

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

**Левченко Владимир Михайлович**

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ  
СВОЙСТВ ФИБРОБЛАСТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ  
ЖИВОТНЫХ**

06.02.01 – Диагностика болезней и терапия животных,  
патология, онкология и морфология животных

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук, профессор  
Беляев Валерий Анатольевич

Ставрополь – 2017

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ	3
Основная часть	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Морфофункциональные особенности и культуральные свойства фибробластов	9
1.2. Области применения культур клеток фибробластов	15
1.3. Питательные среды для культивирования фибробластов	20
1.4. Методики культивирования фибробластов	25
1.5. Оценка жизнеспособности культуры фибробластов	31
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Материалы и методы исследований	35
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
2.2.1. Получение культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, соответствующих требованиям ОФС.1.7.2.0011.15	44
2.2.2. Морфологическая характеристика фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM	48
2.2.3. Сравнительная функциональная характеристика аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования на среде DMEM	78
2.2.4. Оценка жизнеспособности культур клеток аутологичных дермальных фибробластов при их культивировании в среде DMEM по усовершенствованной методике	82
3. Заключение	89
Выводы	93
Практические предложения	95
Список литературы	96

## Введение

**Актуальность темы.** Переход экономики Российской Федерации на рыночные отношения и вступление страны в ВТО, экономическая блокада обуславливают экономически эффективное и рентабельное ветеринарное обслуживание животноводства, а также повышение эффективности производства животноводческой продукции.

Благодаря успехам в области клеточных технологий и началом их широкого применения в клинической практике получило активное развитие новое направление в гуманной медицине – клеточная терапия. Среди наиболее перспективных и успешных областей использования культур клеток можно выделить лечение повреждений кожи посредством дермальных фибробластов, которые, благодаря своей эффективности и относительно небольшой себестоимости, прочно заняли определенную нишу (В.Л. Зорин, А.И. Зорина, О.С. Петракова, В.Р. Черкасов, 2009; К.Н. Ярыгин, В.А. Ступин, В.В. Бурунова, Г.В. Ставицкая, Н.Е. Мантурова, Т.О. Смирнова, 2010).

В настоящее время одной из актуальных задач современной ветеринарной науки является поиск и внедрение в производство дешевых, доступных и эффективных лекарственных препаратов и способов лечения.

Одним из важных направлений в развитии клеточных технологий является модификация существующих методик, используемых для восстановления структурной целостности и функциональной активности поврежденных тканей и органов. Использование традиционных методов лечения в терапии повреждений различной этиологии не всегда приводит к регенерации структурной целостности ткани. Заживление значительных повреждений кожи заканчивается образованием рубца, который нарушает структуру и функции ткани, исключение составляет восстановление поврежденной эмбриональной ткани, которое происходит без рубцевания. (Н.М. Юдинцева, 2010; Е.Н. Любченко, 2003).

Основной группой клеток, которая создает в процессе морфогенеза структурную основу для формирования кожи и её регенерации после повреждения, являются клетки фибробластического ряда (Fisher, G, 1996).

Изучение морфофизиологических фундаментальных процессов в модельных системах *in vitro* позволяет нам рассчитывать на более глубокое понимание роли фибробластов в процессах регенерации, с выявлением особенностей свойственных разным видам животных. (Ю.К. Скрипкин, А.А. Кубанова, В.А. Самсонова, 1994; Л.А. Болдатова, 2009).

Изучение как отечественной, так и зарубежной литературы показало, что в ветеринарной медицине задачи, касающиеся сравнительного изучения морфофункциональных свойств и оценки жизнеспособности культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, никогда ранее не решались.

### **Степень разработанности**

Освещением вопроса, касающегося морфологии и функциональной активности фибробластов человека, в нашей стране занимались Н.М. Юдинцева (2010), Л.А. Болдатова (2009), А.С. Мельчиков и Н.М. Мельчикова (2010), за рубежом Kim B.C. (2003), Stevens D.L., Vance D.A., Goodhead D.T. (2002).

Изучением вопроса внедрения клеточных технологий в гуманную медицину занимались В.Л. Зорин, А.И. Зорина (2009), Г. С. Рунова (2000), И. А. Новикова (2000), А.И. Ерохин (2002), С.В. Смирнов, А.В. Васильев, И.В. Киселев (2003), И.В. Урываева (2009), В.И. Скворцова (2008,2009), Д.Я. Алейник и др.(1996).

В зарубежной практике над проблемой клеточной терапии патологий различного происхождения работали Bruder S.P. (1998), Kassem M. (2004), Dezawa M. (2005), Miyahara Y. (2006), Tang J. (2006), Zhang D. (2007), Aggarwal S. (2005), Di Nicola M. (2002), Beyth S. (2005); Quirici N. (2002).

В современной научной литературе встречается ограниченное количество информации относительно методик культивирования

фибробластов сельскохозяйственных животных, их морфометрических показателей.

**Цель работы:** изучить морфофункциональные свойства культур клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, провести оценку их жизнеспособности.

**Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи исследования:**

1. Получить культуры аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, соответствующие требованиям ОФС.1.7.2.0011.15.
2. Провести сравнительное исследование общего состояния монослоя (внешний вид и форма клеток, количество отростков, площадь монослоя).
3. Провести сравнительные морфометрические исследования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных.
4. Провести сравнительные исследования функциональной активности аутологичных дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных на основании скорости адгезии клеток, изменения оптической плотности ядра, количества синтезируемого проколлагена и жизнеспособности клеток по энтропийному эквиваленту.

**Научная новизна.** Впервые были проведены сравнительные морфологические и морфометрические исследования и дана сравнительная характеристика функциональной активности аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, культивируемых *in vitro*, оценена их жизнеспособность на основании энтропийного эквивалента.

Изучение как отечественной, так и зарубежной литературы показало, что в ветеринарной медицине задачи, касающиеся сравнительного изучения

морфофункциональных свойств и оценки жизнеспособности культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, никогда ранее не решались.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В результате комплексных исследований получены фундаментальные данные о морфологических особенностях, таких, как длина, ширина, форма клеток, площадь монослоя, и клеток и функциональных особенностях, таких, как оптическая плотность ядра, ЯЦО, скорости адгезии и пролиферации клеток, синтез проколлагена аутологичными дермальными фибробластами сельскохозяйственных животных, культивируемых *in vitro*, а также данные об их жизнеспособности. Которые расширяют сведения о культурах фибробластов сельскохозяйственных животных.

Материалы исследований используются в учебном процессе и научных исследованиях в ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I», ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия», ФГБНУ «Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт».

**Методология и методы исследования.** Методологической основой исследования является: определение общего состояния монослоя (внешний вид и форма клеток, а также их количество и площадь монослоя), определение морфометрических показателей (длины, ширины, площади, ЯЦО), функциональных особенностей (адгезии клеток, оптической плотности ядра и количество синтезируемого проколлагена, для определения функционального состояния клетки и расчет энтропийного эквивалента для оценки жизнеспособности полученных культур клеток.

В работе использован комплексный методологический подход к исследованию морфологических показателей и функциональных особенностей дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных,

морфометрические методы исследования, а также статистические методы обработки результатов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

**1.** Морфологические показатели клеток и монослоя культур аутологичных дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования склонны к динамической вариативности.

**2.** Функциональная активность аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при выращивании на среде DMEM отличается временем проявления максимальных пиков показателей адгезии и синтезируемого проколлагена.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность полученных результатов подтверждена статистической обработкой данных. Исследования выполнены с использованием современных методов. Результаты исследований опубликованы в рецензируемых научных журналах и источниках и апробированы на специализированных научных конференциях.

Основные положения диссертации были представлены, обсуждены и охарактеризованы на 79 – 81 научно-практических конференциях «Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных» ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» (Ставрополь, 2013 – 2016 гг.); Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса (Ставрополь, 2015).

**Личный вклад соискателя.** Организация и проведение экспериментальной части работы, отбор и анализ проб для исследования, а также статистическая обработка результатов выполнялись лично автором в течение 3-х лет.

Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85%.

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 работы в изданиях, входящих в Перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций («Вестник АПК Ставрополя», «Известия Оренбургского государственного аграрного университета», «Научный журнал Кубанского государственного аграрного университета»).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований, заключения, выводов, списка литературы. Содержание работы изложено на 116 страницах машинописного текста, включая 19 таблиц и 22 рисунка. Библиографический список состоит из 170 источников, в том числе 61 иностранных авторов.



## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Обзор литературы.

#### 1.1. Морфофункциональные особенности и культуральные свойства фибробластов

К концу XX века, опираясь на многочисленные и противоречивые данные, была сформирована обоснованная концепция о наиболее часто встречаемых типах клеток соединительной ткани – фибробластах, которая объединила в себе информацию об их строении, свойствах и функциях. Однако до настоящего времени предметом неутихающей дискуссии остаются вопросы, касающиеся их происхождения, миграции, морфофункциональной гетерогенности, дифференцированного потенциала и других фундаментальных свойств (Н. Г. Хрущев, 1976; В. В. Серов, А. Б. Шехлер, 1981; Н.А. Юрина, И. А. Радостина, 1990; Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий, 2009; И. Я. Бозо, Р.В. Деев, Г.П. Пинаев, 2010; Л.И. Борло, 1990). Целенаправленное изучение клеточного состава соединительной ткани началось еще в XX веке и связано с трудами ученых, ставших классиками – основоположниками гистологических школ.

Еще в 1918 году Максимов высказал предположение, что фибробласты представляют собой «самую обычную, постоянную принадлежность соединительной ткани, и именно в рыхлой волокнистой соединительной ткани все характерные их особенности выступают особенно отчетливо» (И. Я. Бозо, 2010; А.А. Максимов, 1914-1915). Данное высказывание общепринято, в связи с чем наибольшее количество исследований как *in vivo*, так и *in vitro* связано с фибробластами рыхлой волокнистой ткани (Н. Г. Хрущев, 1979; Н.А. Юрина, И. А. Радостина, 1990; M. Cario-Andre, C. Pain, Y. Gauthier, V. Casoli, A. Taieb, 2006).

Учеными всего мира собраны немногочисленные сведения, которые в сравнении являются антиномиями относительно вопросов размера и формы клеток. Так, отечественный ученый А.А. Заварзин (1939 г.) описывает их как уплощенные неправильной формы пластинки, размером 20 – 30 мкм

недифференцированные незрелые формы и 40 – 50 мкм у фиброцитов (А.А. Заварзин 1939 г.). Эти данные подтверждают работы (N. Morimoto, Y. Saso, K. Tomihata et al., 2003; Г.А. Данлыбаева, В.Т. Кумашева, А.М. Мынбай, А.Н. Искакова, В.Б.). С. Л. Кузнецов в своих работах описывает фибробласты как вытянутые веретенообразные клетки, имеющие отростки, с овальными ядрами, которые по происхождению развиваются из стволовых клеток мезенхимального происхождения, размер клеток колеблется от 20 – 25 мкм у недифференцированных форм и 40 – 45 мкм у зрелых фибробластов (С.Л. Кузнецов, 2007, Н.Н. Золоповицкая, 2006). По данным зарубежных ученых М.Н. Ross и Wojciech Pawlina (США), фибробласты являются ведущими клетками рыхлой соединительной ткани, по форме напоминающими отростчатые, веретеновидные или же распластанные клетки, размер которых колеблется в пределах 20-25 мкм (Michael H. Ross, Wojciech Pawlina, 2011).

Ricardo Cornejo Uribe и Fernando Matamala Vargas в своей работе занимались исследованиями электронных микрофотографий, полученных из нормальных фибробластов кролика, и фибробластов кролика, облученных инфракрасным лазером в дозе 10 Дж/см<sup>2</sup>. Морфометрические анализы проводили с помощью статистического теста Уилкоксона. В результате проведенных исследований были получены следующие результаты: размер не облученных фибробластов составлял 82 мкм, а подвергшихся инфракрасному облучению составил 35 мкм. (R. C. Uribe, F. M. Vargas, 2010).

Фибробласты обладают округлым или овальным ядром, которое содержит 2 или 3 ядрышка. Интенсивно окрашивается эндоплазма, поскольку в ней содержатся органоиды, гомогенная эктоплазма, из-за чего контуры клеток не резко выражены и в своем роде переходят в межклеточное аморфное вещество. У взрослых животных с сильно развитой соединительной тканью, например, у собак, а также у человека эти клетки сохраняют лишь небольшое количество цитоплазмы; такие высокодифференцированные клетки обычно называют фиброцитами (А.И. Зорина, И.Я. Бозо, В.Л. Зорин, 2011; А. Хэм, Д. Кормак, 1983).

Фибробласты имеют мезенхимальное происхождение (мезенхима – эмбриональная соединительная ткань) (В. В. Серов, А. Б. Шехлер, 1981). Среди мезенхимальных клеток встречаются стволовые клетки (J.A. Brown, 2004). В свою очередь, стволовые клетки подразделяются на: полустволовые, клетки-предшественники, малоспециализированные фибробласты, дифференцированные фибробласты (зрелые, активно функционирующие), фиброциты, миофибробласты и фиброкласты (G. Parsonage, A. D. Filer, Haworth O. et al, 2005; Н.С. Юдинцева, 2010; R. Abe, S.C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala, C.N. Metz, 2010; D.J. Abraham, B. Eckes, V. Rajkumar, Krieg T., 2007; Степанова, 1999; A.J. Friedenstien, K.V. Petrakova, A.I. Kurolesova, G.P. Frolova, 1968).

В настоящее время учеными обоснованно доказано, что основной функцией фибробластов является активный синтез компонентов межклеточного вещества, волокон, тропоколлагенов, предшественников коллагена, коллагенов I и II, III, IV, V типов, межклеточный матрикс ламинин, нидоген, тинасцин, протеогликан, фибронектин (N. Verzijl, J. De Groot, S.R. Thorpe, R.A. Bank, J.N. Shaw, T.J. Lyons, J.W. Bijlsma, F.P. Lafeber, J.W. Baynes, J.M. Te Koppele, 2000; Г.Н Юдинцева, 2010; Varga, 1987; Н. Игнатъева, 2005; D. Watson, G. S. Keller, V. Lacombe et al., 1999; С.Н. Андреев, 2001; P. Betz, A. Nerlich, J. Wilske, J. Tubel, R. Penning, W. Eisenmenger 1993; Андреев, 2012; M. Chanoki, M. Ishii, K. Fukai, H. Kobayashi, T. Namada, Y. Muragaki, A.Ooshima, 1988; С.Н. Андреев, 2001; Н.В. Калмыкова, О.А. Черепанова, Ю.В. Горелик, И.В. Воронкина, М.И. Блинова, Г.П. Пинаев, 2002; Halfter et al., 1990; Калмыкова и др., 2002, К.А. Рубина и др., 2006; Е.В. Глущенко, 1996; Э.А. Крехели, А.А. Згурский, С.М. Терехов, 2004; R. Kalluri, M. Zeisberg, 2006; Б. Албертс, Д. Брей, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Роберте, Д. Уотсон 1994). Также интенсивно протекает метаболизм гиалуроновой кислоты (H. Mentz, A. Ruiz, C. Patronella et al., 2004; D. Hollander, M. Stein, A. Bernd, J. Windolf, A. Pannike, W. Manuskiatti, 1996). Одним из наиболее важных факторов в процессах адгезии и

стимуляции пролиферативных процессов в ране является фибронектин – высокомолекулярный гликопротеин, который синтезируют фибробласты (Е.В. Глущенко, 1996; W.K. Boss, Usal Nakan, P.V. Fedor, G. Chemojif, 2000).

Основные функции, выполняемые дермальными фибробластами, – продукция компонентов МКМ, его организация и обновление, обеспечивая его гомеостаз, регуляционная роль в процессе воспаления, участие в заживлении ран и регуляция процессов дифференцировки эпидермиса (R.Jain, 2003; Т.Ю. Витрук, 2005; J. Sorrell, M. Baber, A. Caplan, 2009; G. Parsonage et al., 2005; R. Kalluri, M. Zeisberg, 2006). За счет секреции факторов роста, таких, как фактора роста кератиноцитов (KGF-1), гранулоцитарно колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF), интерлейкинов (IL-6, IL-8) и непосредственного взаимодействия с эпителиальными клетками, дермальные фибробласты играют ключевую роль в регуляции морфогенеза эпидермиса (J. Корр, 2004; П.П. Маркелова, 2014; М.А. Анциферова, 2002; И.Н. Михайлов, 1979). Фибробласты влияют на формирование базальной мембраны, продуцируя коллаген IV типа и ламинин, (О.М. Alvarez, 1993; К. Байрейтер, 1995; А.А. Бармашева, 2012). Аутологичные дермальные фибробласты обеспечивают опорно-механическую функцию кожи за счет синтеза коллагенов, протеогликанов, эластина и гликопротеинов (R.D. Price, V. Das-Gupta, P.A. Harris, I.M. Leigh, H.A. Navsaria, 2004; К. Байрейтер, 1995). Они также могут оказывать влияние на проницаемость сосудистых стенок и метаболизм, выполняют трофическую функцию за счет способности продуцировать «сигнальные молекулы».

Дермальные фибробласты активно участвуют в ангиогенезе, синтезируя большое количество проангиогенных факторов, таких, как ангиопоэтин-1, VEGFs, FGFs, TGF- $\beta$ 1, HGF/S, синтез которых возбуждает эпителиальные клетки к дифференцировке и миграции эндотелиальных клеток, они способствуют образованию и стабилизации сосудов (А.С. Мельчиков, Н.М. Мельчикова, 2010; A. Horstmeyer, C. Licht, G. Scherr, B.

Eckes, T. Krieg, 2005; P. Shephard, B. Hinz, S. Smola-Hess, J.J. Meister, T. Krieg, 2004; G. Chodorowska, M. Tomczyk, A. Glowacka, 2004; F. Rahimi, K. Hsu, Y. Endoh, 2005; J. Sorrel, M. Baber, A. Caplan, 2003; M. Sorrell, A. Caplan, 2009.). Фибробласты играют важную роль в поддержании иммунитета кожи. В 1989 году С.Г. Larsen была продемонстрирована ключевая роль в реализации механизмов взаимодействия иммунокомпетентных клеток. Были показаны их иммуномодулирующие и иммуносупрессорные свойства в условиях *in vitro*. В 1981 году было показано ингибирующее действие фибробластов на митогенез и пролиферацию Т-клеток (J.H. Korn, 1981). Фибробласты синтезируют ряд ключевых посредников воспаления, одним из которых является фактор транскрипции RelB ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  семейства NF- $\kappa\text{B}$ , оказывают активирующее воздействие на тучные клетки (совместное культивирование дермальных фибробластов и мастоцитов сопровождается усилением продукции последними гистамина) (П.П. Маркелова, 2014, D. Covas, R. Panerussia, Fontes A., 2008).

Дермальные фибробласты *in vivo* характеризуются пластичностью и разнообразием форм, могут иметь овальную, полигональную, веретеновидную или отростчатую форму в зависимости от своего функционального состояния.

В культуре дермальные фибробласты обладают способностью прикрепляться к поверхности культуральной посуды и длительно сохранять пролиферативный потенциал.

Так, дермальные фибробласты характеризуются экспрессией мезенхимных маркеров (CD90, CD73, CD105, CD44, vimentin) и отсутствием эпителиальных, гемопоэтических и эндотелиальных маркеров (CD31, CD34, CD45) (M. Sorrell, A.I. Caplan, 2009; И.Я. Бозо, Р.В. Деев, Г.П. Пинаев, 2010; И.Н. Есаулова, 2009; Covas D., Panerussia R., Fontes A., 2008).

На сегодняшний день два маркера – белок FSP1 (член семейства внутриклеточных белков S100) и белок FAP (белок активации фибробластов) – считаются наиболее специфичными для идентификации фибробластов, но в

тот же момент они не являются эксклюзивными для дермальных фибробластов (А.И. Зорина, 2014, R. Kalluri, M. Zeisberg, 2006; R. Panerussia, A. Fontes et. all, 2008; F. Strutz, H. Okada, C.Lo, 1995). Отсутствие уникальных маркеров означает, что в настоящее время трудно выявить четкие функциональные различия между отдельными представителями обширной «семьи» фибробластов.

Также в плане освещения культуральных особенностей аутологичных дермальных фибробластов хотелось бы остановиться на таком немаловажном факте, как «лимит Хейфлика», который был предложен в 1961 году. L. Hayflick и P.S. Moorhead показали невозможность деления фибробластов бесконечно, даже в идеальных условиях, всего  $50 \pm 10$  раз (L. Hayflick, P.S. Moorhead, 1961). Отмечено, что, проводя культивирование клеток при строгом соблюдении всех правил культивирования, можно проследить закономерность стадий развития клеток в культуре, после исчерпываются возможности клеточного развития и деления, что может продолжаться длительное время. Многочисленными испытаниями ученые наблюдали явление «клеточного старения». (А.Н. Петров, 2007, Э.А. Крехели, С.М, Терехов, 2004).

После открытия «лимита Хейфлика», изучения способности клеток сохранять диплоидный кариотип, нести низкую экспрессию антигенов гистосовместимости и вероятность развития онкоклеток было предложено использовать фибробласты, культивируемые *in vitro*, в терапии различных заболеваний (R. Ross, 1968).

