from 1 cm ² skin, ×10 ⁶	Жизнеспособность клеток, % Viability cells, %, Me (Q1; Q3)
5–6 недель 5–6 weeks	0,5	1	–	–	–	2,1 (1,6; 2,3)*	98,0 (98,0; 98,75)
5–6 недель 5–6 weeks	1,0	1,5	Есть Achieved	Есть Achieved	Есть Achieved	3,6 (2,7; 4,1)	98,5 (98,0; 99,0)
5–6 недель 5–6 weeks	1,0	2	–	–	–	2,3 (2,2; 3,1)*	98,5 (98,0; 99,0)
8–10 недель 8–10 weeks	5,0	2	–	Есть Achieved	Есть Achieved	4,6 (3,8; 5,6)	98,0 (97,25; 98,75)

* – статистически значимые отличия от группы успешно сформированного монослоя фибробластов у крыс в возрасте 5–6 недель

* – statistically significant differences from the successfully formed fibroblast monolayer group in 5–6-week-old rats

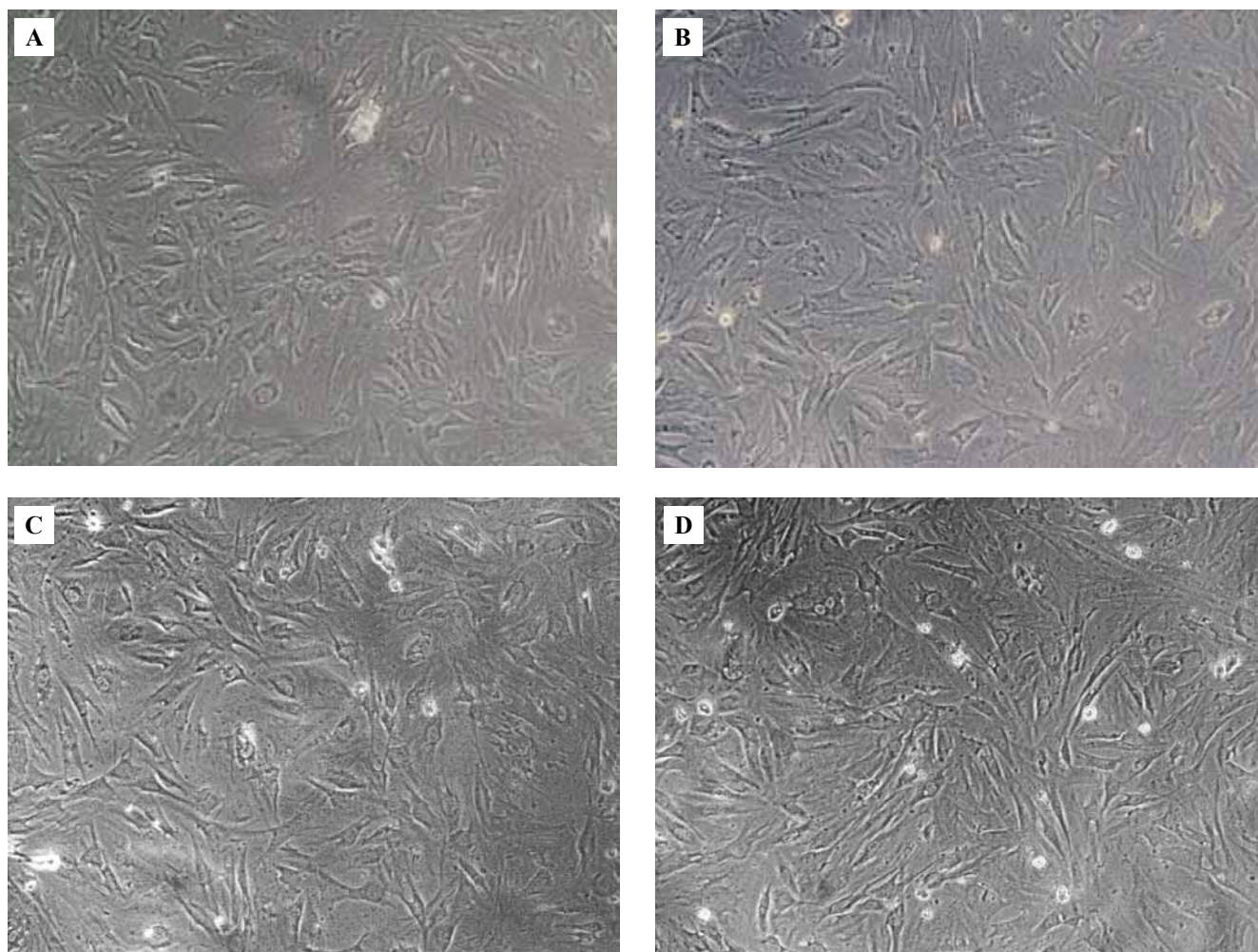


Рис. 1. Монослой дермальных фибробластов крыс после выделения. Фазово-контрастная микроскопия, $\times 400$.

A – 5–6 недель (7 суток), B – 5–6 недель (14 суток), C – 8–10 недель (10 суток), D – 8–10 недель (14 суток)

Fig. 1. Rat dermal fibroblast monolayer after isolation. Phase-contrast microscopy, $\times 400$

A – 5–6 weeks (day 7), B – 5–6 weeks (day 14), C – 8–10 weeks (day 10), D – 8–10 weeks (day 14)

Одна из проблем была связана с тем, из какой зоны поверхности тела проводить забор кожи. При выделении фибробластов кожи у мышей G.G. Walmsley et al. (2016) использовали биоптат кожи спины размерами 60×100 мм [14]. В.М. Murphy et al. (2019) получали фибробласты у 4-дневных мышей, поэтому забирали всю кожу [13]. Кожный лоскут из области спины крыс грубый, с большим количеством коллагеновых волокон, поэтому возникали сложности при его подготовке к этапу ферментативной обработки. Альтернативное решение было предложено А. Seluanov et al. (2010). Эта группа исследователей выделяла фибробласты кожи у нескольких видов животных, включая лабораторных крыс и мышей. Авторы проводили забор участка кожи размером 1 см^2 в подмышечной области, в связи с тем что кожа в этой зоне более тонкая и содержит меньше жировой ткани [8].

