

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ-ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЖИВОТНОВОДСТВА-
ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА» (ВНИИГРЖ)**



ВИТРИФИКАЦИЯ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

*Притужалова А. О. *, Кузьмина Т. И.*

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Тема 0445-2021-0005)

Витрифика́ция (стеклование, от лат. Vitrum — стекло и лат. facio — делаю, превращаю), переход жидкости при понижении температуры в стеклообразное состояние.

При использовании метода витрификации криопротекторный раствор, в котором находятся живые объекты, не кристаллизуется при охлаждении, а переходит в стекловидное состояние.

Выживаемость КГ (клеток гранулезы) в процессе витрификации с последующим размораживанием остается на достаточно низком уровне, что сказывается на их стероидогенной активности и продукции различных биологически активных веществ. В связи с вышеизложенным становится необходимым совершенствование существующих протоколов витрификации.

ПРОПОДГОТОВКА

- Подготовка рабочего места
- Подготовка сред и растворов
- Подготовка расходных материалов
- Подготовка транспортировочного контейнера

АСЕПТИКА

- Вентиляционная система (система вытяжки, поток воздуха из ламинара обратный);
- Проведение влажной уборки (обработка всех зон дезинфицирующими средствами);
- Обработка помещений УФ (перед каждым процессом работы с клетками – обязательное включение УФ ламп минимум на 30 минут);
- Стерилизация инструментов и приборов (отдельная обработка ламинарного бокса и перед и после работы 70% спиртом, еженедельная обработка CO₂ инкубатора, автоклавирование посуды и инструментов);
- Использование стерильного материала (культуральные среды, растворы не должны стоять открытыми или долго храниться, газ для подачи в инкубатор должен проходить через систему фильтрации. Если имеется минимальное подозрение на контаминацию какого-либо из реагентов или растворов-немедленно прекратить его использование, провести утилизацию, оповестить других сотрудников).
- Если в процессе работы что-то из расходных материалов падает на пол- ни в коем случае не поднимать!
- Если культуральная среда или какая-либо другая жидкость капает/брызгает на рабочую поверхность ламинара – сначала промокнуть бинтовым тампоном насухо, после чего место обработать 70% спиртом.

АСЕПТИКА

Оператор, работающий с клетками, должен иметь соответствующую защиту:

- Длинный халат, закрывающий одежду или униформу (например, хирургический костюм);
- Сменную, моющуюся обувь;
- Шапочку, маску, перчатки, защитные очки.

ПОСТАВКА И ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

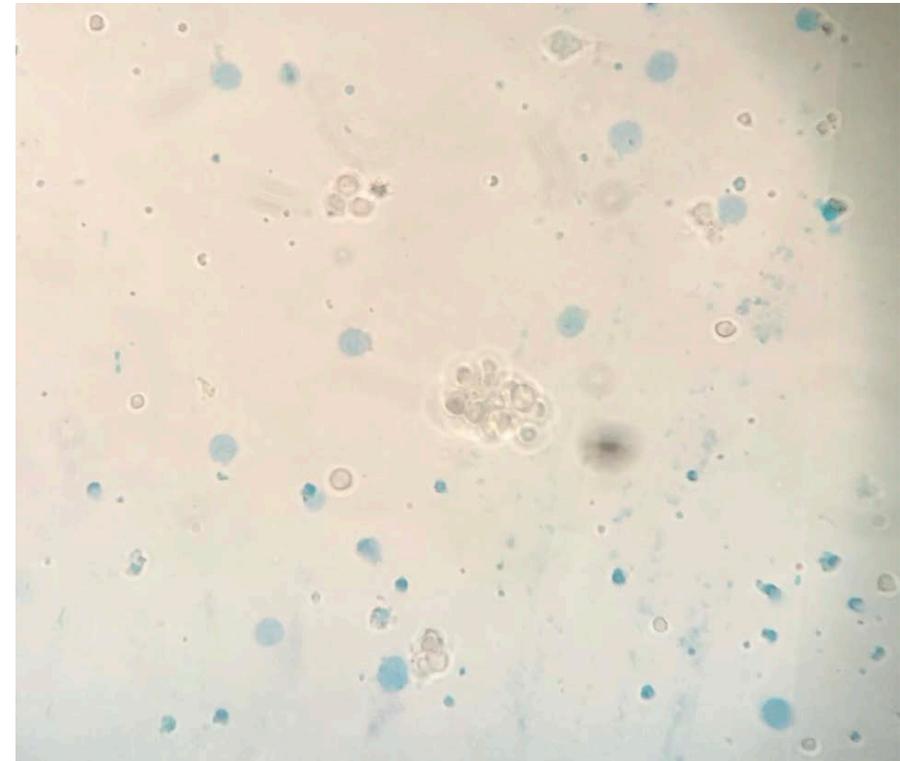
- Транспортировка материала производится в теплом (37-38,5° С) физиологическом растворе с добавлением антибиотиков (гентамицин+стрептомицин);
- Поставка должна осуществляться не позднее 2х часов с момента отбора первого яичника;
- При получении материала яичники необходимо извлечь из транспортировочного раствора, отсечь лишние ткани (брыжейка, часть яйцевода, сосуды), опустить яичник в 70% спирт и через пару секунд вытащить, прополоскать в стерильном физиологическом растворе с добавлением антибиотиков, перенести в стакан со стерильным физиологическим раствором;
- яичники перенести в рабочий бокс.

ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ

- Подготовить чашку Петри, добавить в нее теплого ($37,5-38,5^{\circ}\text{C}$) физиологического раствора.
- Зафиксировать хирургическим пинцетом яичник за его основание (место крепления брыжейки, рога матки, сосудов);
- Одноразовым инсулиновым шприцом производить аспирацию фолликулярной жидкости;
- По мере наполнения шприца переносить ФЖ в центрифужную пробирку
- ВАЖНО: при переносе клеток в пробирку поршень шприца не давим с силой, не бьем струей ФЖ в пробирку! Сливаем осторожно, по стенке пробирки.

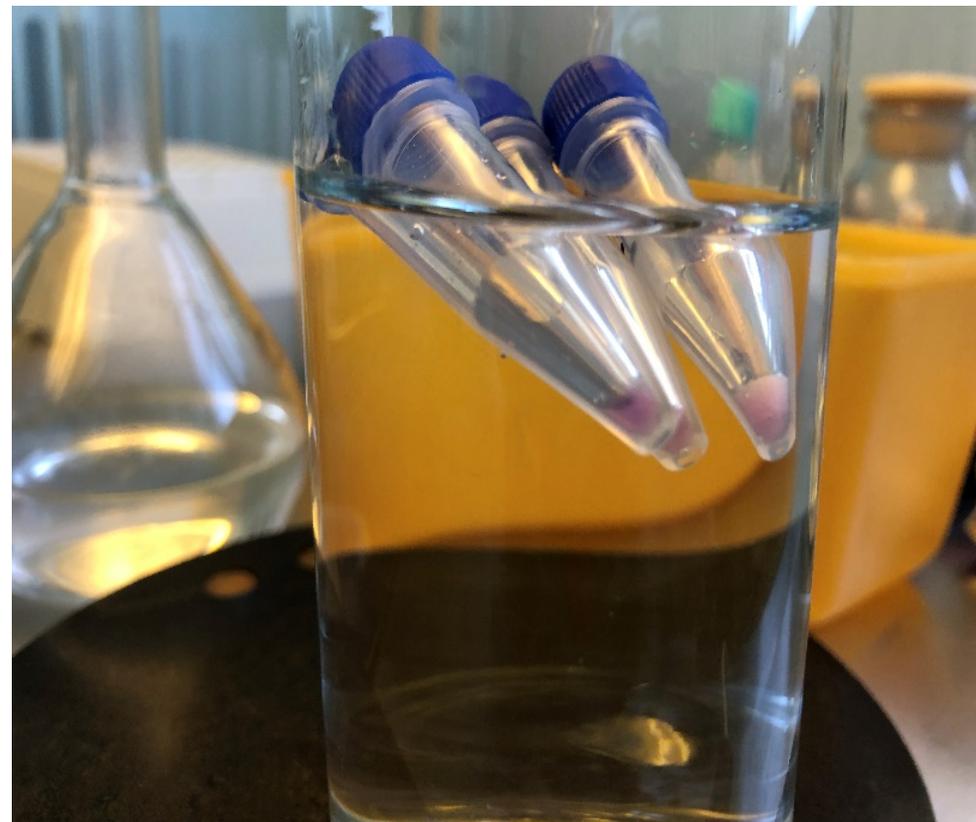
ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ

- Далее клетки центрифугируем при 600 об/мин в течение 5-6 мин;
- Дважды отмываются PBS с добавлением антибиотика;
- Часть отбирается для анализа на жизнеспособность (трипановый синий);
- Процент живых клеток должен составлять не менее 60%.



ДЕВИТРИФИКАЦИЯ

После извлечения клеток из дьюара криопробирки немедленно переносятся на водяную баню на 120 с.



ДЕВИТРИФИКАЦИЯ

- Поэтапное экспонирование клеток в растворе с понижающейся концентрацией трегалозы также сопровождается центрифугированием. Клетки также необходимо центрифугировать немного дольше обычного (в силу насыщенности раствора сахарами).
- После выдерживания клеток в растворе для витрификации их необходимо тщательно отмыть от оставшихся криопротекторов и трегалозы: производится двойная отмывка в PBS с антибиотиком и минимум один раз в среде для культивирования.
- После этого клетки оцениваются на жизнеспособность трипановым синим и исходя из концентрации живых клеток проводится их перенос на культивирование.



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