В настоящее время нет четкого представления относительно вопроса о размерах аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, но есть сведения о выполняемых дермальными фибробластами функциях: продукция компонентов МКМ, его организация и регенерация, участие в восстановлении поврежденных тканей, участие в ангиогенезе, а также синтез волокон, тропоколлагенов, предшественников коллагена, коллагенов I и II, III, IV, V типов, межклеточного матрикса, ламинина, нидогена, тинасцина, протеогликана, фибронектина.

## 1.2. Области применения культур клеток фибробластов

Еще в середине XX века были выдвинуты предложения о целесообразности использования культур клеток (кератиноцитов) для лечения ран (P. Madawar, 1948).

Вскоре после установления, что нормальные фибробласты, культивируемые *in vitro*, обладают способностью сохранять диплоидный кариотип, но обладают ограниченной продолжительностью жизни, низкой экспрессией антигенов гистосовместимости, отсутствием онкогенного потенциала, начались активные попытки использовать культивируемые вне организма фибробласты для терапевтических целей (R. Ross, 1968).

Было доказано непосредственное влияние на заживление ран и на эпителизацию пересаженных аллогенных фибробластов (G. Fisher, J. Varani, J. Voorhees, 2008; Froget S, 2003).

В настоящее время собрано большое количество работ, которые свидетельствуют о большой роли факторов роста, выделяемых фибробластами, на эпителизацию кожи (C. Ballaun, W. Weninger, A. Uthman, H. Weich, E. Tschachler, 1995). К ним относятся такие факторы, как: bFGF (основной фактор роста фибробластов), он оказывает положительное влияние на рост всех типов клеток эпидермиса, а также стимулирует синтез фибронектина и коллагена, а также эластина. TGF-beta (трансформирующий фактор фибробластов) оказывает стимулирующее влияние на хемотаксис с фибробластов и стимуляцию выработки новых волокон коллагена (T.A. Beyer, S. Werner, C. Dickson, R. Grose, 2003; D. Wisser, J. Steffes, 2003; R.A.F. Clark, L.D. Nielsen, M.P. Welch, J.M. McPherson, 1995; Н.Н. Аксенова, 2014). В F. Chen с соавторами доказали влияние TGF-alpha на ангиогенез. EGF (эпидермальный фактор роста) стимулирует миграцию и пролиферацию кератиноцитов. (F. Chen, W. Zhang, D. Bi, W. Liu, X. Wei, L. Zhu, L. Cui, Y. Cao, 2009).

Все вышеизложенное доказывает влияние продуцируемых фибробластами факторов роста на ускорение процессов заживления и восстановления пораженной дермы.

Наибольшее внимание со стороны исследователей и практиков уделяется возможности пересадки культуры клеток на раны различной этиологии, что теоретически, а как было доказано позже, и практически, способствует ускорению регенерации раневого дефекта (Н.Н. Золотовицкая, 2007; Н.Р. Тафришьян, 2007, J. Корр, 2004; Косов И.С., 1994; А.В. Низовой; Саркисов Д.С., 1996).

Так, в 1971 году впервые была проведена пересадка кератиноцитов первичной культуры, выделенных из кожи кролика, на экспериментальные кожные дефекты этого животного (M. Karasek, M. Charlton, 1971). В 1976 г. Green с соавторами показали перспективы лечебного применения клеточной культуры кератиноцитов в восстановлении кожного покрова, и ими же была разработана технология серийного культивирования больших количеств кератиноцитов человека.

В 1994 году коллективом ученых лаборатории ISOLAGEN (Великобритания) впервые были применены и доказаны безопасность и клиническая эффективность аутологичных фибробластов кожи для коррекции морщин и рубцов (Золотовицкая Н.Н., 2007).

В настоящее время для лечения различных заболеваний кожи применяются как аллогенные, так и аутологичные фибробласты. При применении аутологичных фибробластов в отличие от аллогенных фибробластов исключен риск возникновения аллергических реакций, не возникает проблема поиска донора, а также наблюдается длительный клинический эффект.

Широкое применение получили аллогенные клетки в составе так называемого «кожного эквивалента».

На настоящий момент в отечественной и зарубежной научной литературе накоплено большое количество информации в плане применения



культур клеток фибробластов. Чаще всего встречается информация о применении культур клеток фибробластов в регенеративной медицине в странах с развитой рыночной экономикой (Великобритания, Германия, Испания, США, Канада, Япония) (В.Л. Зорин, А.И. Зорина, В.Р. Черкасов, 2009), косметологических целях: для нехирургической коррекции возрастных изменений кожи, что отражено в работе (J. Apesos, M. G. Muntzing, 2000). С целью коррекции атрофических рубцов, липодистрофии и склеродермии (W. Schmeller, I. Meier-Vollrath, 2003) сотрудниками лаборатории Cytori Therapeutics Inc. (США) была разработана технология, получившая название «клеточная реконструкция» (Cell-Enhanced Reconstruction), технология предназначена для реконструктивной хирургии, а сущность её заключается в использовании трансплантированных мягких тканей в сочетании со стволовыми клетками пациента, выделенными из жировой ткани.

Г. Келлер, Дж. Себастиан, Ю. Лакомбе представили в 2000 году данные клинических исследований в области применения аутологичных фибробластов с целью восполнения дефектов мягких тканей лица.

Отечественными учеными признано перспективным применение аутологичных дермальных фибробластов в эстетической медицине и дерматологии. В связи с вышеизложенным коллективами ученых факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, компании «Генная и клеточная терапия» и клиники «Деваль – Жальде» были проведены обширные исследования в области биологической безопасности применения фибробластов кожи человека для улучшения состояния кожи (В.Ю. Сысоева, 2008; К. А. Рубина, 2008). Также на базе ООО «Институт красоты» (г. Самара) и Самарского государственного медицинского университета были проведены клинические испытания аутологичных дермальных фибробластов с целью устранения дефектов кожи (Н.Н. Золоповицкая, А.В. Колсанов, В.Д. Иванова, Л.Т. Волова, 2006).

Помимо разрозненной информации о применении фибробластов в области косметологии и эстетической медицины, накоплен небольшой объем

информации о применении фибробластов в других отраслях гуманной медицины. Так, в 1990 году коллективом Института хирургии им. В.А. Вишневского РАМН, возглавляемым академиком Д.С. Саркисовым, был разработан и внедрен в клиническую практику метод для лечения обширных ожоговых ран с использованием культуры клеток аллогенных фибробластов (А.Н. Петров, 2007, Д.С. Саркисов, В.П. Туманов, 1990; В.Д. Федоров, Д.С. Саркисов, 1993; Д.С. Саркисов, А.А. Алексеев, 1994, В.П. Туманов 1998, 1999, Тафришьян Н.Р., 2007, Н.Т. Алексеева, 2012). Основываясь на работах Д.С. Саркисова, И.О. Слипченко была разработана методика лечения ран, основанная на применении аллогенных фибробластов, культивируемых *in vitro* (И.О. Слипченко и др., 2004). Н.Ф. Сергиенко был разработан способ лечения мочевого свища с использованием аллогенных фибробластов (Н.Ф. Сергиенко, 1999). В 2003 году были рассмотрены современные подходы клеточной терапии при лечении ожогов (С.В. Смирнов и др., 2003, Е.Ю. Бурда, 2005).

В 2000-х годах Г. С. Рунова, И. А. Новикова, А.И. Ерохин установили, что применение культивированных фибробластов в хирургической практике с целью оптимизации раневого заживления обусловлено высокой терапевтической эффективностью фибробластов вследствие активации ими белкового синтеза, выделением факторов роста и усилением регенерации тканей (Г. С. Рунова, 2000г., И. А. Новикова, 2000г., А.И. Ерохина, 2002г.; А.И. Грудянов, 2006).

Также в 2000 году В.П. Туманов и В.П. Пальчун разработали высокоэффективный метод мирингопластики культурой аллофибробластов человека с использованием синтетической мембраны. В 2000 году был разработан способ восполнения структурной целостности голосовых связок культивированными фибробластами. (Г.С. Берк, Дж.Х. Блюмин, Дж.Л. Себастиан, Г.С. Келлер, Е.С. Ревазова, 2000). Ю. Е. Бурдой был разработан метод местного лечения неспецифического язвенного колита фармакологически модифицированными эмбриональными фибробластами

(Ю.Е. Бурда, 2000). В 2001 году О.С. Озерской был предложен способ косметической коррекции нормо- и гипертрофированных рубцов кожи с использованием многослойной культуры аутологичных керратицитов (О.С. Озерская, 2001). В 2002 году отечественными учеными проводились исследования о влиянии супернатанта аллогенных эмбриональных фибробластов на функциональную активность нейтрофилов (Ю.Е. Бурда, 2002).

В литературе встречается информация о применении аутологичных фибробластов в такой сложнейшей области пластической хирургии, как восстановительная коррекция повреждений голосовых связок, устранении дефектов и атрофии голосовых связок (С.В. Иванов, А.А. Должиков, И.С. Иванов, А.А. Мартынцев, 2010).

Дермальные фибробласты нашли широкое применение в медицине в таких её областях, как косметология, лечение обширных ожогов, мирингопластике. В ветеринарной практике клеточные технологии, а в частности использование клеточных препаратов дермальных фибробластов является перспективным.

### 1.3. Питательные среды для культивирования фибробластов

Ключевую роль в пролиферации, дифференцировке и выживаемости клеток в условиях *in vitro* играют культуральные среды, которые обеспечивают необходимые условия для роста и жизни клеток, такие же, как в живом организме. Питательная среда должна обеспечивать молодые клетки питательными и гормональными факторами (А.Г. Гунин, Н.К. Корнилова, В.В. Петров, О.В. Васильева, 2011).

Питательная среда – это вещество или смесь веществ, применяемая для культивирования макро - и микроорганизмов. В настоящее время известно большое количество стандартных биологических питательных сред (Ф.К. Черкес, 1987).

Для культивирования клеток в лабораторных и промышленных условиях используется огромное количество питательных сред.

Для удовлетворения всех необходимых пищевых и энергетических потребностей, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к питательным средам, все вещества содержатся в легкоусвояемом виде. Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты неясного биологического происхождения (добавки плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты и т.д.). Чаще всего основным компонентом питательных сред являются солевые растворы. В основном для приготовления культуральных сред используют солевые растворы Дульбекко, Эрла и Хенкса. Вышеперечисленные растворы, как и фосфатно-солевой буфер Дульбекко и Фогта, применяют для орошения и промывки клеток при их пассировании, выделении клеточных линий и других манипуляциях с культурами клеток. Минеральные составляющие растворов культуральных сред подобраны таким образом, что раствор может обеспечивать буферные функции, поддерживая в среде оптимальный кислотно-щелочной баланс в процессе культивирования. Еще одним очень важным условием для культивирования клеток является осмотическое давление среды. Также оказывает влияние на

проницаемость клеточной мембраны и усвояемость питательных веществ, оптимальный показатель рН среды и осмолярность, по которому они должны быть сбалансированы. Например, для клонального роста диплоидных фибробластов человека WI38 оптимальны рН=7.30 + 0.15 и осмолярность 285 + 40 мосмоль/кг, а для фибробластов из эмбриона цыпленка 7.12 + 0.18 и 300 + 20 соответственно (Лабинская А.С., 1978; Меджидов М.М., 2003).

В настоящее время для ведения культур животных клеток используют стандартные среды, к которым относятся:

- Среда Игла: minimal essential medium (MEM) и basal medium(BME) Eagle.

Чаще используется minimal essential medium (MEM), поскольку в ней содержатся 13 незаменимых аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, минеральные вещества, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. MEM используется только при добавлении к ней сыворотки, поскольку в ней отсутствуют биотин, витамин В<sub>12</sub>, ионы железа и микроэлементы. Основу данной среды составляет раствор Эрла (Питательные среды и условия культивирования в биотехнологии, 2014; А.А. Лактионова, 2011).

- Среда Дульбекко DME или DMEM (двойная модификация среды Игла).

Среды DME и DMEM применяют при культивировании клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридом, они являются основой для бессывороточных сред. Отличительной особенностью сред Дульбекко является двойная концентрация аминокислот, наличие в составе среды глицина, серина, пирувата, железа. При использовании сред DME и DMEM важным фактором является наличие углекислотного инкубатора с 10% концентрацией CO<sub>2</sub>.

- Среда Искова (IMDM) – представляет собой модификацию среды Дульбекко, за счет добавления незаменимых аминокислот, биотина, витамина В<sub>12</sub>, селенитанатрия.

В эту среду дополнительно вводили NEPER и уменьшили концентрацию NaCl и NaHCO<sub>3</sub>. Наиболее часто эту среду используют для продуцирования клеток крови: лимфоцитов и гемоцитобластов (Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина, 2012).

- Среда МакКоя и среды RPMI. После ее модификации Ивкатом и Грейсом (RPMI), эти среды добавляют для культивирования лейкоцитов, но с добавлением сыворотки, также они нашли свое применение для культивирования гибридов. Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, при его содержании 5% (Ю.Б. Вахтин, 1988)
- Среда 199 была разработана еще в 1950 году, в частности для культивирования клеток сердечной мышцы эмбриона цыпленка. Для первичных клеток не требует добавления дополнительных веществ, но для быстроразмножающихся требуется добавление сыворотки.

Добавление в культуры 5 - 20% фетальной (эмбриональной) сыворотки является необходимым условием для культивирования функциональных клеток (Е.М. Вечканов, И.А. Сорокина, 2012).

Ко всем средам, которые используются для выращивания культур клеток, предъявляются следующие основные требования:

- 1) Все среды, используемые для культивирования, должны быть изотоничны для культуры клеток (А.С. Лабинская, 1978; М.М. Меджидов, 2003);
- 2) Особое внимание уделяется стерильности, так как посторонние микроорганизмы влияют на рост культуры клеток и способны изменять свойства среды (Д.А. Проценко, 2016);
- 3) Плотные питательные среды, применяемые для культивирования клеток, должны иметь оптимальную консистенцию и быть влажными (М.М.Меджидов, 2003);
- 4) Культуральные среды должны быть унифицированными, то есть их количественный и качественный состав постоянен (Лабинская А.С., 1978).

Рекомендуется, чтобы среды были прозрачными – так как это удобнее позволяет наблюдать за ростом культур, и способствует более легкому выявлению загрязнения среды посторонними микроорганизмами.

Тутов И.К. и Ситьков В.И. классифицируют питательные среды по их назначению: основные и селективные (избирательные). Среда становится селективной при добавлении к ней определенных антибиотиков, солей, изменения рН. Жидкие селективные среды также называют средами накопления; консервирующие – предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала; производственные (Тутов И.К., Ситьков В.И., 1997).

В настоящее время имеется огромное количество разнообразных сочетаний сред с разными добавками к ним.

Группой советских ученых в 1980 году предложен способ получения перевиваемого штамма фибробластов эмбриона овцы, продуцирующий бычий лейкозный вирус. Сущность данного метода заключается в культивировании фибробластов эмбриона овцы, выделенных из кожно-мышечной ткани в культуральной среде следующего состава: среда Игла 60%, 0,5% гидролизат лактальбумина 25%, инактивированная бычья сыворотка 15%, с добавлением антибиотиков пенициллина 200 ед./мл, стрептомицина 50 ед./мл, канамицин 100 ед./мл. (Р.А. Кукайн и др., 1980).

В 2008 году был запатентован способ культивирования фибробластов человека для заместительной терапии, используя следующий состав культуральной среды: DMEM, 10% ЭБС, 100 ед./мл стрептомицина, 100 ед./мл фунгизона, 100 ед./мл пенициллина (Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук, Н.И. Калинина, К.А. Рубина, Т.Л. Друбич, М.А. Балашова, 2010).

По имеющимся литературным данным был успешно апробирован состав культуральной среды, при которой фибробласты культивируются в стандартной среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 20% сыворотки FBS Defined (HyClone, США), 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) в течение 14 сут. (В.Л. Зорин, П.Б. Копнин, А.И. Зорина, И.И. Еремин, Н.Л.

Лазарева, Т.С. Чаузова, Д.П. Самчук, А.П. Петрикина, П.С. Еремин, И.Н. Корсаков, О.С. Гринаковская, К.В. Котенко, А.А. Пулин, 2014)

Существуют и описаны способы культивирования фибробластов на малосывороточных и бессывороточных средах. По информации, предложенной в патенте SU 1735360 Ф1 «Питательная среда для перевиваемых клеток млекопитающих», описывается конструирование питательной среды, содержащей гидролизат казеина в качестве источника пептидов и аминокислот, используемого совместно с поливинилпирролидоном. Содержание сыворотки крупного рогатого скота (СКРС) в предложенной рецептуре среды составляло 1%. Заявленная рецептура среды обеспечивала ростовые свойства в культуре перевиваемых клеток ВНК-21 (с.13). Патент RU 2107724 С1 «Способ получения жидкой стерильной питательной среды на основе ферментативного гидролизата» заявляет создание компонентов питательной среды с включением ферментативного гидролизата мышечной ткани рогатого скота с отдельной стерилизацией в сухом виде облучением и последующей реконструкцией. Количество добавляемой сыворотки (СКРС) в используемой среде снижено до 5%. Существует модифицированный вариант описанного выше патента - RU 2201958 С2 «Сухая стерильная малосывороточная питательная среда для культивирования клеток млекопитающих» заявляет получение многокомпонентной сухой рецептуры среды на основе ферментативного гидролизата мышечной ткани с длительными сроками хранения и резко пониженным содержанием СКРС (до 2%).



#### 1.4. Методики культивирования фибробластов

В настоящее время накоплено большое количество информации о способах культивирования клеток как растений, так и животных, в частности разработано много методик культивирования фибробластов человека (Макеев О.Г. 2008,2011; Ю.К. Скрипкин, 1994). Однако в ветеринарной науке такого рода информация вовсе отсутствует или встречается в малом количестве (Н.Н. Аксенова,2014).

Что касается исторического аспекта развития технологий и методик выращивания клеток, то они неразрывно связаны с выращиванием тканевых культур или целых органов (Н.Т. Алексеева, 2014; Е.В. Зыкова, 2015; Л. В. Туроверова,2010; В.И. Хрупкин, 1998).

Первые опыты по сохранению жизнеспособности клеток и тканей вне организма продемонстрировал W. Roux в 1885 году, с этого момента и начинают свое развитие методики культивирования клеток (Т.Ю Витрук, 2005, W.Roux,1885).

Культура клеток фибробластов представляет собой относительно однородную популяцию пролиферирующих клеток при низкой плотности монослоя ( $\sim 10^4$ клеток/см<sup>2</sup>) и столь же однородную популяцию более дифференцированных непролиферирующих клеток при высокой плотности монослоя ( $10^5$  клеток/см<sup>2</sup>) (К.И. Байрейтер, 1995; А. Арсений,1976; Р. Фрешни, 1989; D. Supp, K. Wilson-Landy, S. Boyce, 2002).

Хотя отдельные попытки выращивания тканей вне организма предпринимались в разное время многими авторами (Л. Лёб, 1969). Основателем современной методики тканевых культур следует признать Р. Гаррисона (R. Harrison), который ввел основные принципы выращивания тканей вне организма (необходимость опоры для движения и роста клеток, малую величину эксплантированных тканей для облегчения обмена веществ, необходимость стерильности среды и асептики всех манипуляций и другие методы (А.Б. Лига, 2009, Н. А. Семашко, Крупа-Лексер, 1930).

Впервые методика для культивирования фибробластов была разработана в 1968 году для лечения ран (Ross, 1968).

В 1981 году С.М. Тереховым был разработан и опробован на практике усовершенствованный метод культивирования фибробластов человека, сущность способа состояла в том, что фибробласты человека, которые получали из кожно-мышечной ткани 7-8-недельных эмбрионов человека, культивировали в среде Игла, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота. В логарифмической фазе роста проводят трипсинизацию клеток с помощью 0,02% раствора Версена и 0,25% раствора трипсина при 4°C (2 мин) с последующей инкубацией в термостате при 37°C (до 10 мин).

На чашки Петри (диаметром 35 мм) высевает клетки в концентрации 500-100 кл/мм<sup>2</sup>. Чашки Петри с клетками инкубируют в условиях насыщающей влажности при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> (О.В. Квитко, Л.Н. Николаевич, 1994).

Н.С. Юдинцевой с соавторами была разработана методика культивирования клеток на полимерной пленке с целью трансплантации на ожоговые раны (Н.Р. Тафришьян, 2007, Н.С. Юдинцева и др., 1999)

Также существует способ культивирования фибробластов, описанный в работе Щеголева В.В. Сущность метода заключается в том, что аллогенные фибробласты выделялись из кожи новорожденных крысят. Кожу промывали раствором Хенкса, который содержит 200 мкл. гентамицина, она измельчалась на маленькие кусочки, площадь которых составляла 0,2 – 0,5 см<sup>2</sup>. Кусочки кожи инкубировались в 0,5% растворе диспазы сбалансированном фосфатно-солевом растворе при температуре окружающей среды 37°C в течение часа. После этого кусочки кожи переносились в буферный фосфатно-солевой раствор Дульбекко, где механически производилось отделение эпидермиса от дермы. Отделенную дерму инкубировали в 0,125% растворе трипсина в течение 15 минут при постоянном перемешивании, остановку действия трипсина производили добавлением 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота.