В вопросе выбора способа удаления волосяного покрова единого мнения нет. Предлагают удалять шерсть с помощью машинки для стрижки волос [14] или кре-

ма для депиляции (Surgicream, American International Industries) [15]. По нашим наблюдениям, тщательное удаление волос предпочтительно, но не обязательно. При первичной обработке фрагмент кожи инкубировали с ферментами: раствором трипсина 0,25% (при 4°C) в течение 8–12 часов или диспазы 0,125–2% (от 1 до 24 часов) [7, 9], затем удаляли эпидермис и оставшиеся фрагменты волос с волосяными фолликулами. Для облегчения удаления эпидермиса и жировой ткани также применяется трипсин 0,25% раствор с добавлением 1мМ ЭДТА. Обработку трипсином биоптата кожи выполняют классически с преинкубацией в течение 8–12 часов при 4°C , затем 15 минут при 37°C , далее проводится механическое удаление с помощью скальпеля [3, 13, 15]. Для удаления эпидермиса также возможна инкубация в 0,25% растворе трипсина фрагмента кожи в течение 30–60 минут или 1,5–2 часов при 37°C [5, 15]. Некоторые авторы пропускают этап удаления эпидермиса, так как в последующем используются среды, которые не подходят для культивирова-

ния клеток эпидермиса, например DMEM, DMEM/F12, M199 [8, 9, 13].

Необходимо обратить внимание на меры асептики при работе с фрагментом кожи животного. Так, большинство исследователей, А. Seluanov, В.М. Murphy, G.G. Walmsley [8, 13, 15], обрабатывали инструменты и кожу животного перед забором материала 70% спиртом, тогда как S.R. Gillespie и D.M. Owens [15] для обеззараживания участка кожи использовали 1% раствор бетадина в течение 2 минут и последующее промывание стерильной водой. При заборе фрагмента кожи мы применяли спирт, а при подготовке кожи к измельчению – 10% бетадин (EGIS Pharmaceuticals Plc, Венгрия).