Суспензию клеток центрифугировали при 1000 об./мин. Клеточная суспензия высевалась на чашки Петри, культивирование производили в течение 6 дней в среде FAD, которая состоит из смеси сред DMEM с добавлением среды F12 в пропорции 3:1, с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 5 мкг/мл инсулина (Sigma, США), 0,5 мкг/мл гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США) и 10 мкг/мл эпидермального фактора роста (В.В. Щеголев, 2009).

Известен опыт культивирования фибробластов овцы, который выполнялся по следующей методике: производилась биопсия кожи у основания ушной раковины животного; отсеченный кусочек погружался в среду с питательной средой DMEM с добавлением L – глутамина, сыворотки эмбриона коровы (ЭБС), и антибиотика; после чего полученный биоптат подвергался механической и ферментативной дезагрегации, проводили отмывку биоптата раствором Хенкса с добавлением антибиотика, суспензия клеток центрифугировалась и переносилась в стерильные пластиковые чашки Петри и культивировалась 5 – 6 дней при температуре 37°C и 5% содержанием CO<sub>2</sub> в окружающем воздухе (А.Ю. Криворучко, В.А. Беляев, И.И. Некрасова, Н.В. Федота, 2013).

Известен способ получения ангиогенных факторов в фибробластах клеточной культуры холестеатомы наружного слухового прохода, заключающийся в выделении фибробластов из тканей ушных каналов при оперативных вмешательствах. Фибробласты были культивированы в модифицированной среде Дульбекко (DMEM; Life Technologies, Gaithersburg, MD) каждый с 20% и с 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 5 мг / мл L-глутамина для культуры первичной клеточной культуры и последующих клеточных культур и инкубировали при 5% CO<sub>2</sub>. Фибробласты первичной культуры были трипсинизированы трипсином 0,05% / 0,53 мМ EDTA Na 4 (Life Technologies, Carlsbad, CA) и размещены. Пробы тканей промыли в стерильной PBS и в диспазе II (Roche Molecular Biochemicals, Швейцария) при температуре 37°C в течение 30-40

мин в зависимости от толщины хранимого образца. После отделения эпидермиса от дермы образцы были инкубированы в 0,25% трипсине (Life Technologies, Carlsbad, CA) при температуре 37°C в течение 30 мин с последующей нейтрализацией трипсинонейтрализующим раствором (BioWhittaker, Walkersville, MD). Представленный эпидермис выдерживали в DMEM с добавлением FBS 10% и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение примерно 1 ч. Клетки фильтровались 40-µm-межпластинкой и были собраны после центрифугирования 100 г в течение 10 мин. После этого проводилась культивация в кератиноцитарной среде с DMEM / F12 (3: 1). Кератиноцитарная среда также содержала  $1,8 \times 10^{-4}$  моль/л аденина, 10 моль/л холерного токсина, 10 мкг/мл EGF, 0,4 мкг/мл гидрокортизона, 5% FBS и антибиотики (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,25 мг/мкл фунгицома). Клетки инкубировались в 4 прохода в концентрации 50 мкг/мл FGF-2 до максимума 96 часов (R. Naim, H. Sadick, C. Bayerl, G. Bran, K. Hörmann / *Angiogene Faktoren in der Fibroblastenzellkultur des Gehörgangcholesteatoms* // HNO 2005 · 53:952–956, DOI 10.1007/s00106-005-1252-z, Online publiziert: 4. Mai 2005, Springer Medizin Verlag 2005).

Для увеличения регенеративного потенциала тканей и заместительной терапии разработан способ выделения и культивирования дермальных аутологичных фибробластов кожи человека, включающий выращивание клеток в среде DMEM с добавлением растворов антибиотика и антимикотика, с 10%-й собственной сывороткой крови пациента (ССКП), при этом клетки выделяют из биоптата кожи, который помещается в чашке Петри под покровное стекло, которое покрыто поли-D-лизином, и инкубируется в питательной среде DMEM, содержащей 2% фетальную бычью сыворотку. При образовании монослоя клетки снимают раствором, синтетического аналога трипсина, и проводят их культивирование в питательной среде с собственной ССКП на чашке Петри, покрытой поли-D-лизином (пат. RU № 2382077 С 12 N 5/071, опубл. 20.02.2010г.).

Известен способ культивирования фибробластов для заместительной терапии, включающий выделение клеток и инкубирование в питательной среде, при этом выделение фибробластов осуществляют из биоптатов кожи человека путем ферментативной обработки в растворе DMEM/ 5% ЭСБ/ 0,2% диспазы/0,1 мг/мл коллагеназы I типа при постоянном помешивании пипетировании при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 1,5 ч в стерильных условиях, полученную суспензию клеток центрифугируют 5 мин при 200 g, супернатант сливают, осевшие клетки ресуспендируют в среде DMEM/10% ЭСБ /100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина, 100 ед./мл фунгизона и высевают на чашки, затем фибробласты переводят на длительное культивирование в среде с собственной сывороткой крови пациента: DMEM/10% ССКП/100 ед./мл стрептомицина, 100 ед./мл фунгизона или в терапевтической среде А I М –V, перед введением пациентам клетки несколько раз отмывают в буфере Krebs-Ring, обрабатывают раствором 0,25% трипсина/0,02 % ЭДТА для снятия клеток с подложки, добавляют 1мл Krebs-Ringer, центрифугируют 5 мин при 200 g, супернатант сливают, клетки ресуспендируют в новой порции раствора Krebs-Ringer для введения пациентам.

В способе культивированные фибробласты дополнительно обрабатывают rhTGF- $\beta$ 1 в концентрации 5нг/мл в среду культивирования (пат RU № 2320720 МПК С 12 N 5/08, А 61 L 27/38, опубл. 27.03.2008г.).

Для того, чтобы доказать возможность расти и делиться в культуре клеток млекопитающих, потребовались разработка и овладение целым рядом методик. Особенности их приведены ниже.

1. Получение клеток, свободных от экзогенных прокариотов и грибов.
2. Разработка сред, в которых невозможно подавление роста клеток, выделенных из тканей.
3. Разработка способов наблюдения за клетками, позволяющих следить за динамикой развития клеток.

4. Разработка способов для непрерывного культивирования культур клеток животных *in vitro* и поддержания их свободными от других биологических агентов (Культивирование клеток, 2014; Р. Фрешни 1989; Р. Е. Спир, 1989; Т.Д. Колокольцова, 2008).

Все вышеперечисленные способы культивирования фибробластов хорошо себя показали для культивирования культур клеток, полученных от человека и лабораторных животных, но не в одном из них не описано, как он применим для культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, что и послужило основанием для поиска и модифицирования методик культивирования.

### 1.5. Оценка жизнеспособности культуры фибробластов

Оценка параметров клеток, которые в своей совокупности определяют жизнеспособность клеточной популяции, всегда являлась объектом деятельности ученых-цитологов во всем мире. Эта процедура требует определения множества факторов развития популяции, например, таких, как способность группы клеток выполнять специфические функции *in vivo* и *in vitro*, определение митотического потенциала клеток и многие другие (А.А. Бармашева, 2012; О.А. Петухова, 2001). Зачастую жизнеспособность клеток оценивается с помощью специальных наборов тестов, которые характеризуют только по одному аспекту клеточного функционирования (И.Г. Герасимов, А.Г. Попандопуло, 2007).

Установлен тот факт, что изображения клеток, полученные с нативных препаратов, содержат разнообразную информацию, включающую в себя сведения о внутриклеточной структуре и содержание различных веществ (А.Ф. Арэ, 1999; Ю.Н. Зайцева, 2012).

В связи с тем, что для извлечения информации такого рода требуется применение специальных приемов, таких, например, как обработка клетки химическими красителями или маркирование специфических рецепторов с помощью селективных биохимических соединений. (И.Г. Герасимов, А.Г. Попандопуло, 2007).

В настоящее время имеются способы неспецифической оценки жизнеспособности клеток, в основе которых лежит распознавание клеток по их размерам и форме или после их окрашивания специфическими красителями (Luginbuhl et al., 1989; Погорелов и др., 1995, 1997; Медовый и др., 1997; Grenander, 1997). Данные получают путем микроскопирования, что не представляет технических трудностей (И.Г. Герасимов, 2008; Russ, 2000; Магакян, 2002).

В настоящее время в оценке жизнеспособности культур клеток наметились два основных подхода, один из которых, предложенный Магакяном в 2002 году, предусматривает оценку жизнеспособности

большого количества клеток из популяции, а второй предусматривает исследование генеральной совокупности клеток, принадлежность которых к данной популяции заведомо определена, и последующую интегральную оценку жизнеспособности всей совокупности. При этом размеры и форма клеток могут оказаться важными факторами, параметры которых отражают их функциональное состояние.

В литературе имеется много сведений о способах оценки жизнеспособности клеток, в частности фибробластов. Так, в 2014 году был описан способ оценки жизнеспособности культур клеток фибробластов с помощью тест-системы «Live/Dead Viability/cytotoxicity test (Invitrogen)». Клеточные культуры фибробластов однократно промывались фосфатным буфером DPBS (Invitrogen) и окрашивались в течение 10 минут рабочим раствором, содержащим: 2.5  $\mu\text{M}$  Calcein AM и 5  $\mu\text{M}$  EthD-1, при комнатной температуре. Далее с помощью флуоресцентного микроскопа («Olympus IX70») на длине волны 515 нм выявлялись жизнеспособные клетки (зеленый цвет), а на 635 нм – мертвые (красный цвет). (А. В. Попов, М. Л. Лим, Е. А. Губарев, А. Х. Каде, 2014). Ими же описан способ оценки пролиферативной активности фибробластов с помощью колориметрического МТТ теста (Roche). Сущность данного способа заключается в культивировании клеток в течение 48 или 96 часов в 96-луночных планшетах с плоским дном (BD) при  $+37^{\circ}\text{C}$  в присутствии 5%-ной  $\text{CO}_2$ . Затем фибробласты инкубировали с 0,5 мг/мл МТТ-реагентом № 1 на протяжении четырех часов. Добавление МТТ-реагента № 2 предшествовало 12-часовой инкубации клеток в вышеупомянутых условиях. После чего абсорбция в экспериментальных образцах измерялась с помощью ELISA-читающего устройства – «SpectraMax 250» («Molecular Devices»). (А. В. Попов, М. Л. Лим, Е. А. Губарев, А. Х. Каде, 2014).

Также в научной литературе описан способ оценки жизнеспособности клеток путем их окраски трипановым синим (В.Л. Зорин и др., 2011), метиленовым синим (Stolarek et al., 1998; И.Г. Герасимов, А.Г. Попандопуло, 2007) с последующим подсчетом в камере Горяева, с помощью окраски



смесью акридинового оранжевого (0.5 %) и этидиума бромида (1 %) в соотношении 1: 1 с последующей оценкой на люминесцентном микроскопе (Соловьева и др., 1998).

В 1986 году Е.Н. Шиган создал унифицированную систему экспертных оценок для определения жизнеспособности культур клеток (Е.Н. Шиган, 1986).

Также о жизнеспособности культур клеток нам могут свидетельствовать следующие отдельные показатели клеток, такие, как: вакуолизация (Cardenas-Aguayo Mdel et al.,2003), адгезия клеток (С.Л. Кузнецов, М.К. Пугачев, 2004), конфлюентность монослоя (Hayes et al., 2005).

Оценку жизнеспособности культур клеток фибробластов также можно производить, опираясь на функциональную активность клеток, для этого проводится иммунофенотипирование клеток, используя следующие антитела: поликлональные кроличьи антитела против коллагена 1-готипа («Chemicon», Великобритания), 1:1000; поликлональные кроличьи антитела против фибронектина («Abcam», Великобритания), 1:1000; мышинные антитела против ламина А/С («Chemicon», Великобритания), 1:150, мышинные антитела против виментина «BDPharmingen», 1:200, мышинные моноклональные антитела против поверхностного белка фибробластов –FSP, клон 1B10 «Sigma-Aldrich», 1:200.

Для проведения иммунофенотипирования Г.А.Данлыбаева с соавторами описывает следующую методику: клетки высаживали в чашки Петри, на дне которых находилось покровное стекло. После прикрепления клетки фиксировали раствором 3% параформальдегида («Fluka», Германия) в PBS. Для блокирования неспецифического взаимодействия антител клетки инкубировали с 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина («Sigma», США). Инкубирование в растворе первичных антител проводили при комнатной температуре в течение одного часа. После промываний раствором 0,2% Tween20 в PBS наносили раствор вторичных антител, конъюгированных с флюорохромом AlexaFluor488 (“Invitrogen”) и

инкубировали препараты 45 минут при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток подкрашивали раствором DAPI или Hoechst33258 (в концентрации  $2 \times 10^{-3}$  мг/мл). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioscope-2» («Carl Zeiss», Германия) и программного обеспечения WinView software («Rooper Scientific Photometrix») (Г.А.Данлыбаева и др., 2014).

Известен способ оценки жизнеспособности культур клеток фибробластов, в котором монослой аллофибробластов рассматривается как текстура, которая обладает своими характерными признаками и особенностями, что позволяет выполнить обработку этой текстуры современными компьютерными технологиями. Сущность данного метода заключается в следующем: исходное изображение монослоя фибробластов преобразовывается в лог-полярное изображение, после чего полученное изображение подвергается вивлет-преобразованию с использованием квадратурных зеркальных фильтров. В результате чего получают большое количество вивлет-коэффициентов, количество которых сокращают путем расчета величины энергии субзон. Далее проводится экспертная оценка с использованием классификаторов Махаланобиса и метода сравнения Евклидовых расстояний (Е.В. Меркулова, 2006).

Имеются сведения, что для оценки жизнеспособности культур клеток фибробластов можно использовать энтропийный эквивалент, который сформирован на основании положений неравновесных процессов теории термодинамики, в основе этого способа лежат работы Пригожина (1985), Герасимова (1998), Shen'a с соавторами (1994).

Таким образом, анализ научно-технической литературы свидетельствует о перспективности и актуальности разработки методов интенсивного культивирования дермальных фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней, а также в изучении морфологических особенностей дермальных фибробластов и оценки их жизнеспособности при интенсивном культивировании.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2. 1. Материалы и методы исследований**

Работа была выполнена в период с 2013 по 2016 годы на кафедре терапии и фармакологии и Научно-диагностическом и лечебно-ветеринарном центре ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», ФКП «Ставропольская биофабрика».

В качестве модели на начальном этапе для отработки методики культивирования были выбраны морские свинки в возрасте 1 год со средней массой 450 – 500 г, n = 30 (15 самок и 15 самцов). Животные содержались в одинаковых условиях вивария факультета ветеринарной медицины Ставропольского государственного аграрного университета (при естественном освещении, t воздуха +22-24° С и влажности 50 – 60%), в пластиковых клетках размером 55x45x15 см. В эксперименте животные принимали участие после 10 дневного карантина.

Основная часть эксперимента была выполнена на овцах северокавказкой породы в возрасте 1,5-2 года со средней массой 50-55 кг, n=10, все животные содержались в одинаковых условиях вивария факультета ветеринарной медицины, крупном рогатом скоте, принадлежащем ООО СХП «Новомарьевское», в возрасте 1 – 1,5 года со средней массой 350 - 450 кг, n=10, свиньях, принадлежащих ЛПХ Изобильненского, Труновского и Шпаковского районов, в возрасте 1 – 1,5 года со средней массой 150 – 200 кг, n=10.

Биопсия кожи у сельскохозяйственных животных проводилась с внутренней поверхности бедра, с захватом дермы без гиподермы с соблюдением требований септики и асептики.

Культивирование и изучение культуральных свойств фибробластов, полученных от опытной модели (морская свинка) и сельскохозяйственных животных, проводили по методике, предложенной В.А. Ткачук и др. (пат RU № 2320720 МПК С 12 N 5/08, А 61 L 27/38, опубл. 27.03.2008г.), в данной

методике были выявлены следующие недостатки: частая бактериальная и грибковая контаминация культуры, рост и формирование монослоя в течение 7 – 10 дней, асинхронность созревания. Для сокращения времени культивирования до 3 – 4 суток, синхронности получения культур, свободных от грибковой и бактериальной контаминации, мы модифицировали методику культивирования дермальных фибробластов морской свинки и сельскохозяйственных животных, сущность которой заключалась в:

1. Отбор кожи размером 5 мм<sup>3</sup> с внутренней поверхности бедра у овец, крупного рогатого скота, свиней и с холки у морской свинки.
2. Биоптат кожи отмывали от грязи и крови в заранее приготовленных пробирках с раствором фосфатного буфера с добавлением 20 мкл антибиотиков (пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный, производство Пан-Эко, г. Москва), для вымывания эритроцитов биоптат помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор Binder C – 150 (Binder, Германия) на 5 минут при 37° С и содержанием в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После чего биоптат кожи переносился во вторую пробирку с раствором фосфатного буфера с добавлением антибиотиков и снова помещался в углекислотный инкубатор на 5 минут.
3. В ламинарном боксе пробы механически измельчали на фрагменты размером 0,5 – 1 мм и помещали в чашку Петри с раствором Версена с добавлением 0,25% раствора трипсина и ставили на магнитную мешалку с подогревающейся алюминиевой плитой производства ARE Velp (Италия) на 15 минут для ферментативной дезагрегации.
4. Далее пробы переносились в микроцентрифужные пробирки типа Эпиндорф и помещались в центрифугу Sigma 1 – 14 (Германия) на 2 минуты и 2000 оборотов в минуту.
5. Готовили культуральную среду согласно прописи: 5 мл среды DMEM с аланил-глутамином (Пан – Эко. г. Москва), добавляем 10 мкл антибиотиков (Пенициллин-стрептомицин, 100-кратный

лиофилизированный, производство Пан-Эко, г. Москва), 5 мкл экстракта бычьей сыворотки (ЭБС).

6. Затем в ламинарном боксе сливали образовавшийся супернатант, в одну пробирку добавляли 0,6 мл среды, объединяли содержимое пробирок в одну и перемешивали. Процедуру повторяли два раза, после полученный материал переносили в культуральную посуду со средой.
7. Культуральный матрас помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор Binder C – 150 (Германия) при 5% содержании в атмосфере CO<sub>2</sub> и 38°C и культивировали в течение 96 часов.

Пересев культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных вели по следующей методике:

1. Биоптаты убирали к краю культурального флакона, дальше от образовавшихся фибробластов. В ламинарном боксе – из культурального флакона выливали среду (в пустую чашку Петри) и добавляли раствор Версен + трипсин. Раствор Версен + трипсин 0,025%, готовили заранее.
2. Затем сливали раствор и добавляли раствор Версена, промывали, сливали и снова добавляли раствор Версен + трипсин. Ставили на 3 – 5 минут в термостат.
3. Скребочком снимали фибробласты (чтобы они плавали по чашке).
4. В ламинарном боксе: пипеткой из культурального флакона раствор вместе с фибробластами переносили в пробирку Эпиндорф.
5. Пробирку ставили в центрифугу (2000 об. 3 мин.). Затем сливали надосадочную жидкость. Наливали 600 мкл среды DMEM (перемешивали), центрифугировали, сливали, добавляли среды, центрифугировали, сливали, переносили в культуральный матрас (распределяя по всей площади).

6. Культуральный матрас помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор Binder C – 150 (Германия) при 5% содержании в атмосфере CO<sub>2</sub> и 38°C и культивировали в течение 96 часов.

Внесенные изменения в методику культивирования аутологичных дермальных фибробластов не повлияли на морфологические и функциональные свойства фибробластов.

Изучение общих свойств аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных (внешний вид, форма, количество клеток и площадь монослоя) проводили в течение 3-х пассажей на временных отрезках 24, 48, 96 часов на инвертированном микроскопе OLYMPUS GX – 71 (Япония), с каждой культуры выполнялись снимки (в формате .jpg, размером 3136×2352 пикселей в палитре 24 бит) в случайно выбранных полях зрения при увеличении × 40, × 100, × 200, × 400 с помощью фотоаппарата OLYMPUS C 300 (Япония).

Количество клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева, одновременно определяя количество жизнеспособных клеток методом исключения красителя (трипановый синий). Живые клетки не проницаемы для красителей, а мертвые клетки проницаемы и окрашиваются (О. Смирнова, 2013).

Изучение морфометрических показателей (длина, ширина, площадь, ЯЦО) аутологичных дермальных фибробластов проводили в течение 3-х пассажей на временных отрезках культивирования 24, 48, 96 часов, на инвертированном оптическом микроскопе OLYMPUS GX – 71 (Япония) и методом электронной микроскопии.

С каждой культуры выполняли 10 снимков (в формате .jpg, размером 3136×2352 пикселей в палитре 24 бит) в случайно выбранных полях зрения при увеличении × 40, × 100, × 200, × 400 с помощью фотоаппарата OLYMPUS C 300 (Япония).

Для оптимальной визуализации аутологичных дермальных фибробластов использовался метод сканирующего электронно-микроскопического исследования. Работу выполняли на растровом электронном микроскопе для биологических исследований EVO LS 10 (Carl Zeiss, Германия) в сканирующем режиме. В качестве держателя образцов использовали клейкие двусторонние углеродные диски  $d=12\text{мм}$ , на которые наносили суспензию сконцентрированных центрифугированием (800 об/мин 3 минуты) фибробластов, после подсушивания при комнатной температуре происходит их достаточно хорошая адгезия с поверхности пленки, микроскопировали неконтрастированные (неокрашенные) фибробласты без напыления. Наиболее качественные изображения получены при высоком вакууме (минус 6 атмосфер), в режиме SEI, расстояния между сфокусированной поверхностью образца и краем объективной линзы подбирали эмпирически. Сканирующая электронная микроскопия образцов, подготовленных по описанной методике, позволяет детектировать форму, размер фибробластов, особенности поверхности и повреждения оболочки клеток.

Морфометрические показатели определяли в программе VideoTestMaster 5.1 для Windows производства АОЗТ «ИСТА», Россия, г. Санкт-Петербург, на IBM-совместимом компьютере.

Для изучения функциональных показателей фибробластов (скорость адгезии, оптическая плотность ядра, количество синтезируемого проколлагена) использовались следующие методы.

Определение скорости адгезии клеток проводили с помощью модифицированного метода Карекла (Karecla et al., 1994). Для этого использовали платы для иммуноферментного анализа. Клетки, снятые с культуральной подложки, промывали трижды средой DMEM с последующим центрифугированием при 1000 g (5 мин.). Затем клетки в среде без сыворотки высевали в 96-луночные платы по 3 тыс. клеток на лунку. А прикрепившиеся фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 4%-ным раствором формальдегида в PBS и окрашивали 20 мин 0,1 %-ным раствором

генциан-виолета. Краситель растворяли 10%-ной уксусной кислотой. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм на приборе Multiskan. Была построена калибровочная кривая, с помощью которой по величине оптической плотности растворов можно судить о количестве клеток, прикрепившихся к субстрату. В отдельных случаях количество прикрепившихся клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева (Н.В. Смирнова, 2008).

Масс-спектрометрическое исследование проколлагена выполняли по следующему плану:

- 1.Этап. Пробоподготовка: образцы разбавляли водой I типа в пропорции 1:10, центрифугировали пробу 4 мин при 12 000 об/мин ( $t=10^{\circ}\text{C}$ ). Для анализа использовали надосадочную жидкость. Для MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bruker Daltonics, Германия) использовали стальной планшет с ячейками, на который наносили 1 мкл пробы, после в течение нескольких минут высушивали ее на открытом воздухе. Далее наносили  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоту в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты. Полученную пробу сушили на воздухе в течение 5 мин, до образования кристаллов.
- 2.Этап. Получение масс-спектров. На MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) в линейном режиме получали масс-спектры. Параметры получения: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10 – 50 %, время задержки экстракции 110 нс P1E, напряжение первого источника ионов 19,4 kV, второго – 17,3 kV, напряжение фокусирующей линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000 – 20000 Da. Внутреннюю калибровку ранее указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия). Суммарный масс-спектр генерировали из 20 случайно выбранных позиций



каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Для управления масс-спектрометром, включая установку режимов работы и регистрации масс-спектров, использовали программный пакет Daltonics flexControl v.3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), визуализацию и анализ полученных масс-спектров проводили в программе – flexAnalysis v 3.3.65. Формирование промежуточных таблиц выполняли с использованием программных ресурсов пакета Microsoft Office 2010 (Г.И. Лямкин, А.Н. Куличенко, 2016).

Оптическую плотность ядра определяли путем автоматизированного подсчета в программе VideoTestMaster 5.1 для Windows производства АОЗТ «ИСТА», Россия, г. Санкт-Петербург А.В. Куркина (2014 г.).

Для оценки жизнеспособности культур клеток фибробластов использовалась методика экспертных оценок Шиган (1986), учитывающая такие показатели клеток, как вакуолизация, адгезия и качество монослоя при которой клеткам дается балльная оценка. Отсутствие клеток с вакуолями оценивалось в 5 баллов, наличие единичных клеток с вакуолями в 4 балла, множество клеток с вакуолями оценивалось в 3 балла. По показателю адгезии клеток культуры оценивались в 5 баллов, если все клетки распластаны, в 4 балла оценивались культуры, в которых имелись плохо прикрепившиеся клетки, или же клетки полуокруглой формы с короткими псевдоподиями, в 3 балла оценивались культуры, в которых большинство клеток полуокруглой формы или же с короткими псевдоподиями. По показателю качества монослоя в 5 баллов оценивались культуры, в которых монослой был образован на 3 сутки, в 4 балла культуры, в которых монослой образовывался на 4 сутки, и в 3 балла культуры, образовавшие монослой на 5 – 6 сутки И.Г. Герасимова и А.Г. Попандопуло (2009), жизнеспособность культур клеток определяли, основываясь на положениях теории термодинамики неравновесных процессов и энтропийного эквивалента. (Пригожин, 1985).

В связи с тем, что ЭЭ представляет собой свертку корреляционной матрицы, где диагональные члены имеют смысл корреляции, а внедиагональные – вероятностей, с использованием полученных данных в ходе морфометрических исследований (S, P, C).

$$F_k = \frac{(M_{k+1})^{k+1}}{m_1} = \left[ \frac{1(z_i - m_1)^{k+1}}{N \sum_{i=1}^n} \right]^{\frac{k+1}{1}}$$

где  $M_p$  – p-тый главный центральный момент

$$M_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - m_i)^p,$$

$m_p$  - p-тый момент рассчитывается, как

$$m_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Z_i^p,$$

Где  $Z_i$  – расстояние от i-той точки контура до геометрического центра объекта, имеющего координаты  $(\bar{x}, \bar{y})$ , N – число точек в контуре. Интегральный дескриптор FF является характеристикой формы, рассчитываемой по множеству нормированных дескрипторов Фурье:

$$FF = \frac{\sum_{k=-N/2}^{N/2} \|NFD(k)/|k|\|}{\sum_{k=-N/2+1}^{N/2} \|NFD(k)\|},$$

Где NFD(k) – нормированные дескрипторы Фурье, не зависящие от местоположения и размера контура, а также от положения стартовой точки направления обхода:

$$NFD(k) = \begin{cases} 0, \text{ если } k = 0 \\ A(k) / A(I), \text{ если } k = 1, 2, \dots, N / 2 \\ A(k + N) / A(I), \text{ если } k = -1, -2, \dots, -N / 2 + 1 \end{cases}$$

ЭЭ рассчитывается по формуле (Герасимов, 1996)

$$\text{ЭЭ}_r = \sum_{i=j}^n \left[ \frac{\sum_{i=1}^n |r_{i(j)}|}{\sum_{i \neq 1}^n |r_{i,j}|} \right]^2 + \sum_{i \neq j}^n (|r_{i,j}|)^2,$$

Где  $r_{i,j}$  - коэффициенты корреляции между параметрами,  $n$  - размерность.

Статистическую обработку полученных числовых показателей проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Ньюмена-Кейлса в программе Primer of Biostatics 4.03 для Windows. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

Схема исследования:



**Рисунок 1** – Схема проведения исследований

## **2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В данном разделе представлены результаты научных исследований, опубликованных в научных статьях, авторы: В.М. Левченко, В.А. Беляев, Я.И. Переверзева, Н.В. Федота, А.В. Метляева, А.И. Сидельников (2015), В.М. Левченко, В.Н. Ключникова (2015), В.М. Левченко, Н.А. Гвоздецкий (2016), В.М. Левченко (2016), которые были уточнены, расширены и содержат новые сведения.

### **2.2.1. Получение культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, соответствующих требованиям ОФС.1.7.2.0011.15**

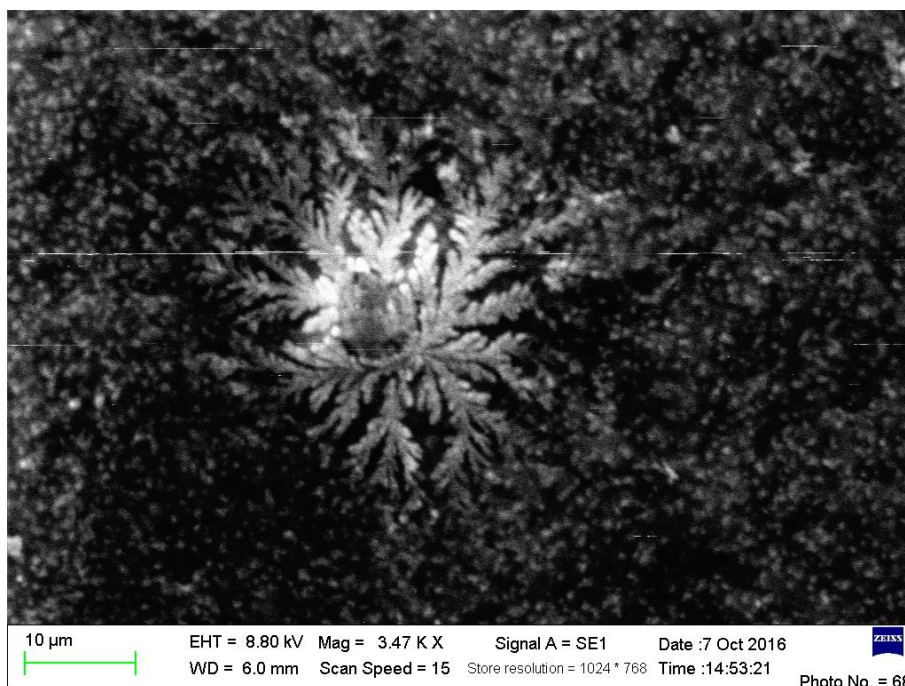
Современные методики культивирования фибробластов должны позволять быстро получать монослой требуемого качества с минимальными финансовыми затратами.

На начальном этапе диссертационного исследования в 10 опытах было установлено, что методика культивирования, предложенная Ткачук В.А. (2010г.), на примере морской свинки обладает рядом недостатков: из-за не предусмотренных правил септики и асептики возникает бактериальная и грибковая контаминация среды, что, очевидно, является причиной низкого количества жизнеспособных фибробластов и малой площади образования монослоя в культуральном флаконе; асинхронность роста клеток и образования монослоя, которые не позволяют использовать её для сравнения.

Мы внесли изменения в методику культивирования, которые позволили решить проблему бактериальной и грибковой контаминации культуры (Рис.2), синхронного получения монослоя аутологичных дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных с большим количеством жизнеспособных клеток и соответствующий требованиям ОФС.1.7.2.0011.15.

Оценку качества монослоя проводили путем подсчета отношения живых и мертвых фибробластов в камере Горяева и расчета общей площади монослоя.

При пересеве клеток проводился подсчет жизнеспособных клеток методом исключения красителя (трипановый синий).



**Рисунок 2** – Деструкция тела фибробласта вследствие бактериальной контаминации культуры.

**Таблица 1** – Количество жизнеспособных фибробластов морской свинки в культурах, культивируемых по разным методикам, в 1 мл среды.

№ п/п	Методика культивирования	Жизнеспособных фибробластов (ед.)	Мертвых фибробластов (ед.)
1.	пат RU № 2320720	75	96
2.	Усовершенствованная методика	140	64

Данные, представленные в таблице 1, наглядно доказывают преимущества предлагаемой нами методики, так как количество жизнеспособных клеток при культивировании по усовершенствованной

методике на 56,3% больше, чем по методике Ткачук В.А. с соавт. (2010г.), и количество мертвых клеток меньше на 66,6%.

При анализе площади монослоя в культуральном флаконе получены следующие значения, площадь монослоя клеток, культивируемых по модернизированной методике, составляла 87,8% от общей площади культурального флакона, площадь монослоя клеток, культивируемых по методике Ткачук В.А (2008г.), составляла 71,4% от общей площади флакона.

При подсчете клеток для пересева было установлено, что в смыве с монослоя, культивированного по усовершенствованной методике, в 1 мл содержится 8,2 тыс. фибробластов овец, 7,5 тыс. фибробластов крупного рогатого скота, 10 тыс. фибробластов свиней (Рисунок 3). Исходная концентрация клеток рассчитывается по следующей формуле:

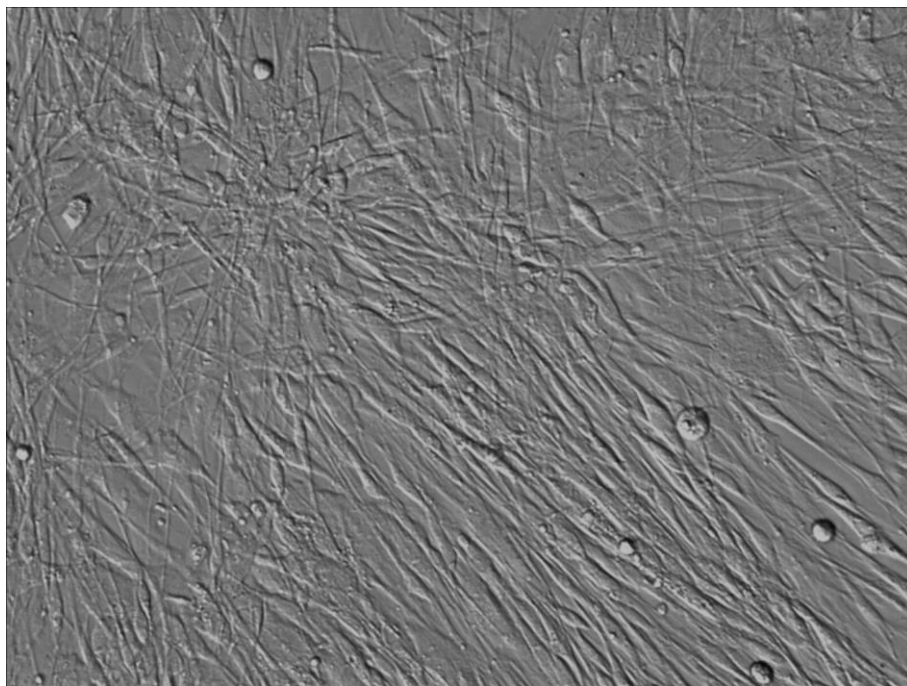
Для клеток разведённой в два раза (красителем) суспензии:  $C \text{ [cell/ml]} = 5 \times 10^{5 \times}$  (количество клеток в одном большом квадрате)  $C \text{ [cell/ml]} = 8 \times 10^{6 \times}$  (количество клеток в одном малом квадрате) (О. Смирнова, 2013).

При анализе данных (Рисунок 3) установлено, что количество фибробластов, полученных от крупного рогатого скота в 1 мл среды, на 7,5 % меньше количества клеток, полученных от овец в 1 мл среды, и соответственно на 20%, меньше, чем полученных от свиней.

В полученных культурах аутологичных дермальных фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней в связи с двукратным промыванием биоптата кожи, более мягкой ферментативной дезагригации материала отмечается фибробластический тип роста, гомогенная цитоплазма, характерные для фибробластов особенности ядра и ядрышек, культуры не содержат посторонних агентов (бактерий, в том числе микоплазм, грибов, простейших, вирусов), сохраняют стабильность всех биологических свойств в фазе активного роста (первые две трети срока жизни клеточных культур), что соответствующие ОФС.1.7.2.0011.15.



**Рисунок 3** – Количество клеток, культивируемых по усовершенствованной методике, в 1 мл среды при их пересеве.

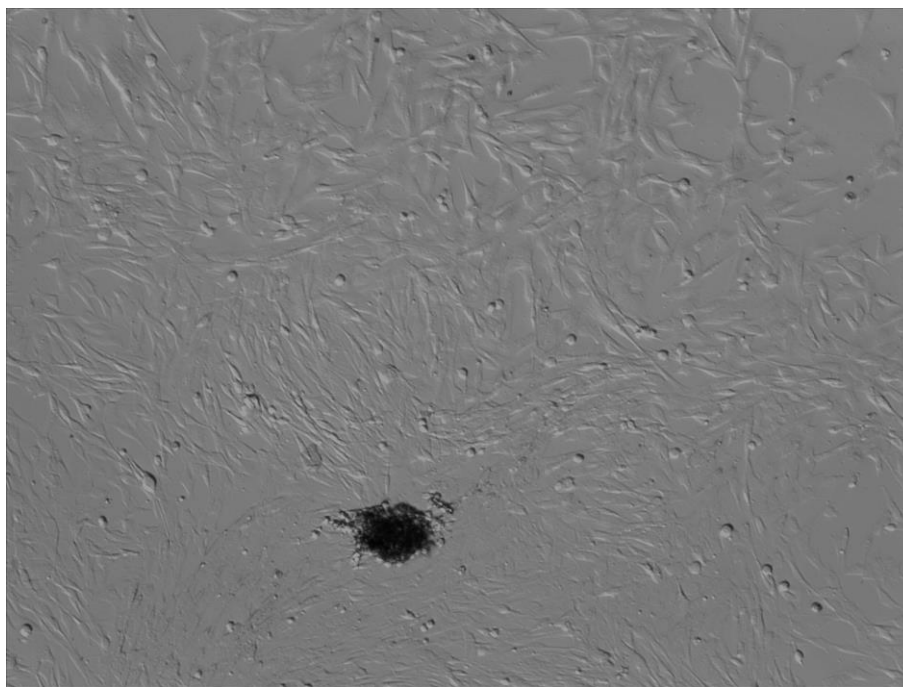


**Рисунок 4** – Культура аутологичных дермальных фибробластов овец (фибробластический тип роста клеток). Ув.×200.

### **2.2.2. Морфофункциональная характеристика фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM**

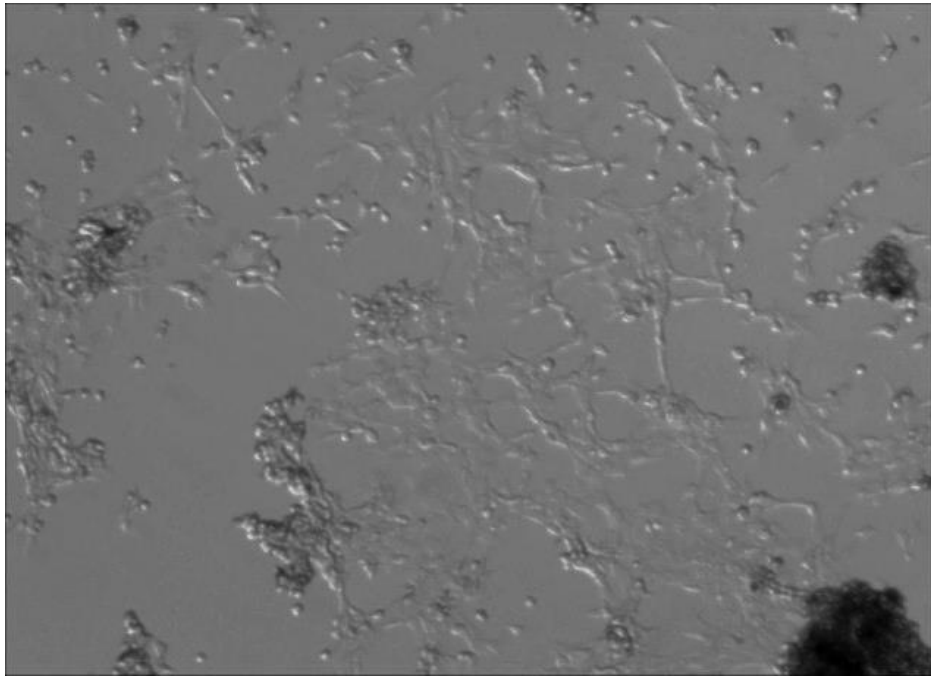
В ходе экспериментальной части исследования были получены культуры дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных (Рис.5, Рис.6, Рис. 7).

Культуры дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, полученные в результате 1 пассажа через 96 часов культивирования (Рис. 4 – 6), характеризуются преобладанием клеток узкой вытянутой формы, с хорошо визуализируемым ядром, с 2 – 4 отростками, видно незначительное количество волокон коллагена, встречается незначительное количество клеток грушевидной формы.