Процесс измельчения кожного лоскута довольно трудоемок. А. Seluanov et al. [8] использовали скрепленные скальпели для получения мелких фрагментов, этот же прием описан у Р.Я. Фрешни [3] в рамках методики получения первичных культур. G.G. Walmsley et al. для измельчения кожи применяли лезвие бритвы и ножницы [14]. Мы при выполнении этого этапа работы сначала разрезали кожу на узкие полоски, потом прямыми ножницами каждую измельчали до фрагментов размерами 2–3 мм. Для дальнейшего измельчения фрагментов использовали остроконечные вертикально изогнутые глазные ножницы. Чем меньше в результате получают фрагменты кожи, тем лучше проходит их ферментативная дезагрегация.

Для последующей ферментативной обработки ткани важны выбор фермента и его концентрация. Единого мнения по этому вопросу у исследователей нет. Классическим вариантом считают применение коллагеназы I [9, 13]. Ряд авторов, В.М. Murphy et al. [13], А. Takashima et al. [5], В.А. Зуев [9], для выделения фибробластов кожи использовали коллагеназу I типа. Некоторые исследователи применяли другие ферменты. Так, А. Seluanov et al. [8] проводили выделение фибробластов кожи и легких с помощью Liberase Blendzyme 3 (смесь коллагеназы I и II типа). G.G. Walmsley et al. при получении фибробластов кожи у мышей использовали коллагеназу IV типа [14]. Производители этого фермента рекомендуют применять коллагеназу I типа, но, как следует из опыта названных выше авторов, возможно использование коллагеназы других типов. В нашей работе успешно была применена коллагеназа II типа (Gibco, США).

Концентрация коллагеназы, применяемой для ферментативной дезагрегации кожи, по данным разных авторов, варьирует, а в зависимости от концентрации изменяется и время ее воздействия. Так, В.М. Murphy et al. [13] применяли коллагеназу I типа в концентрации 10 мг/мл в сочетании с трипсином и ДНКазой I, и время воздействия составило 30 минут. А. Seluanov et al. использовали Liberase Blendzyme 3 (коллагеназа I и II) в концентрации 0,14 ед, Wunsch/мл – 1 мг/мл, время воздействия при этом составило 30–90 минут [8]. G.G. Walmsley et al. применяли коллагеназу IV типа

в концентрации 1 мг/мл и инкубировали фрагменты кожи в течение часа [14]. Выбор концентрации фермента и времени воздействия зависит от вида животного, производителя и серии фермента.

Коллагеназа относится к протеолитическим ферментам. Она расщепляет связи между нейтральными аминокислотами (X) и глицином в аминокислотной последовательности *Pro-X-Gly-Pro* в коллагене. Получают ее в основном из фильтрата культуры *Clostridium histolyticum*. Фильтрат содержит не менее семи различных протеаз с молекулярной массой 68–130 кДа. Кроме изоформ коллагеназ в нем также отмечается примесь казеиназы, клострипаина, трипсина, желатиназы, эластазы и т.д. Существует несколько типов очищенных коллагеназ (I–XI), и они различаются по специфичности и способности к разрушению природного коллагена и синтетических субстратов. Так, коллагеназа I типа используется для выделения клеток из кожи, легких, жировой ткани, надпочечников. Коллагеназа II типа применяется для изоляции клеток сердца, щитовидной и слюнных желез, печени, костей и хрящевой ткани. Коллагеназу типа IV и VIII применяют для выделения клеток из печени, а типы V и XI дают хороший результат при выделении островков Лангерганса из поджелудочной железы [16]. Подбор коллагеназы, что отмечают и производители (Sigma, Merck, Worthington), и ее необходимой концентрации (от 0,1 до 5 мг/мл) во многом является эмпирическим. Также экспериментально подбирают время диссоциации тканей: от 15 минут до нескольких часов [5, 9, 12, 13].

Следует отметить, что коллагеназа активируется ионами кальция (концентрация ионов в растворе должна составлять 5 мМ), но ингибируется ЭГТА, ЭДТА, бета-меркаптоэтанолом, глутатионом, тиогликолевой кислотой и 8-гидроксихинолином [16]. Более высокая удельная активность коллагеназы может вызвать гибель клеток. В этом случае уменьшают концентрацию фермента или добавляют БСА, сыворотку (до 0,5% и 5–10%, соответственно), чтобы стабилизировать клетки для дальнейшего выделения [3, 17].

При ферментативной обработке степень дезагрегации фрагментов кожи может быть полной или частичной [8, 12]. В случае полной дезагрегации ткани исследователи предупреждают о возможности переваривания клеток, в связи с тем что промежуток времени от одного состояния к другому небольшой – всего 10–15 минут [12].

Вопрос применения клеточного сита для отделения непереваренной ткани и клеточной суспензии является спорным. Непереваренные фрагменты тканей, или микроэсплантаты, могут также быть источниками фибробластов. По данным А. Seluanov et al., фибробласты мигрируют из фрагментов ткани на 2–5-й день [8]. В то же время фильтрация суспензии через клеточное сито может вызвать дополнительное осаждение на нем фибробластов, хотя этот прием используется в некоторых протоколах [14, 15].

Проблемой при выделении фибробластов кожи, на наш взгляд, является сложность прикрепления кожных фрагментов. Так, S.M. Keira et al. рекомендуют помещать фрагменты ткани на чашки Петри с исчерченным дном, размещать их под ламинарным потоком на 40 минут для адгезии ткани и только потом добавлять среду культивирования [4]. Большинство авторов не используют дополнительные покрытия, так как фибробласты хорошо адгезируются к пластику, но в качестве альтернативы рассматривают обработку последнего коллагеном и фибронектином [3, 13].

В нашем эксперименте при ферментативном методе получения фибробластов непереваренные фрагменты кожи находились в культуральной среде во взвешенном состоянии. Они не прикреплялись к поверхности чашки Петри, что было подтверждено микроскопически. Традиционный метод культивирования фибробластов с использованием плазмы крови в качестве покрытия поверхности пластика дает хорошие результаты прикрепления неполностью дезагрегированных фрагментов кожи [3]. С этой целью проводили забор крови у крысы из хвостовой вены в объеме 2 мл в стандартную пробирку с ЭДТА. Кровь центрифугировали и использовали плазму в качестве покрытия дна чашек Петри. Затем их оставляли на 1–2 часа в ламинарном шкафу или использовали сразу. Помещали суспензию клеток с непереваренными фрагментами кожи на 3–5 минут и затем добавляли полную питательную среду. При таком подходе непереваренные участки кожи при ферментативном получении фибробластов быстро прикреплялись к поверхности, что создавало оптимальные условия для получения культуры клеток.

Был проведен ряд экспериментов по подбору времени ферментативного воздействия (табл.). Через 1,5–2 часа воздействия коллагеназы II типа фрагменты кожи легко разрушались и проходили через стандартный наконечник пипетки объемом 1000 мкл. В результате серии экспериментов выявлено, что лимитирующим фактором для получения фибробластов оказался возраст животного. Для крыс в возрасте 5–6 недель при получении культуры фибробластов достаточной концентрацией коллагеназы II типа является 1 мг/мл, а для крыс в возрасте 8–10 недель – 5,0 мг/мл.

В результате нами разработан итоговый оптимизированный протокол выделения дермальных фибробластов кожи крысы в возрасте 5–6 недель массой тела 50–60 граммов.

Протокол выделения дермальных фибробластов

Шерсть в подмышечной области сбривали. Поверхность обрабатывали 96% спиртом и проводили забор одного лоскута кожи размером 1 см² с последующим ушиванием краев раны. Фрагмент кожи помещали в среду ДМЕМ («ПанЭко», Россия).

1. Фрагмент кожи крысы в предварительно подогретом до 37° С растворе 0,25% трипсин–ЭДТА («ПанЭко», Россия) помещали на 30–60 минут в СО₂-инкубатор.

2. С помощью скальпеля удаляли эпидермис и с внутренней стороны подкожную клетчатку.

3. Для предотвращения бактериального роста фрагменты кожи переносили в 10% раствор бетадина (EGIS Pharmaceuticals Plc, Венгрия) на 5 минут, затем дважды промывали средой.

4. С помощью ножниц кожный лоскут измельчали до 2–3 мм и затем остроконечными вертикально изогнутыми глазными ножницами до получения однородной массы.