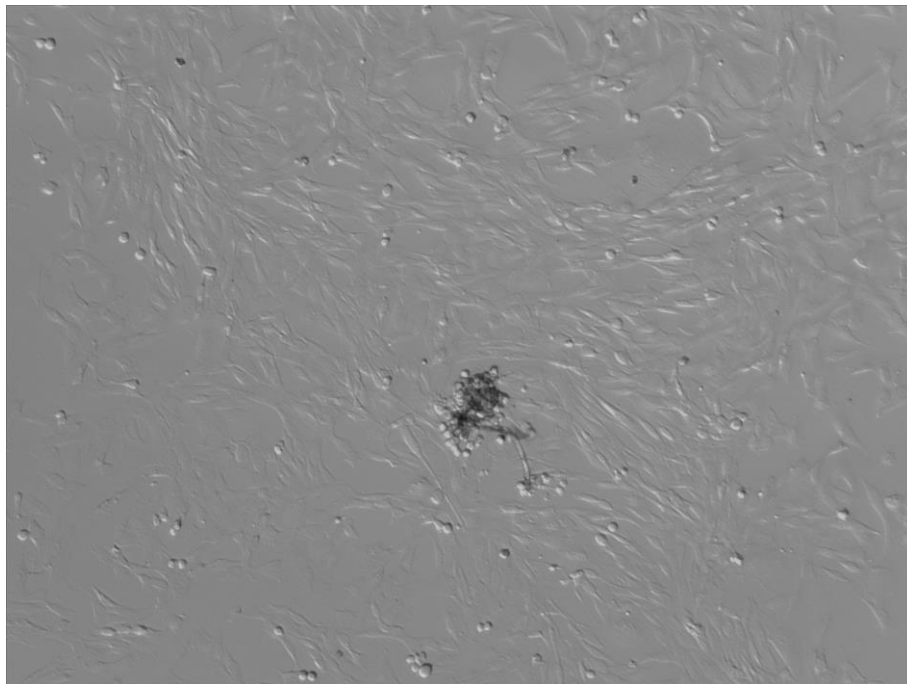


**Рисунок 5** – Культура аутологичных дермальных фибробластов овцы северокавказской породы, культивируемая по усовершенствованной методике, через 96 часов. Ув.х100





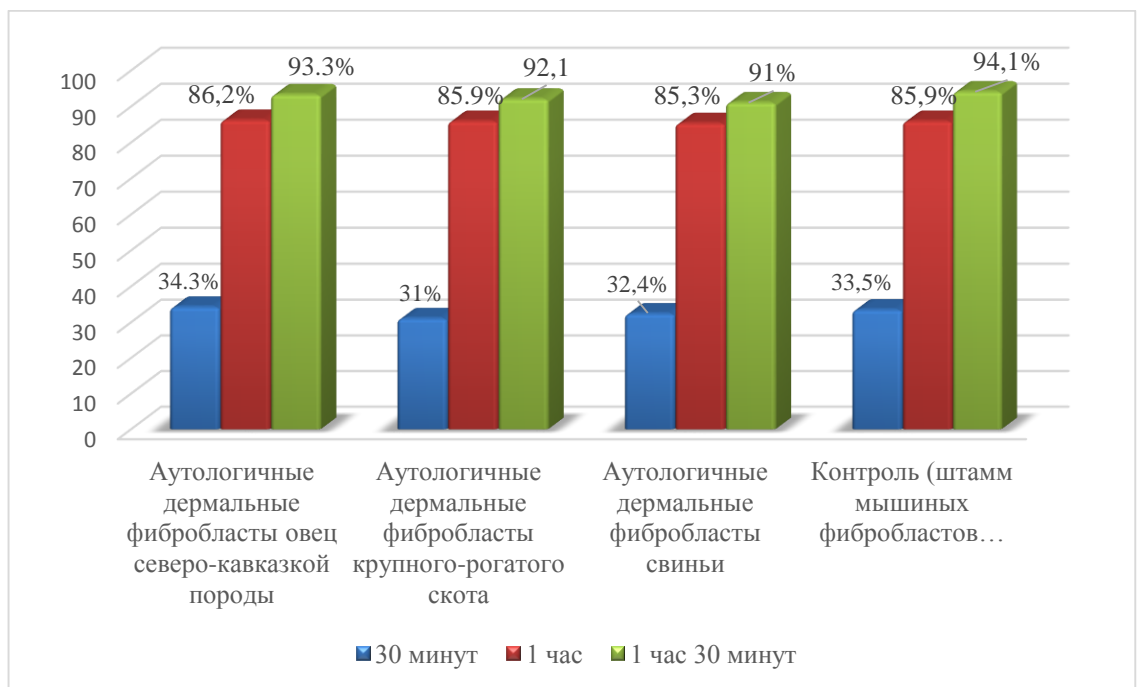
**Рисунок 6** – Культура аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота, культивируемая по усовершенствованной методике, через 96 часов. Ув.х200



**Рисунок 7** – Культура аутологичных дермальных фибробластов свиней, культивируемая по усовершенствованной методике, через 96 часов. Ув.х100

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 60 минут 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 изменяются в этот период времени (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Скорость адгезии фибробластов к поверхности пластикового культурального флакона.

Через 24 часа после начала культивирования длина аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных составляла (таблица 2).

По значению длины фибробластов у овец клетки распределяются следующим образом: меньше или равно 20,0 мкм 10% клеток, от 20 – 22 мкм 53,3%; больше или равно 23 мкм 36,6%. У крупного рогатого скота данные находятся в следующем диапазоне: меньше или равно 20,0 мкм – не выявлено, от 20 – 22 мкм 40% клеток; больше или равно 23 мкм 60%. У

свиной отмечено следующее распределение по размерам: меньше или равно 20 мкм нет; от 20 – 23 мкм 30%; больше или равно 23 мкм 70% клеток. (Рис. 9).

**Таблица 2** – Показатели длины клеток фибробластов сельскохозяйственных животных через 24 часа культивирования (мкм) n=30.

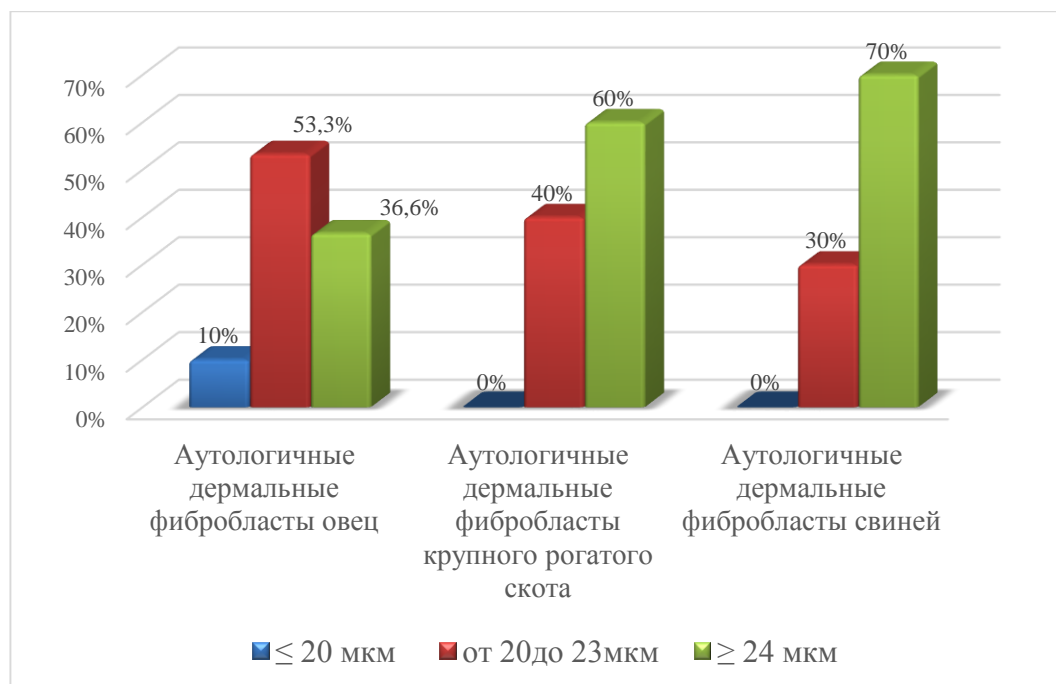
№ п/п культуры	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	20,248±0,450 <sup>#</sup>	24,851±0,319 <sup>*</sup>	23,621±0,505 <sup>*</sup>
2	21,120±0,320	23,749±0,425	20,658±0,436
3	23,225±0,410	20,658±0,496	23,825±0,301
4	21,181±0,356 <sup>#</sup>	25,154±0,618 <sup>*</sup>	20,548±0,571 <sup>*</sup>
5	19,529±0,413	24,794±0,410	21,613±0,563
6	24,348±0,387	20,548±0,731	23,529±0,551
7	24,290±0,361 <sup>#</sup>	20,885±0,345 <sup>*</sup>	20,318±0,771 <sup>*</sup>
8	23,987±0,405	24,568±0,685	25,819±0,431
9	24,102±0,397	25,235±0,927	24,509±0,510
10	24,521±0,379 <sup>#</sup>	21,265±0,895 <sup>*</sup>	23,726±0,489 <sup>*</sup>
Среднее значение	23,655±0,386	21,270±0,424	22,816±0,471

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: # – p <0,05.

В первые сутки культивирования показатели длины фибробластов сельскохозяйственных животных колеблются в пределах 19,5 – 25,8 мкм.

Отмечено достоверное различие между значениями длины фибробластов овец и крупного рогатого скота в культурах 1, 4, 7, 10, а также свиней и овец в тех же самых культурах. В культурах №1 длина фибробластов овец на 18,5% меньше, чем длина фибробластов крупного

рогатого скота и на 14% меньше, чем длина фибробластов свиней. В культурах № 4 длина фибробластов овец на 20% меньше длины фибробластов крупного рогатого скота, но больше длины фибробластов свиней на 4%. В культурах № 7 длина фибробластов овец на 14% и 16% больше длины фибробластов крупного рогатого скота и свиней соответственно. В культурах №10 длина фибробластов овец на 13,2% и 4% превышает длины фибробластов крупного рогатого скота и свиней соответственно.



**Рисунок 9** – Процентное распределение клеток по показателю длины через 24 часа культивирования.

Показатели ширины аутологичных дермальных фибробластов через 24 часа культивирования варьировались следующим образом (таблица 3).

Клетки по показателю ширины у овец распределяются следующим образом: меньше или равно 4,5 мкм 30% клеток, от 4,5 –5,5 мкм 36,6%; больше или равно 5,5 мкм 33,3%. У крупного рогатого скота клетки по показателю ширины находятся в следующем соотношении: меньше или равно 4,5 мкм 13,3% клеток, от 4,5 –5,5 мкм 60%; больше или равно 5,5 мкм 26,6%. У свиней отмечено следующее распределение фибробластов по

ширине: меньше или равно 4,5 мкм 26,6% клеток, от 4,5 –5,5 мкм 46,6%; больше или равно 5,5 мкм 26,6% (Рис.10.).

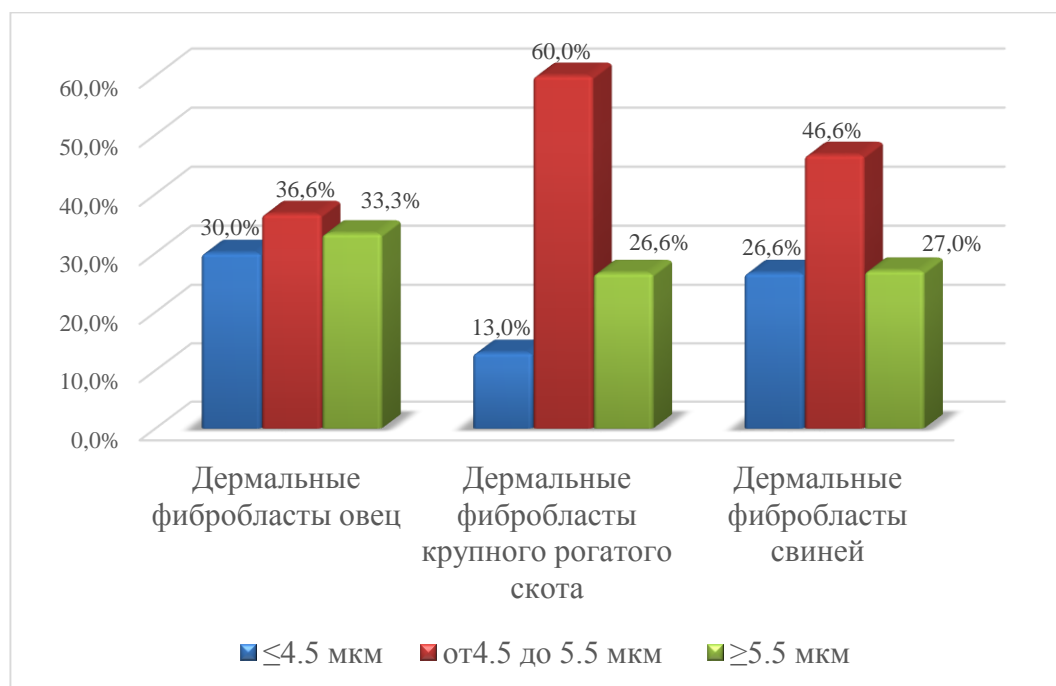
Отмечены достоверные различия между значениями ширины фибробластов овец и крупного рогатого скота в культурах 2, 6, 8, а также свиней и овец в тех же самых культурах. В культурах дермальных фибробластов № 2 ширина фибробластов овец на 15% и 14,7% меньше ширины фибробластов крупного рогатого скота и свиней соответственно. В культурах № 6 ширина фибробластов овец на 35% и 4% больше ширины клеток крупного рогатого скота и свиней соответственно. В культурах № 8 значения ширины фибробластов овец на 15% меньше показателя ширины дермальных фибробластов крупного рогатого скота и на 1% больше ширины фибробластов свиней.

**Таблица 3** – Показатели ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных через 24 часа культивирования мкм, (n=30).

№ п/п культуры	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	4,740±0,319	4,795±0,256	5,121±0,301
2	5,214±0,102 <sup>#</sup>	6,189±0,105 <sup>*</sup>	6,119±0,176 <sup>*</sup>
3	4,808±0,323	4,697±0,119	6,156±0,294
4	5,117±0,268	7,154±0,305	7,096±0,316
5	6,219±0,419	5,165±0,289	6,111±0,215
6	6,327±0,346 <sup>#</sup>	4,897±0,417 <sup>*</sup>	6,085±0,653 <sup>*</sup>
7	7,284±0,503	7,123±0,382	7,066±0,517
8	5,175±0,402 <sup>#</sup>	6,098±0,214 <sup>*</sup>	5,139±0,446 <sup>#</sup>
9	5,101±0,601	5,104±0,134	6,154±0,212
10	6,204±0,515	7,174±0,612	5,262±0,317
Среднее значение	5,468±0,374	5,649±0,541	6,431±0,683

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: <sup>\*</sup> – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: <sup>#</sup> – p <0,05.

На временном промежутке 24 часа культивирования показатели ширины фибробластов сельскохозяйственных животных колеблются в пределах 4,0 – 8,2 мкм.



**Рисунок 10** – Процентное распределение фибробластов сельскохозяйственных животных по показателю ширины, через 24 часа культивирования.

Через 48 часов культивирования показатели длины клеток варьировались следующим образом (таблица 4).

Длина клеток у овец распределяется следующим образом: меньше или равно 29,0 мкм 10% клеток, от 29,0 – 31,5 мкм 60%, больше или равно 31,5 мкм 30%. У крупного рогатого скота данные находятся в следующем диапазоне: меньше или равно 29,0 мкм 6,6% клеток, от 29,0 – 31,5 мкм 53,3%, больше или равно 31,5 мкм 36,6%. У свиней отмечено следующее распределение фибробластов по показателю длины: меньше или равно 29,0 мкм 3,3% клеток, от 29,0 – 31,5 мкм 70%; больше или равно 31,5 мкм 26,6% (Рис. 11).

Отмечены достоверные различия в показателях длины дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в культурах №5 и №8. В

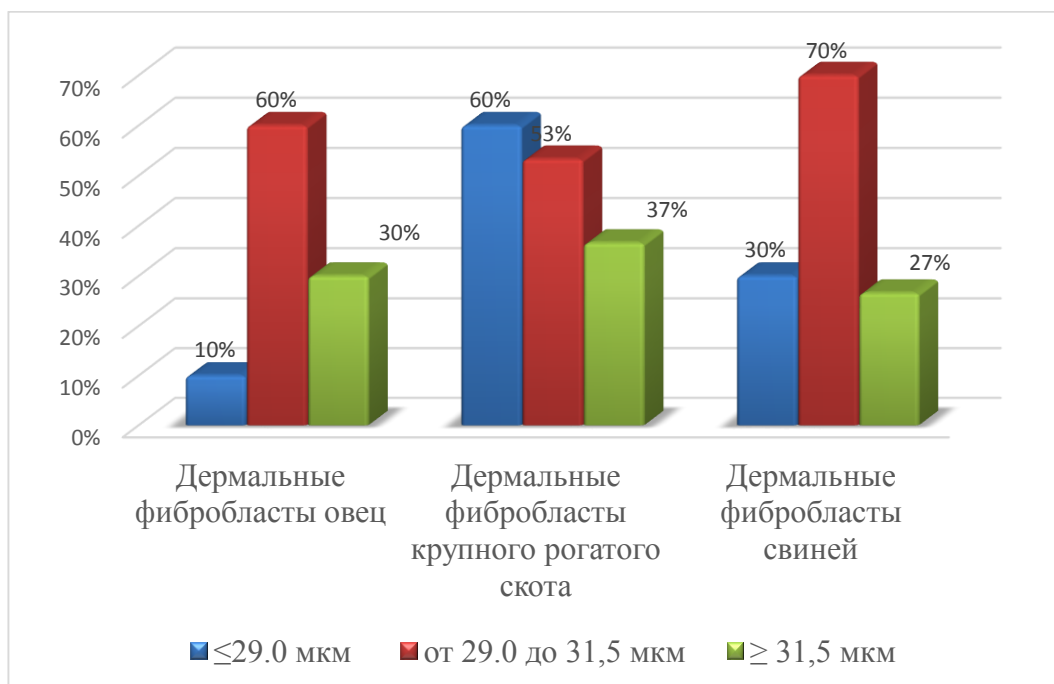
культурах №5 длина фибробластов овец достоверно больше длины клеток крупного рогатого скота и свиней на 8% и 6% соответственно. В культурах №8 длина фибробластов овец меньше длины фибробластов крупного рогатого скота на 5%.

На временном промежутке 48 часов культивирования показатели длины фибробластов сельскохозяйственных животных колеблются в пределах 28,4 – 31,8 мкм.

**Таблица 4** – Показатели длины клеток фибробластов сельскохозяйственных животных через 48 часов культивирования (мкм,) n=30.

№ п/п культуры	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиньи
1	28,436±0,507	29,831±0,516	30,337±0,344
2	30,257±0,463	28,985±0,448	29,348±0,403
3	29,348±0,392	30,851±0,316	31,854±0,187
4	31,354±0,409	31,841±0,201	30,621±0,333
5	30,621±0,282 <sup>#</sup>	29,552±0,804 <sup>*</sup>	28,102±0,701 <sup>*</sup>
6	29,102±0,604	31,751±0,310	29,784±0,923
7	32,784±0,705	30,214±0,613	31,324±0,504
8	29,257±0,311	30,658±0,417 <sup>*</sup>	29,339±0,274
9	31,357±0,473	30,619±0,402	30,218±0,475
10	30,958±0,384	31,248±0,706	29,428±0,506
Среднее значение	30,347±0,492	30,555±0,548	30,035±0,282

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: # – p <0,05.



**Рисунок 11** – Процентное распределение фибробластов сельскохозяйственных животных по показателю длины через 48 часов культивирования.

Клетки у овец по показателю ширины распределяются следующим образом: от 8,0 до 8,5 мкм 10%, от 8,5 до 9,0 мкм 20%; от 9,0 до 9,5 мкм 50%, больше или равно 9,5 мкм 20%. У крупного рогатого скота данные находятся в следующем соотношении: от 8,0 до 8,5 мкм 33,3%, от 8,5 до 9,0 мкм 33,3%; от 9,0 до 9,5 мкм 26,6%, больше или равно 9,5 мкм нет. У свиней отмечено следующее распределение фибробластов по показателю ширины: от 8,0 до 8,5 мкм 10%, от 8,5 до 9,0 мкм 20%; от 9,0 до 9,5 мкм 63,3%, больше или равно 9,5 мкм 6,6% клеток. (Рис.12).

Отмечены достоверные различия в показателях ширины дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в следующих культурах: №1,4,7,9. В культурах №1 значение ширины фибробластов овец достоверно превышает ширину фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 12% и 11,5%. В культурах № 4 ширина фибробластов овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота на 11,8%. В культурах №7



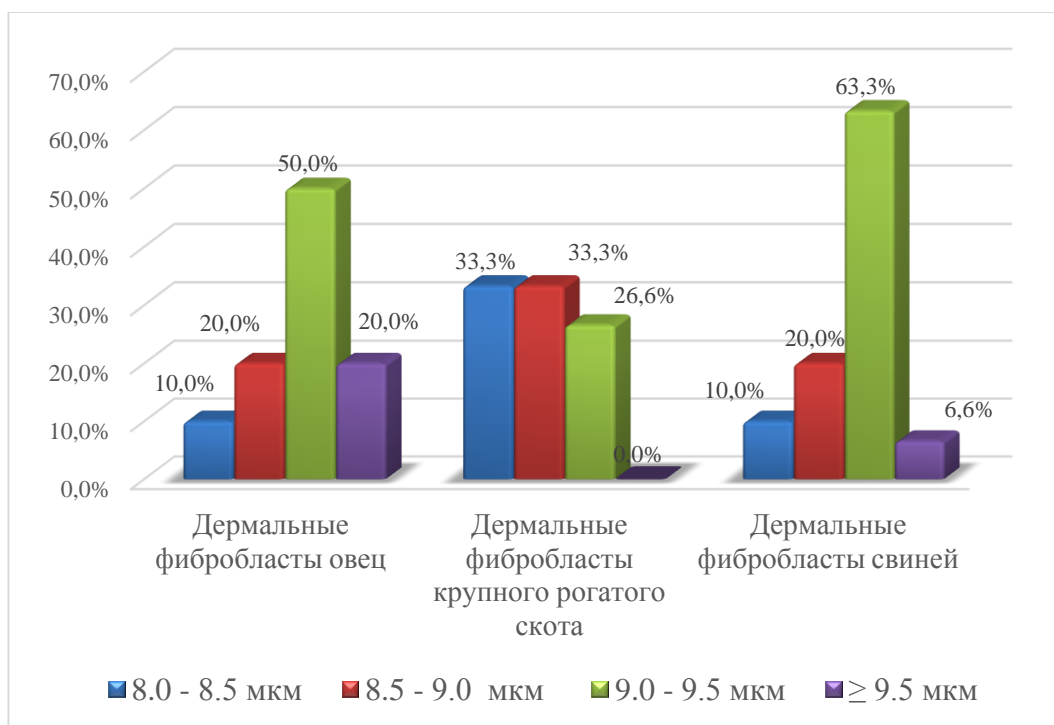
ширина фибробластов овец на 11% и 14,7% достоверно меньше ширины фибробластов крупного рогатого скота и свиней соответственно. В культурах №9 значения ширины фибробластов овец достоверно превышают ширину клеток крупного рогатого скота и свиней на 11,7% и 10,5% соответственно.