5. Полученную из кожи массу однородной консистенции помещали в среду ДМЕМ с коллагеназой II типа (Gibco № 17101-015, США) в концентрации 1 мг/мл на 1,5 часа в СО₂-инкубатор при 37°С. Периодически, каждые 15–20 минут, пробирку встряхивали.

6. После завершения инкубации раствор с непереваренными фрагментами кожи пипетировали, используя наконечники с широким и узким просветом, с целью дополнительной механической дезагрегации ткани.

7. На следующем этапе к раствору ДМЕМ с ферментом коллагеназой II типа и взвеси клеток и непереваренных фрагментов кожи добавляли среду ДМЕМ с 10% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) и центрифугировали (325 г, 5 минут).

8. Клетки ресуспендировали в 1 мл среды ДМЕМ с содержанием 10% ЭТС, 40 мкг/мл гентамицина и 2мМ глутамина («ПанЭко», Россия).

9. Затем клетки помещали в пластиковую чашку Петри (10 см в диаметре) и добавляли полную среду ДМЕМ.

10. Далее фибробласты инкубировали в течение 7 дней до формирования полного монослоя (рис. 1). На этом этапе при микроскопическом исследовании выявлены прикрепившиеся клетки – фибробласты и фрагменты кожи – микроэксплантаты, которые служат дополнительными источниками фибробластов.

Все использованные среды подогрели до 37°С.

С возрастом, по достижении крысами массы тела 80 граммов и более, культуру клеток фибробластов кожи с помощью данного протокола получить не удалось, поэтому нами был разработан протокол для получения фибробластов у половозрелых крыс массой 160–180 граммов. Метод включает забор участка кожи размерами 1 × 1 см со спины крысы после предварительного сбривания шерстного покрова и обработки кожи 70° спиртом. Выбор участка кожи был обусловлен большим количеством коллагеновых волокон и фибробластов. Фрагмент кожи крысы помещали на 30 минут в предварительно прогретый до 37°С 0,25% раствор трипсина, в СО₂-инкубатор. Затем с помощью скальпеля удаляли эпидермис и подкожную клетчатку. Кожу измельчали и помещали в среду ДМЕМ с содержанием глюкозы 4,5 г/л, L-глутамин (Capricorn Scientific, Германия) с коллагеназой II типа в концентрации 5 мг/мл на 2 часа в СО₂-инкубатор, встряхивая пробирку через каждые 15–20 минут. Раствор с непереваренными кусочками кожи пипетировали и добавляли

раствор ДМЕМ с 10% ЭТС, центрифугировали при 112 g 7 минут. Клетки ресуспендировали в среде ДМЕМ с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 2мМ L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина и 10% ЭТС и помещали в чашку Петри или в культуральный флакон. В течение 10 дней формировался полный монослой фибробластов (рис. 1 С).

Заключение

При получении первичной культуры фибробластов кожи крыс следует учитывать ряд факторов – тип фермента, его концентрацию, время воздействия, возраст животных, зону забора кожного лоскута. Оптимальный результат получен при использовании кожного лоскута из аксиллярной области у крыс в возрасте 5–6 недель массой тела 60–65 граммов, применении коллагеназы II типа в концентрации 1 мг/мл, и времени воздействия 90 минут. Для взрослых животных массой тела 160–180 граммов при обработке кожи, полученной из области спины, была оптимальной ферментативная дезагрегация коллагеназой II типа в концентрации 5 мг/мл в течение 120 минут.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова.

Сбор и обработка материала – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова, К.А. Артемьева, А.Ю. Шелков.

Написание текста – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова.

Редактирование – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова, К.А. Артемьева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova.

Collected and processed the data – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova, К.А. Artemyeva, А.Ю. Shelkov.

Wrote the paper – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova.

Editing the manuscript – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova, К.А. Artemyeva.