Через 48 часов культивирования показатели ширины фибробластов сельскохозяйственных животных колеблются в пределах 7,2 – 10,7 мкм.

**Таблица 5** - Показатели ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных через 48 часов культивирования (мкм,) n=30.

№ п/п культуры	Аутологичные дермальные фибробласты овец	Аутологичные дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Аутологичные дермальные фибробласты свиней
1	9,469±0,112 <sup>#</sup>	8,247±0,026 <sup>*</sup>	8,381±0,135 <sup>*</sup>
2	8,324±0,059	8,301±0,110	9,376±0,025
3	8,387±0,219	9,220±0,053	9,296±0,053
4	9,298±0,042	8,198±0,132 <sup>*</sup>	9,405±0,219
5	9,658±0,083	9,214±0,069	9,988±0,049
6	10,741±0,224	9,254±0,046	9,302±0,024
7	8,196±0,030 <sup>#</sup>	9,224±0,075 <sup>*</sup>	9,609±0,065 <sup>*</sup>
8	9,319±0,043	8,162±0,192	7,217±0,047
9	9,276±0,029 <sup>#</sup>	8,187±0,011 <sup>*</sup>	8,305±0,031 <sup>*</sup>
10	10,317±0,096	9,219±0,086	7,419±0,119
Среднее значение	9,398±0,036	8,920±0,050	8,889±0,037

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: # – p <0,05.



**Рисунок 12** – Процентное распределение фибробластов сельскохозяйственных животных по показателю ширины через 48 часов культивирования в среде DMEM.

Через 96 часов культивирования длина фибробластов сельскохозяйственных животных варьировалась следующим образом (таблица 6).

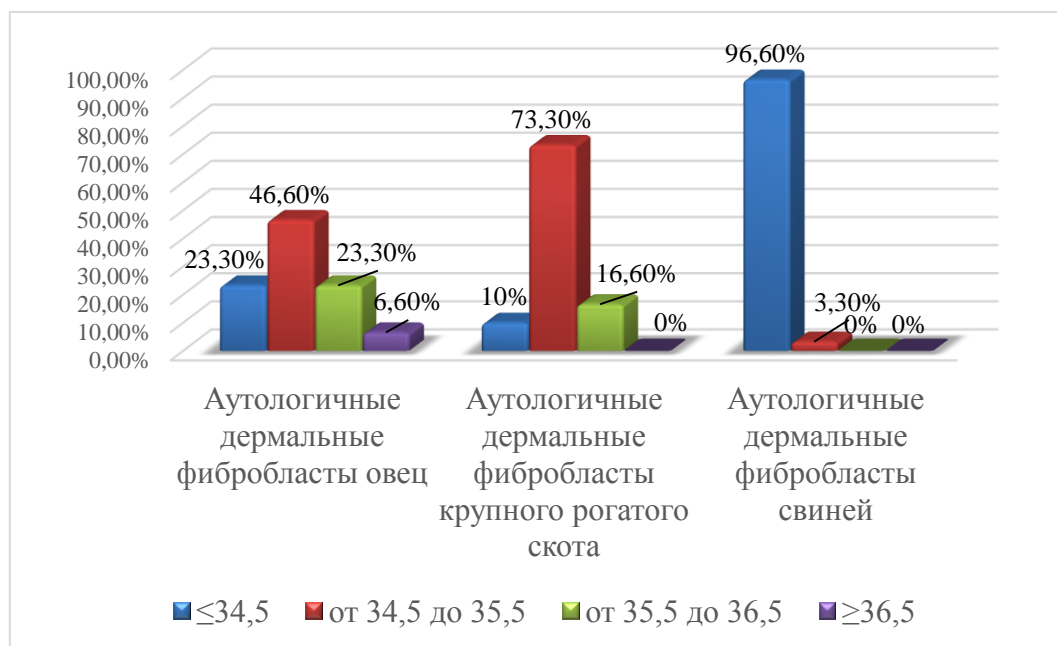
Отмечено достоверное различие в показателях длины клеток через 96 часов с начала культивирования в культурах аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных №2,7. В культурах дермальных фибробластов №2 длина клеток овец достоверно превышает длину фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 6% и 4,5% соответственно. В культурах фибробластов №7 длина клеток овец достоверно больше длины фибробластов крупного рогатого скота на 5,2%.

На временном промежутке 96 часов культивирования показатели длины фибробластов сельскохозяйственных животных колеблются в пределах 33,0 – 36,3 мкм.

**Таблица 6** – Показатели длины клеток фибробластов сельскохозяйственных животных через 96 часов культивирования (мкм) n=30.

№ п/п	Аутологичные дермальные фибробласты овец	Аутологичные дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Аутологичные дермальные фибробласты свиньи
1	34,980±0,580	34,04±0,741	33,662±0,579
2	35,104±0,692 <sup>#</sup>	33,051±0,672 <sup>*</sup>	33,545±0,685 <sup>*</sup>
3	34,657±0,340	35,45±0,327	33,679±0,974
4	35,374±0,541	36,231±0,284	34,311±0,715
5	35,658±0,324	34,185±0,941	33,459±0,525
6	35,040±0,480	35,147±0,751	34,317±0,446
7	36,367±0,435	34,452±0,974 <sup>*</sup>	33,367±0,557
8	34,102±0,397	35,890±0,272	33,657±0,881
9	35,610±0,298	34,860±0,355	33,541±0,621
10	35,870±0,819	34,698±0,374	33,995±0,410
Среднее значение	35,276±0,487	34,800±0,272	33,755±0,225

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p < 0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: # – p < 0,05.



**Рисунок 13** – Процентное распределение фибробластов сельскохозяйственных животных по показателю длины через 96 часов культивирования на среде DMEM.

Через 96 часов культивирования ширина аутологичных дермальных фибробластов составляла (таблица 7).

Отмечено достоверное различие в показателях ширины клеток через 96 часов с начала культивирования в культурах аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных № 4,5,9,10. В культурах дермальных фибробластов №4 ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 17% и 7% соответственно. В культурах фибробластов №5 ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота на 8,5% и меньше ширины фибробластов свиней на 1,5%. В культурах дермальных фибробластов №9 ширина клеток овец достоверно превышает ширину фибробластов крупного рогатого скота на 7,5%, а ширина фибробластов свиней достоверно больше ширины клеток овец на 4%. В культурах дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных №10 ширина фибробластов овец достоверно больше ширины клеток крупного рогатого скота на 9%, а ширина фибробластов свиней достоверно больше ширины клеток овец на 3%.

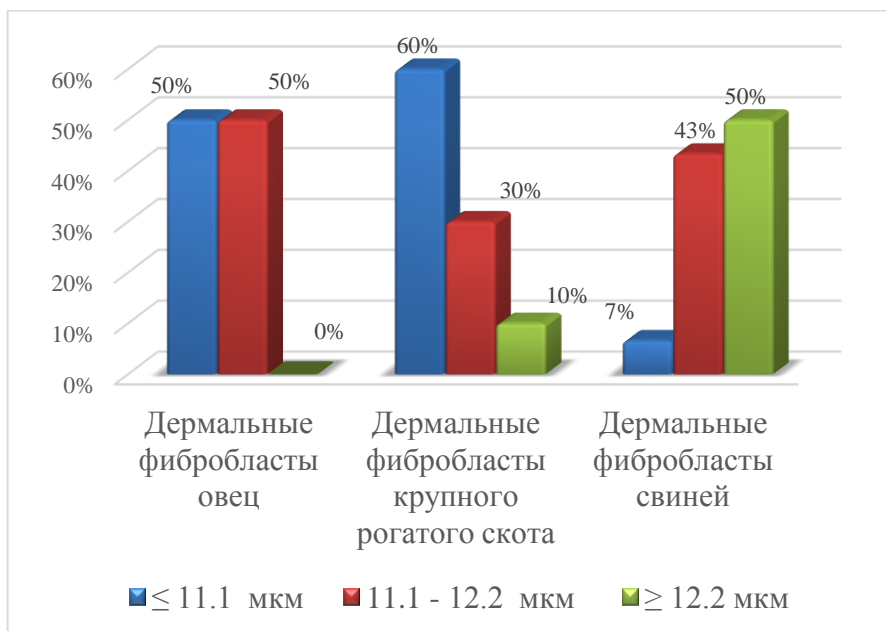
Показатели ширины аутологичных дермальных фибробластов после 96 часов культивирования в процентном отношении распределялись следующим образом: у овец меньше или равно 11,1 мкм 50%, 11,1 – 12,2 мкм 50%, больше или равно 12,2 мкм нет. У крупного рогатого скота: меньше или равно 11,1 мкм 60%, 11,1 – 12,2 мкм 30%, больше или равно 12,2 мкм 10%. У свиней: меньше или равно 11,1 мкм 6,6%, 11,1 – 12,2 мкм 43,3%, больше или равно 12,2 мкм 50% клеток соответственно (Рисунок 14).

На временном промежутке 96 часов культивирования показатели ширины фибробластов сельскохозяйственных животных колеблются в пределах 10,1 – 12,3 мкм.

**Таблица 7** – Показатели ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных через 96 часов культивирования в среде DMEM (мкм,) n=30.

№ п/п культур	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	11,101±0,521	10,993±0,523	10,156±0,426
2	11,096±0,419	10,983±0,689	12,208±0,526
3	12,135±0,359	11,952±0,716	12,249±0,621
4	12,081±0,557 <sup>#</sup>	10,025±0,689 <sup>*</sup>	11,231± 0,446 <sup>*</sup>
5	12,125±0,271 <sup>#</sup>	11,103±0,513 <sup>*</sup>	12,221±0,513 <sup>*</sup>
6	12,073±0,741	10,146±0,236	11,152±0,328
7	11,123±0,397	10,956±0,369	10,304±0,214
8	12,113±0,474	10,832±0,741	11,204±0,147
9	12,129±0,398 <sup>#</sup>	11,204±0,712 <sup>*</sup>	12,623±0,369 <sup>*</sup>
10	11,211±0,814 <sup>#</sup>	10,195±0,462 <sup>*</sup>	11,506±0,146 <sup>*</sup>
Среднее значение	11,718±0,505	10,838±0,582	11,485±0,840

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: # – p <0,05.



**Рисунок 14** – Процентное распределение клеток по показателю ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных через 96 часов культивирования.

В процессе культивирования с 24 до 96 часов показатели длины и ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных изменялись следующим образом (Таблица 8).

Инфографика, характеризующая увеличение длины клеток в процессе культивирования по усовершенствованной методике на среде DMEM (Рисунок 15).

В первые 24 часа культивирования длина дермальных фибробластов овец составляет  $23,655 \pm 0,386$  мкм, крупного рогатого скота  $21,270 \pm 0,424$  мкм, свиней  $22,816 \pm 0,471$  мкм. Установлено, что показатель длины фибробластов овец через 24 часа культивирования достоверно превышает показатель длины клеток крупного рогатого скота на 10%, а длина фибробластов свиней достоверно меньше показателя длины фибробластов овец на 4%.

Через 48 часов с начала культивирования установлены достоверные различия в показателях длины клеток, фибробласты овец на 0,5% короче, чем крупного рогатого скота.

У аутологичных дермальных фибробластов, полученных от овец через 48 часов после начала культивирования, отмечалось достоверное увеличение показателя длины на 22,5% по сравнению с показателями через 24 часа культивирования, для фибробластов крупного рогатого скота достоверное увеличение составляло 30%, для фибробластов свиней увеличение составляло 24%.

Через 96 часов культивирования установлено, что длина дермальных фибробластов овец достоверно больше длины клеток крупного рогатого скота на 1,5%, а длина клеток свиней достоверно меньше длины фибробластов овец на 4,5%.

За двое суток (с 48 часов до 96 часов) длина фибробластов у крупного рогатого скота и овец увеличилась на 14%, а у свиней на 11%.

Показатели ширины фибробластов сельскохозяйственных животных достоверно различались, через 24 часа культивирования клетки крупного рогатого скота и свиней на 3,2% и 14% соответственно шире, чем у овцы.

Сравнивая показатели через 24 часа и 48 часов культивирования, отмечено достоверное увеличение ширины фибробластов овец и свиней в 1,7 раза, а крупного рогатого скота в 1,5 раза.

Установлено, что через 48 часов культивирования ширина дермальных фибробластов овец достоверно превышала ширину фибробластов свиней на 5,5 %.

Через 96 часов культивирования было выявлено достоверное увеличение показателя ширины клеток у овец и у крупного рогатого скота на 19,5%, у свиней на 22,6%, по отношению к показателям ширины через 48 часов культивирования. Ширина фибробластов овец на 7,5% больше, чем у крупного рогатого скота и больше ширины фибробластов свиней на 3,1%.

Увеличение показателей длины и ширины клеток сельскохозяйственных животных в культурах аутологичных дермальных фибробластов во временные промежутки 24 – 48 часов в среднем в 1,5 и 2 раза соответственно, на наш взгляд, объясняется адаптацией клеток к условиям культивирования и накоплением в себе достаточного количества питательных веществ, поглощённых из культуральной среды DMEM. А замедление увеличения показателей длины и ширины в промежутке 48 – 96 часов культивирования в среднем на 10–12% связано с истощением запасов питательных веществ в культуральной среде и с тем, что клетки достигли своих максимальных размеров, как кластер незрелых клеток.

В процессе культивирования показатели площади фибробластов, полученных от опытных животных, варьировались следующим образом: в первые сутки культивирования значения площади фибробластов овец достоверно на 6,5% больше площади фибробластов крупного рогатого скота и на 11,5% меньше площади фибробластов свиней, а площадь фибробластов крупного рогатого скота достоверно меньше на 17,1% площади клеток свиней.

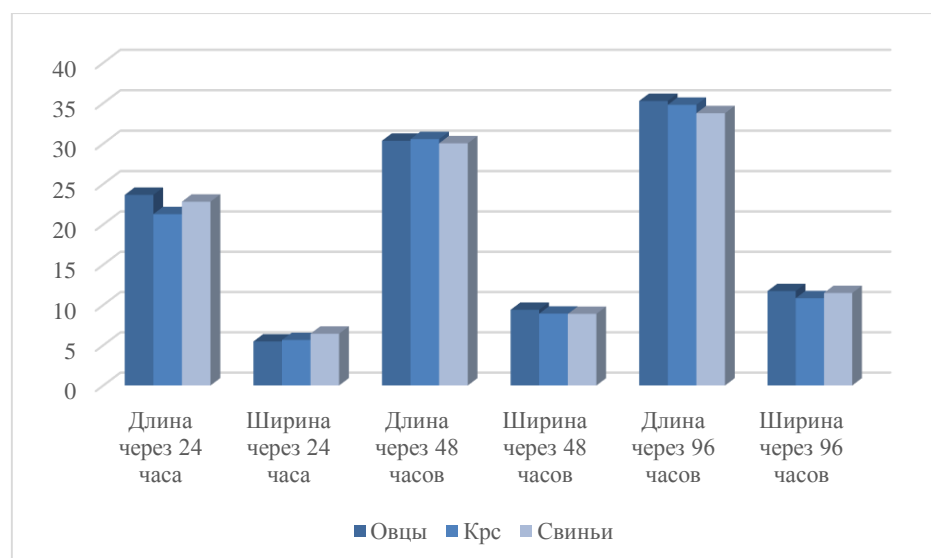
Сравнивая показатели первых и вторых суток, установили достоверное увеличение площади фибробластов сельскохозяйственных животных в 2 раза. Площадь фибробластов овец достоверно больше на 7% площади клеток свиней.

**Таблица 8** – Средние значения длины и ширины клеток дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования (мкм) n=30.

№ п/п	Временной промежуток	Фибробласты овец		Фибробласты крупного рогатого скота		Фибробласты свиней	
		Длина	Ширина	Длина	Ширина	Длина	Ширина
1	24 часа	23,655±0,386 <sup>#</sup>	5,468±0,374 <sup>#</sup>	21,270±0,424 <sup>*#</sup>	5,649±0,541 <sup>#</sup>	22,816±0,471 <sup>*#</sup>	6,431±0,683 <sup>#</sup>
2	48 часов	30,347±0,492 <sup>#</sup>	9,398±0,036 <sup>#</sup>	30,555±0,548 <sup>*#</sup>	8,920±0,050 <sup>#</sup>	30,035±0,282 <sup>#</sup>	8,889±0,037 <sup>*#</sup>
3	96 часов	35,276±0,487 <sup>#</sup>	11,718±0,505 <sup>#</sup>	34,800±0,272 <sup>#</sup>	10,838±0,582 <sup>*#</sup>	33,755±0,225 <sup>#</sup>	11,485±0,840 <sup>*#</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов сельскохозяйственных животных: \* – p <0,05; статистическая значимость различий размеров фибробластов по отношению к предыдущему временному отрезку: <sup>#</sup>– p <0,05





**Рисунок 15** – Динамика изменения показателей длины и ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования 96 часов (1 пассаж).

**Таблица 9** – Показатели площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования ( $\mu\text{км}^2$ )  $n=30$ .

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	24 часа	124,4±72,1 <sup>#</sup>	116,7±41,9 <sup>*#</sup>	140,9±62,7 <sup>*#</sup>
2	48 часов	275,7±64,2 <sup>*#</sup>	268,5±51,7 <sup>#</sup>	257,7±58,8 <sup>*#</sup>
3	96 часов	407,8±51,4 <sup>*#</sup>	371,6±72,2 <sup>*#</sup>	384,4±61,5 <sup>*#</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов разных видов животных: \* –  $p < 0,05$ ; статистическая значимость различий размеров фибробластов по отношению к предыдущему временному отрезку: # –  $p < 0,05$ .

На 96-й час культивирования отмечено достоверное увеличение показателей площади фибробластов по отношению ко вторым суткам (48 часам) у овец в 1,5 раза, 1,3 раза и 1,4 раза у фибробластов крупного рогатого скота и свиней соответственно. Установлены достоверные различия в показателях площади овец, крупного рогатого скота и свиней, и разница составляет 9% и 6% соответственно.

При сравнении числовых показателей ЯЦО аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных через 96 часов культивирования установлено, что у фибробластов овец ЯЦО больше на 10%, чем у фибробластов свиней, и на 20,8% больше, чем ЯЦО аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота (таблица 10).

**Таблица 10** – Показатель ЯЦО фибробластов сельскохозяйственных животных (n=30).

№ п/п	Временной промежуток	Овцы	Крупный рогатый скот	Свиньи
1	96 часов	0,067±0,009*	0,053±0,005*	0,060±0,007*

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов разных видов животных: \* –  $p < 0,05$ .

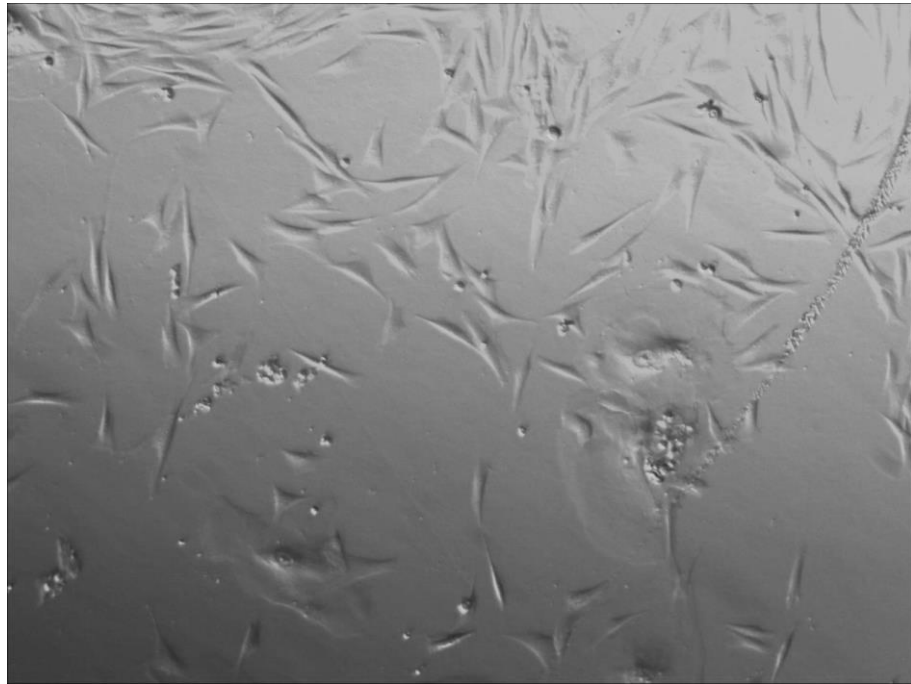
Функциональная активность фибробластов в культурах, полученных от сельскохозяйственных животных, определялась на основании значений оптической плотности ядра. По имеющимся литературным данным оптическая плотность ядра у нормально функционирующих клеток должна находиться в пределах 0,4 – 1 ед. яркости (А.В. Куркин и др., 2014). Полученные нами данные относительно оптической плотности ядра клеток аутологичных дермальных фибробластов представлены в таблице 11.

**Таблица 11** – Показатели оптической плотности ядра клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных (Ед. яркости) n =30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1.	96 часов	0,564±0,376 <sup>#</sup>	0,495±0,492*	0,515±0,413*

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов разных видов животных: \* –  $p < 0,05$ .

Установлено наличие достоверных различий в показателях оптической плотности ядер аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных: оптическая плотность ядра овец больше оптической плотности ядер свиней на 8,6% и на 12,2% крупного рогатого скота соответственно (таблица 11).



**Рисунок 16** – Участок культуры аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота через 96 часов культивирования в среде DMEM, Ув.×200.

На рисунке 16 изображен участок культуры дермальных фибробластов крупного рогатого скота через 96 часов культивирования на среде DMEM (1 пассаж). Форма клеток удлиненная, имеются 1 – 3 отростка, происходит образование коллагеновых нитей между клетками. Отношение длины к ширине клеток 3:1, это же характерно для культур аутологичных дермальных фибробластов овец и свиней через 96 часов культивирования в среде DMEM.

По истечении 96 часов культивирования 1 пассажа культуры подвергались пересеву по методике, описанной в разделе «Материалы и методы исследований», и культивировались дальше. Во время второго пассажа культур аутологичных дермальных фибробластов

сельскохозяйственных животных были получены следующие морфометрические показатели длины клеток (таблица 12):

**Таблица 12** – Показатели длины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (2 пассаж) (мкм) n=30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	24 часа	35,720±0,521 <sup>#</sup>	33,272±0,751 <sup>*#</sup>	32,762±0,685 <sup>*#</sup>
2	48 часов	37,350±0,498 <sup>#</sup>	36,427±0,529 <sup>*#</sup>	35,384±0,728 <sup>*#</sup>
3	96 часов	40,217±0,472 <sup>#</sup>	39,653±0,621 <sup>*#</sup>	38,954±0,431 <sup>*</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов сельскохозяйственных животных: \* –  $p < 0,05$ ; статистическая значимость различий размеров фибробластов по отношению к предыдущему временному отрезку: <sup>#</sup> –  $p < 0,05$

В ходе культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных выявлены достоверные различия в показателях длины фибробластов овец крупного рогатого скота между 96 часами культивирования 1 пассажа и 24 часами культивирования 2 пассажа, увеличение длины клеток у овец составило 10,6%, у клеток крупного рогатого скота 5,1% и у клеток свиней 9,5%.

Отмечены различия в показателях длины аутологичных дермальных фибробластов, длина клеток овец достоверно больше длины клеток крупного рогатого скота и свиней на 7% и 8,5% соответственно.

Сравнивая показатели длины клеток через 24 и 48 часов культивирования (2 пассаж), установлены достоверные различия в показателях длины фибробластов сельскохозяйственных животных. Для

фибробластов овец отмечено увеличение на 7%, для фибробластов крупного рогатого скота на 11,5%, для фибробластов свиней на 10,2%.

Через 48 часов культивирования второго пассажа установлены достоверные различия между показателями длины фибробластов сельскохозяйственных животных. Длина клеток овец достоверно больше длины фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 2,5% и 5,5% соответственно.

Сравнивая показатели длины клеток через 48 и 96 часов культивирования (2 пассаж), установлены достоверные различия. Длина фибробластов овец увеличилась на 7%, крупного рогатого скота на 8%, свиней на 9%.

Через 96 часов культивирования второго пассажа установлены достоверные различия между показателями длины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Длина клеток овец достоверно больше длины фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 1,5% и 3,1% соответственно.

В ходе второго пассажа ширина аутологичных дермальных фибробластов менялась (таблица 13).

В ходе культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных выявлены достоверные различия в показателях ширины фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней между 96 часами культивирования 1 пассажа и 24 часами культивирования 2 пассажа. Увеличение показателей ширины клеток овец составляло 30%, крупного рогатого скота 28,6%, свиней 29,5%.

Отмечены различия в показателях ширины аутологичных дермальных фибробластов, ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота на 3,5%, а ширина клеток свиней достоверно больше ширины фибробластов овец на 2%.

Сравнивая показатели ширины клеток через 24 и 48 часов культивирования (2 пассаж), установлены достоверные различия в

показателях ширины фибробластов сельскохозяйственных животных. Для фибробластов овец и свиней отмечено увеличение на 36%, для фибробластов крупного рогатого скота на 31%.

Через 48 часов культивирования второго пассажа установлены достоверные различия между показателями ширины фибробластов сельскохозяйственных животных. Ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота на 7%, а ширина клеток свиней достоверно больше ширины фибробластов овец на 1,5%.

Сравнивая показатели ширины клеток через 48 и 96 часов культивирования (2 пассаж), установлены достоверные различия. Ширина фибробластов овец увеличилась на 11%, крупного рогатого скота 14%, свиней на 11,5%.

**Таблица 13** – Показатели ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (2 пассаж) мкм.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	24 часа	10,945±0,464 <sup>*#</sup>	9,874±0,642 <sup>*#</sup>	10,473±0,601 <sup>*#</sup>
2	48 часов	13,967±0,388 <sup>*#</sup>	13,018±0,519 <sup>*#</sup>	14,202±0,717 <sup>*#</sup>
3	96 часов	15,841±0,372 <sup>*#</sup>	15,114±0,683 <sup>*#</sup>	16,021±0,441 <sup>*#</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов сельскохозяйственных животных: \* –  $p < 0,05$ ; статистическая значимость различий размеров фибробластов по отношению к предыдущему временному отрезку: # –  $p < 0,05$

Через 96 часов культивирования второго пассажа установлены достоверные различия между показателями ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого

скота на 4,5%, а ширина клеток свиней больше ширины фибробластов овец на 1,1%.

Увеличение показателей длины и ширины клеток сельскохозяйственных животных в культурах аутологичных дермальных фибробластов (2 пассаж) во временные промежутки 24 – 48 часов в среднем на 10% и 33% соответственно, что также связано с адаптацией клеток к условиям культивирования и достаточным запасом в них питательных веществ. Снижение интенсивности роста в промежутке 48 – 96 часов культивирования в среднем на 10%, на наш взгляд, связано с истощением питательного состава культуральной среды, развитием эндоплазматических сетей и подготовкой клеток к синтезу белков. Клетки к этому времени достигают максимальных размеров и переходят на следующий этап созревания.

По завершении второго пассажа площадь аутологичных дермальных фибробластов составляла (Табл. 14).

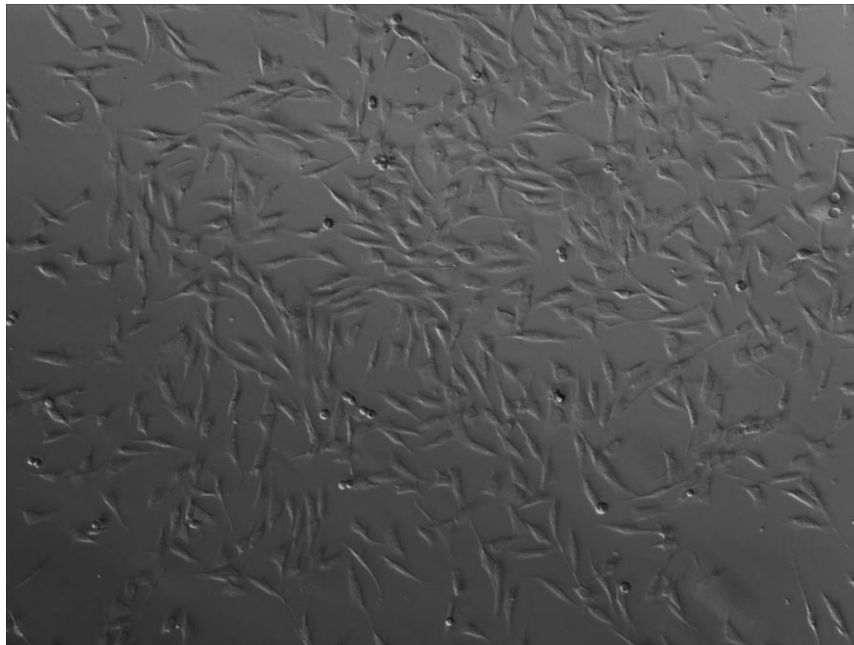
Установлены достоверные различия показателей площади сельскохозяйственных животных по завершении 2 пассажа. Площадь фибробластов овец больше площади клеток крупного рогатого скота на 2% и меньше площади клеток свиней на 1,5% соответственно.

**Таблица 14** – Показатели площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования (мкм<sup>2</sup>) n=30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	96 часов	594,4±51,4 <sup>*#</sup>	586,6±72,2 <sup>*</sup>	601,8±61,5 <sup>*#</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: # – p <0,05.

При анализе данных ЯЦО и измерений оптической плотности ядер установлено, что показатели ЯЦО и оптической плотности дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, полученные в ходе 1 и 2 пассажей, существенно не изменялись.



**Рисунок 17** – Участок культуры аутологичных дермальных фибробластов свиней спустя 96 часов культивирования в среде DMEM (2 пассаж). Ув.×100

На рисунке 17 изображен участок культуры дермальных фибробластов свиней через 96 часов культивирования на среде DMEM (2 пассаж). Форма клеток удлинённая, имеются 1 – 3 отростка, происходит образование коллагеновых нитей между клетками. Отношение длины к ширине клеток 3:1, это же характерно для культур аутологичных дермальных фибробластов овец и крупного рогатого скота через 96 часов культивирования в среде DMEM.

По истечении 96 часов культивирования 2 пассажа культуры подвергались пересеву по методике, описанной в разделе «Материалы и методы исследований», и культивировались дальше. Во время третьего пассажа культур аутологичных дермальных фибробластов



сельскохозяйственных животных были получены следующие морфометрические показатели длины клеток:

**Таблица 15** – Показатели длины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (3 пассаж) (мкм) n=30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	24 часа	41,720±0,521 <sup>#</sup>	42,272±0,751 <sup>*</sup>	40,762±0,685 <sup>*</sup>
2	48 часов	43,350±0,498 <sup>#</sup>	44,427±0,529 <sup>*</sup>	42,384±0,728 <sup>*#</sup>
3	96 часов	45,217±0,472 <sup>#</sup>	45,653±0,621 <sup>*#</sup>	44,954±0,431 <sup>*#</sup>

Примечание: статистическая значимость различий фибробластов сельскохозяйственных животных: \* – p <0,05; статистическая значимость различий размеров фибробластов по отношению к предыдущему временному отрезку: <sup>#</sup>– p <0,05

В ходе культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных выявлены достоверные различия в показателях длины фибробластов овец, крупного рогатого скота между 96 часами культивирования 2 пассажа и 24 часами культивирования 3 пассажа, увеличение длины клеток у овец составило 3,6%, у клеток крупного рогатого скота 6,1% и у клеток свиней 4,3%.

Отмечены различия в показателях длины аутологичных дермальных фибробластов, длина клеток овец достоверно меньше длины клеток крупного рогатого скота и свиней на 1,5% и больше длины фибробластов свиней на 2,2%.

Сравнивая показатели длины клеток через 24 и 48 часов культивирования (3 пассаж), установлены достоверные различия в

показателях длины фибробластов сельскохозяйственных животных. Для фибробластов овец отмечено увеличение на 3,7%, для фибробластов крупного рогатого скота на 4,8%, для фибробластов свиней на 3,8%.

Через 48 часов культивирования третьего пассажа установлены достоверные различия между показателями длины фибробластов сельскохозяйственных животных. Длина клеток овец достоверно меньше длины фибробластов крупного рогатого скота на 2,5% и больше длины фибробластов свиней на 2,5% соответственно.

Сравнивая показатели длины клеток через 48 и 96 часов культивирования (3 пассаж), установлены достоверные различия. Длина фибробластов овец увеличилась на 4,1%, крупного рогатого скота на 2,6%, свиней на 5,7%.

Через 96 часов культивирования третьего пассажа установлены достоверные различия между показателями длины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Длина клеток овец достоверно меньше длины фибробластов крупного рогатого скота на 1% и больше длины фибробластов свиней на 0,5% соответственно.

В ходе третьего пассажа ширина аутологичных дермальных фибробластов менялась (Таблица 16).

В ходе культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных выявлены достоверные различия в показателях ширины фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней между 96 часами культивирования 2 пассажа и 24 часами культивирования 3 пассажа. Увеличение ширины клеток овец составляло 2,5%, крупного рогатого скота 10,4%, свиней 5,7%.

Отмечены различия в показателях ширины аутологичных дермальных фибробластов, ширина клеток овец достоверно меньше ширины фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 4% и 4,6% соответственно.

Сравнивая показатели ширины клеток через 24 и 48 часов культивирования (3 пассаж), установлены достоверные различия в показателях ширины фибробластов сельскохозяйственных животных. Для фибробластов овец на 10%, свиней на 1,5%, для фибробластов крупного рогатого скота на 1%.

Через 48 часов культивирования третьего пассажа установлены достоверные различия между показателями ширины фибробластов сельскохозяйственных животных. Ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота на 5,5%, а ширина клеток свиней достоверно меньше ширины фибробластов овец на 4,5%.

Сравнивая показатели ширины клеток через 48 и 96 часов культивирования (3 пассаж), установлены достоверные различия. Ширина фибробластов овец увеличилась на 9,5%, крупного рогатого скота на 6%, свиней на 4,5%.

**Таблица 16** – Показатели ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (3 пассаж) (мкм) n=30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	24 часа	16,205±0,574 <sup>#</sup>	16,874±0,532 <sup>*#</sup>	16,993±0,521 <sup>#</sup>
2	48 часов	17,967±0,278 <sup>#</sup>	17,018±0,429 <sup>*</sup>	17,202±0,617 <sup>*#</sup>
3	96 часов	19,841±0,342 <sup>*#</sup>	18,114±0,573 <sup>*#</sup>	18,021±0,331 <sup>*#</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов сельскохозяйственных животных: \* – p < 0,05; статистическая значимость различий размеров фибробластов по отношению к предыдущему временному отрезку: <sup>#</sup> – p < 0,05

Через 96 часов культивирования второго пассажа установлены достоверные различия между показателями ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Ширина

клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 4,5% и 8,7% соответственно.

Увеличение показателей длины и ширины клеток сельскохозяйственных животных в культурах аутологичных дермальных фибробластов (3 пассаж) во временные промежутки 24 – 48 часов в среднем на 4% и 4,5%, соответственно, обуславливается адаптацией клеток к условиям культивирования и накоплением в себе достаточного количества питательных веществ, поглощённых из культуральной среды DMEM. А замедление увеличения показателей длины и ширины в промежутке 48 – 96 часов культивирования в среднем до 6,5% и 4,5% связано с истощением запасов питательных веществ в культуральной среде, развитием эндоплазматических сетей и подготовкой клеток к синтезу белков и с тем, что клетки достигли своих максимальных размеров, переходят на следующий этап созревания.

По завершении третьего пассажа площадь аутологичных дермальных фибробластов составляла (таблица 17).

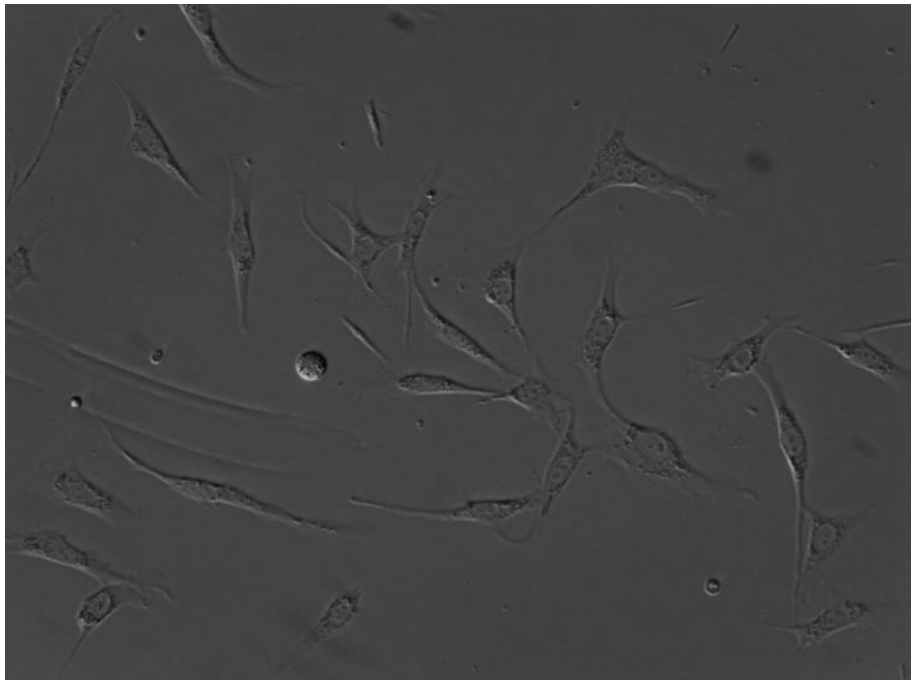
Установлены достоверные различия показателей площади сельскохозяйственных животных по завершении 3 пассажа. Площадь фибробластов овец больше площади клеток крупного рогатого скота и свиней на 8% и 9,6% соответственно.

**Таблица 17** – Показатели площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования (мкм<sup>2</sup>) n=30

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	96 часов	894,9±86,7* <sup>#</sup>	825,3±72,2*	808,2±61,5* <sup>#</sup>

*Примечание:* статистическая значимость различий фибробластов овец: \* – p <0,05; статистическая значимость различий фибробластов свиней: <sup>#</sup> – p <0,05.

При анализе данных ЯЦО и измерений оптической плотности ядер клеток 3 пассажа установлено, что показатели ЯЦО и оптической плотности дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, полученные в ходе 2 и 3 пассажей, существенно не изменялись.



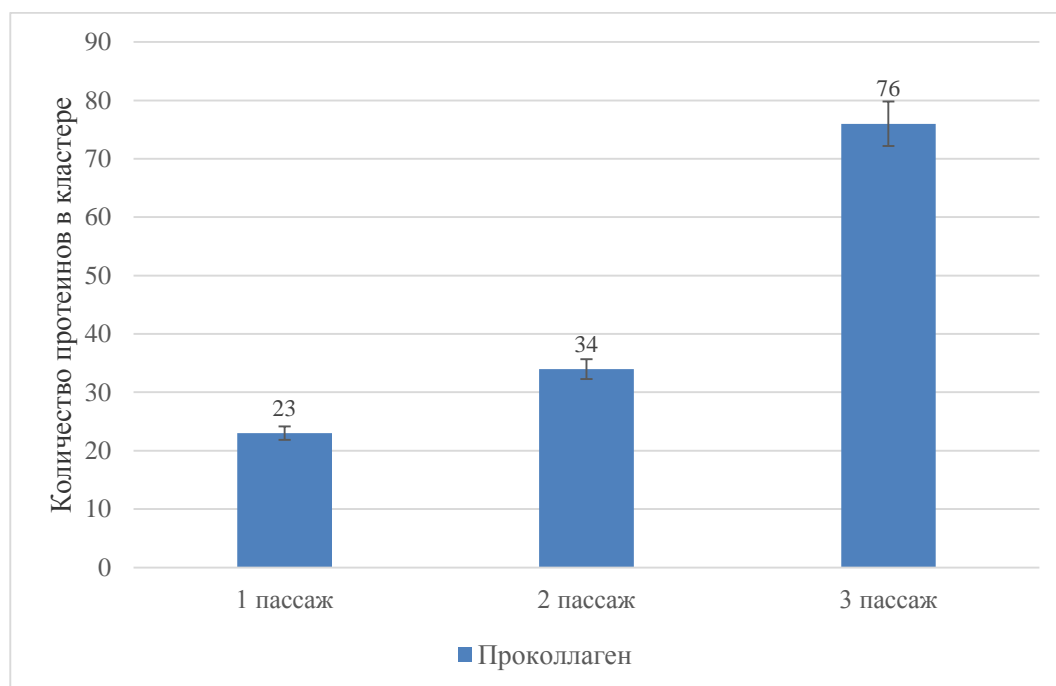
**Рисунок 18** – Единичные дермальные фибробласты свиньи через 24 часа культивирования в среде DMEM (3 пассаж).

На рисунке 18 изображены единичные аутологичные дермальные фибробласты свиньи, на данном этапе культивирования для клеток характерна веретенообразная форма, с длинными отростками, ядро овальной формы с 2-3 ядрышками, что свидетельствует о высокой пролиферативной активности клеток. В культуре хорошо видны нити коллагена, продуцируемые фибробластами.