Литература/References

1. Кузьмичева В.И., Волова Л.Т., Гильмиярова Ф.Н., Быков И.М., Авдеева Е.В., Колотьева Н.А. Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности *in vitro*. Наука и инновации в медицине. 2020;5(3):210–215. DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215.
Kuzmicheva VI, Volova LT, Gilmiyarova FN, Bykov IM, Avdeeva EV, Kolotieva NA. Fibroblasts as the subject of proliferative activity research *in vitro*. Science and innovations in medicine. 2020;5(3):210–215 (In Russ.). DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215.
2. Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Антекаръ И.А. Модель влияния гипоксии на клеточную составляющую и синтез компонентов внеклеточного матрикса в культуре фибробластов. Российский иммунологический журнал. 2019;13(22):939–941. DOI: 10.31857/S102872210006535.
Suhovej UG, Kostolomova EG, Unger IG, Akuneeva TV, Antekar IA. Model of influence hypoxias on the cellular component

- and synthesis components extracellular matrix in culture fibroblasts. Russian Journal of Immunology. 2019;13(22):939–941 (In Russ.). DOI: 10.31857/S102872210006535-3.
3. *Freshney RI.* Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 676 p. DOI: 10.1002/9780470649367.
 4. *Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Santos IAN.* Experimental model for fibroblast culture. Acta Cir Bras. 2004;19:11–6. DOI: 10.1590/S0102-86502004000700004.
 5. *Takashima A.* Establishment of fibroblast cultures. Curr Protoc Cell Biol. 2001; Chapter 2:Unit 2.1. DOI:10.1002/0471143030.cb0201s00.
 6. *Sacco AM, Belviso I, Romano V, Carfora A, Schonauer F, Nurzynska D et al.* Diversity of dermal fibroblasts as major determinant of variability in cell reprogramming. J Cell Mol Med. 2019;23(6):4256–68. DOI:10.1111/jcmm.14316.
 7. *Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI.* Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. J Cell Physiol. 2004;200(1):134–45. DOI: 10.1002/jcp.10474.
 8. *Seluanov A, Vaidya A, Gorbunova V.* Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. J Vis Exp. 2010;44:2033. DOI: 10.3791/2033.
 9. *Zuev VA, Dyatlova AS, Lin'kova NS, Kvetnoi IM, Belushkina NN, Pal'tsev VA.* Skin fibroblasts as the object for clinical diagnosis of Parkinson's disease in persons of different ages. Bull Exp Biol Med. 2019;167(1):177–81. DOI: 10.1007/s10517-019-04485-1.
 10. *Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM.* Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. Journal Cell Sci. 1995;108(Pt 3):1251–61. PMID: 7622608.
 11. *Naim R, Sadick H, Bayerl C, Bran G, Hörmann K.* Angiogenic factors in external auditory canal cholesteatoma-fibroblast cell culture. HNO. 2005;53(11):952–6. DOI: 10.1007/s00106-005-1252-z.
 12. *Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM et al.* Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. J Immunol. 2007;179(3):1595–604. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1595.
 13. *Murphy BM, Weiss TJ, Burd CE.* Rapid generation of primary murine melanocyte and fibroblast cultures. J Vis Exp. 2019;148:10.3791/59468. DOI: 10.3791/59468.
 14. *Walmsley GG, Maan ZN, Hu MS, Atashroo DA, Whittam AJ, Duscher D et al.* Murine dermal fibroblast isolation by FACS. J Vis Exp. 2016;107:53430. DOI: 10.3791/53430.
 15. *Gillespie SR, Owens DM.* Isolation and characterization of cutaneous epithelial stem cells. Methods Mol Biol. 2019;1879:87–99. DOI: 10.1007/7651_2018_171.
 16. *Van Wart HE.* Clostridium Collagenases. In: ND Rawlings and G Salvesen (eds.). Handbook of proteolytic enzymes. Hayward: Academic Press, 2013(1):607–611. DOI:10.1016/B978-0-12-382219-2.00126-5.
 17. *McManus D, Novaira HJ, Hamers AAJ, Pillai AB.* Isolation of lamina propria mononuclear cells from murine colon using Collagenase E. J Vis Exp. 2019;151:10.3791/59821. DOI: 10.3791/59821.

Информация об авторах

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Марина Анатольевна Диатроптова – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Артем Юрьевич Шелков – лаборант-исследователь лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Author information

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-9672-7145>.

Marina A. Diatroptova – Junior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0858-8369>.

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>.

Artem Yu. Shelkov – Laboratory Assistant, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-5491-6802>.