### 2.2.3. Сравнительная функциональная характеристика аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования на среде DMEM

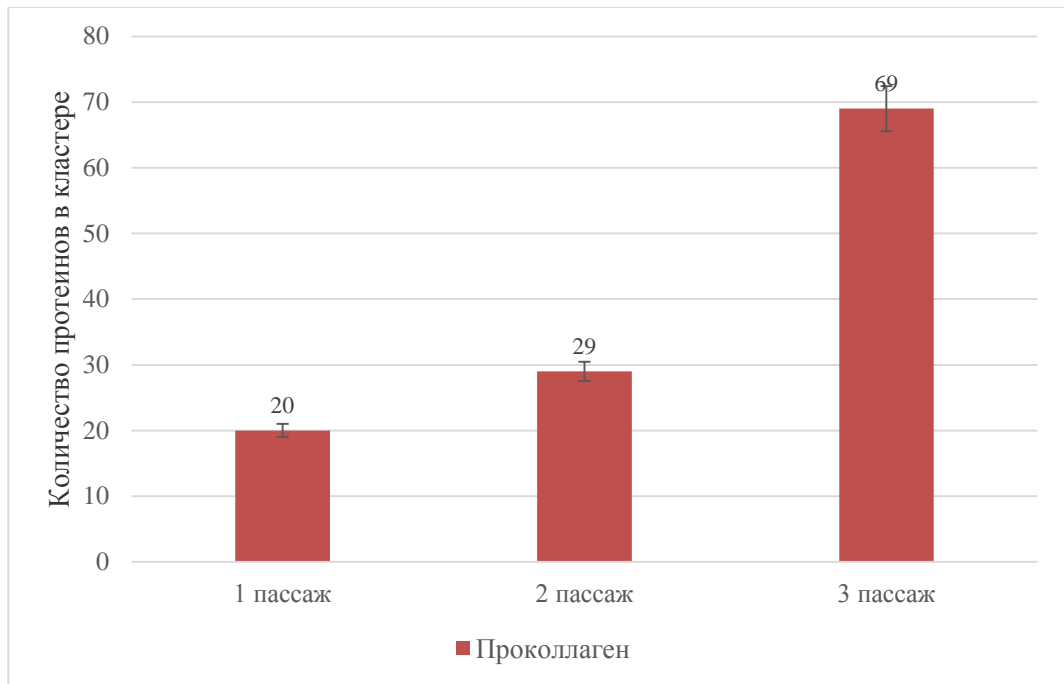
Аутологичные дермальные фибробласты сельскохозяйственных животных культивировались до 5 пассажей, после чего с помощью метода масс-спектрометрии определяли наличие белков по спектрам.

По каждому спектру был получен масс-лист с указанием отношения массы к заряду ( $m/z$ ) каждого пика, его площади и интенсивности. Эти данные экспортировали в таблицы MS Excel, и значения площадей в повторных измерениях усредняли.



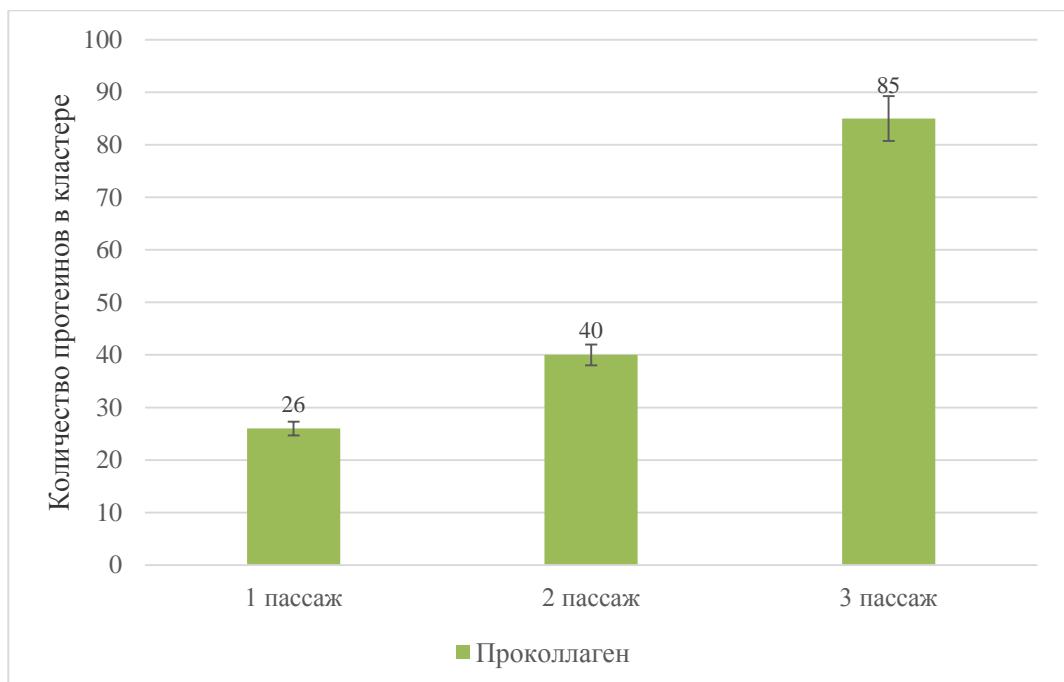
**Рисунок 19** – Количество проколлагена, выделяемого фибробластами овец в процессе культивирования.

При 1 пассаже количество продуцируемого дермальными фибробластами овец проколлагена составляет 23%, ко второму пассажу количество проколлагена увеличивается на 34%, а к третьему пассажиру на 57%.



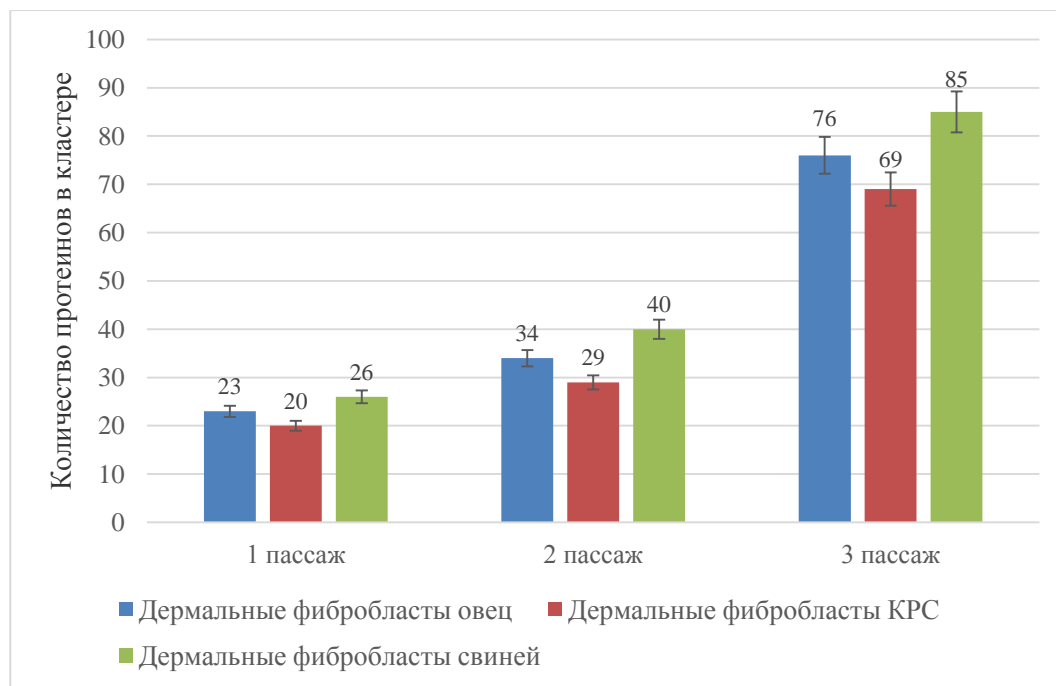
**Рисунок 20** – Количество проколлагена, выделяемого фибробластами крупного рогатого скота в процессе культивирования.

Количество продуцируемого проколлагена дермальными фибробластами крупного рогатого скота при первом пассаже составляет 31%, ко второму пассажу количество продуцируемого проколлагена увеличивается на 32%, а к третьему пассажу на 60%.



**Рисунок 21** – Количество проколлагена, выделяемого фибробластами свиней в процессе культивирования.

Количество проколлагена при первом пассаже у фибробластов свиней составляет 27%. Ко второму пассажиру количество накопленного в клетке проколлагена увеличивается на 33%. К третьему пассажиру в дермальных фибробластах свиньи количество проколлагена увеличивается на 53%.



**Рисунок 22** – Количество продуцируемого проколлагена дермальными фибробластами сельскохозяйственных животных.

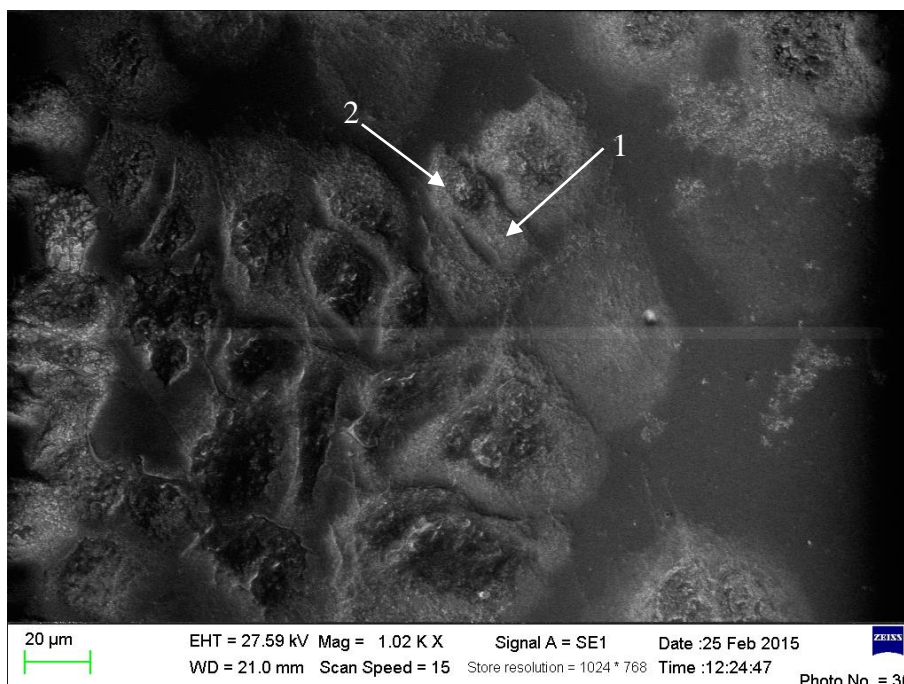
Количество проколлагена, продуцируемого дермальными фибробластами свиней, на 23% больше, чем у крупного рогатого скота, достоверных различий по количеству продуцируемого проколлагена между фибробластами свиней и овец не выявлено. Ко второму пассажиру в клетках развивается эндоплазматическая сеть, начинается синтез белков, в связи с этим увеличивается количество проколлагена, синтезируемого фибробластами. Количество синтезируемого проколлагена в фибробластах свиней на 15% больше, чем у фибробластов овец, и на 28% больше, чем у фибробластов крупного рогатого скота. Максимальный пик количества синтезируемого проколлагена у фибробластов свиней отмечается на 3-й пассаж, и его количество на 10% больше, чем у фибробластов овец, и на 19% больше, чем у фибробластов крупного рогатого скота. Максимальные



пики количества проколлагена в фибробластах овец нами отмечались на 4-й пассаж, а у крупного рогатого скота на 5-й пассаж. Факт максимального пика количества проколлагена в фибробластах свиней к 3 пассажиру мы связываем скороспелостью свиней.

#### 2.2.4. Оценка жизнеспособности культур клеток аутологичных дермальных фибробластов при их культивировании в среде DMEM.

Оценка типологической принадлежности клеток в полученных культурах дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных выполнялась с помощью сканирующей электронной микроскопии на базе ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».



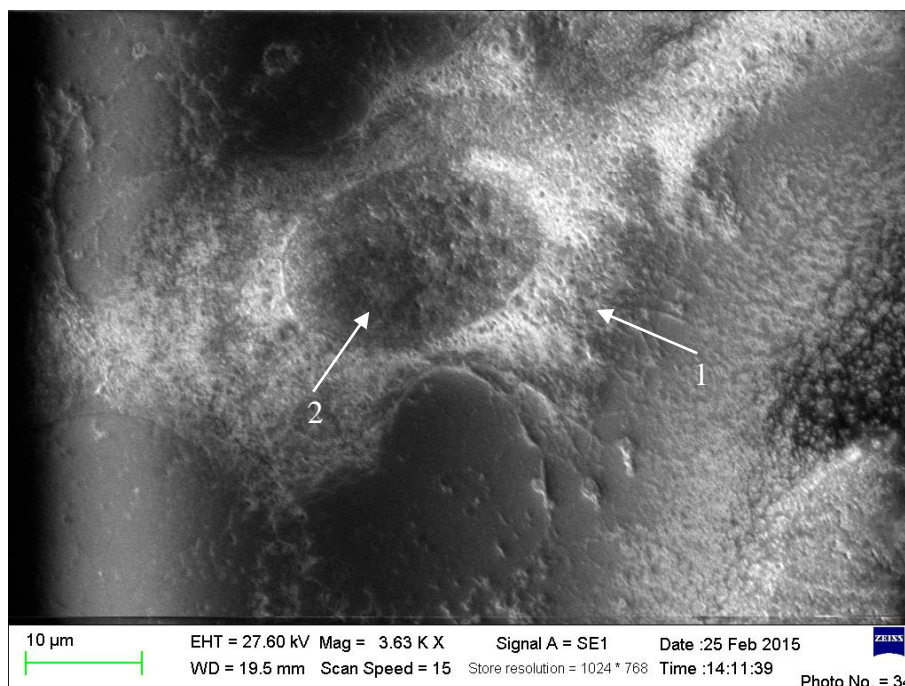
**Рисунок 23** – Культура аутологичных дермальных фибробластов овцы. 96 часов культивирования (1 пассаж) (1 – тело фибробласта, 2 – ядро фибробласта с ядрышками).

Оценка жизнеспособности проводилась на основании системы экспертных оценок (Шиган, 1986), по следующим параметрам:

1. Вакуолизация;
2. Адгезия;
3. Качество монослоя.

В результате экспертной оценки, проведенной специалистами ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», культурам была дана балльная характеристика (5 баллов – отличное, 4

балла удовлетворительное, 3 – неудовлетворительное качество культуры) (Табл. 18).



**Рисунок 24** – Единичный аутологичный дермальный фибробласт овцы (2 пассаж) (1 – цитоплазма фибробласта, 2 – ядро фибробласта).

Шесть культур аутологичных дермальных фибробластов овец первого пассажа были оценены как культуры отличного качества по следующим признакам: отсутствие вакуолизированных и плохо прикрепившихся клеток, образование монослоя на 3 сутки. Четыре культуры были оценены как культуры хорошего качества по следующему признаку: образование монослоя на 4 сутки. Три культуры аутологичных дермальных фибробластов овец второго пассажа были оценены как культуры хорошего качества, по следующим признакам: образование монослоя на 4 сутки и выявление единичных клеток с вакуолями. В третьем пассаже 7 культур аутологичных дермальных фибробластов овец были оценены как культуры отличного качества по следующим признакам: отсутствие клеток с вакуолями и образование монослоя на 3 сутки, а также на основании того, что все клетки в этих культурах были распластаны и имели удлиненную форму с длинными псевдоподиями. Три культуры были оценены как культуры хорошего качества по причине

выявления единичных вакуолизированных, и плохо прикрепившихся клеток полуокруглой формы с короткими псевдоподиями.

Пять культур аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота в первом пассаже были оценены как культуры отличного качества по следующим признакам: отсутствие плохо прикрепившихся и вакуолизированных клеток, образование монослоя на 3 сутки. 5 культур были оценены как культуры хорошего качества по следующим признакам: наличие плохо прикрепившихся полуокруглых клеток с короткими псевдоподиями. Во втором пассаже 8 культур дермальных фибробластов крупного рогатого скота были оценены как культуры отличного качества, и 2 культуры как культуры хорошего качества по следующим признакам: наличие единичных плохо прикрепившихся клеток полуокруглой формы и единичных клеток с вакуолями. В третьем пассаже 7 культур фибробластов крупного рогатого скота были оценены как культуры отличного качества, так как в них отсутствовали клетки с вакуолями и все клетки имели вытянутую форму с длинными псевдоподиями, монослой в данных культурах был образован на 3 сутки. Три культуры аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота была оценены как культуры хорошего качества в связи с наличием единичных клеток с вакуолями, присутствием клеток полуокруглой формы с короткими псевдоподиями, что свидетельствовало о их плохой адгезии к поверхности субстрата и образованием в этих культурах монослоя на 4 сутки.

В первом пассаже 7 культур аутологичных дермальных фибробластов свиней были оценены как культуры отличного качества по следующим признакам: отсутствие вакуолизированных клеток, отсутствие плохо прикрепившихся клеток, образование монослоя на 3 сутки. Только одна культура аутологичных дермальных фибробластов свиней была оценена в 4 балла по следующим признакам: наличие плохо прикрепившихся клеток полуокруглой формы с короткими

псевдоподиями, формирования монослоя на 4 сутки. Две культуры клеток были оценены как культуры удовлетворительного качества по следующему признаку: наличие множества вакуолизированных клеток. В ходе 2 пассажа из 10 культур 2 были оценены как культуры хорошего качества по причине наличия в них единичных вакуолизированных и плохо прикрепившихся клеток. В ходе 3 пассажа 2 культуры были оценены как культуры хорошего качества по следующим признакам: наличие единичных плохо прикрепившихся клеток полуокруглой формы, образование монослоя на 4 сутки, 8 культур были оценены как культуры отличного качества (таблица 18).

Такие морфометрические параметры клеток, как периметр (далее  $P$ ), площадь (далее  $S$ ), не могут в полной мере охарактеризовать жизнеспособность культур. Это вызвано тем, что увеличение или уменьшение  $P$  или  $S$  не дают представления о форме клетки. В то же время такие параметры, как компактность (далее  $C$ ), центральные моменты первого и третьего порядка (далее  $F_1$  и  $F_3$ ) и их разность, отражают информацию о форме клетки, но не дают представления о её размере.

На основании вышеизложенного целесообразно для оценки жизнеспособности культур клеток использовать интегральные показатели, одним из которых является энтропийный эквивалент (далее ЭЭ). Это связано с тем, что ЭЭ отражает состояние объекта с его термодинамической стороны, а его изменение объясняется однозначно: увеличение ЭЭ свидетельствует о росте энтропии системы, в то же время это говорит об ухудшении функционального состояния (И.Г. Герасимов, 1998).

Для расчета ЭЭ следует использовать не коррелирующие между собой показатели в количестве 3-4. В связи с этим для расчета ЭЭ целесообразно использовать такие параметры, как  $C$ , поскольку это интегральный показатель  $P$  и  $S$ , разницу дескрипторов ( $F_3 - F_1$ ) и

нормированный дескриптор Фурье (далее FF), на основании которых составляется корреляционная матрица (3x3).

Поскольку ЭЭ представляет собой свертку корреляционной матрицы, где диагональные члены имеют смысл корреляции, а внедиагональные – вероятностей. На основании полученных данных морфометрических исследований ( $S$ ,  $P$ ,  $C$ ,  $F_1$ ) и для определения жизнеспособности культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных использовалась методика И.Г. Герасимова.

В ходе расчетов были получены следующие значения ЭЭ (усл.ед.), представленные в (таблица 19).

При сравнении результатов расчета ЭЭ и экспертного заключения были установлены следующие закономерности: у культур, оценённых экспертами в 5 баллов, величина ЭЭ находится в пределах 1,5 – 1,9 усл.ед., в 4 балла – значения распределились в следующем вариативном интервале 2,0 – 2,6 усл. ед., в 3 балла – в числовом интервале 2,7 – 3,2.

При анализе данных, представленных в таблице 19, установлено, что среднее значение ЭЭ у культур фибробластов овец, которым была дана оценка 5 баллов, составляло 1,74 усл. ед., 4 балла – 2,3 усл. ед. У культур аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота, оцененных в 5 баллов среднее значение ЭЭ равнялось 1,69 усл. ед., в 4 балла – 2,30 усл. ед. Для культур фибробластов свиней, оцененных в 5 баллов, среднее значение ЭЭ составляло 1,71 усл. ед., для культур, оцененных в 4 балла, среднее значение ЭЭ было 2,33 усл.ед., у культур, оцененных в 3 балла, ЭЭ равнялся 2,96 усл.ед.

Для фибробластов такие параметры, как  $S$  и  $C$ , коррелируют между собой так же, как и центральные моменты  $F_1$  и  $F_3$  и разница дескрипторов  $F_1-F_3$  между собой ( $r > 0.75$ ,  $P < 0.1$ ), тем не менее корреляция между  $P$  и другими параметрами минимальна ( $r < 0.3$ ,  $P > 0.5$ ). Скорее всего, это

связано с отсутствием округлых клеток, для которых характерна корреляция параметров  $S$  и  $C$ , что сходно с мнением И.Г. Герасимова.

Поэтому для расчета ЭЭ и оценки жизнеспособности фибробластов составляли корреляционную матрицу (размером  $4 \times 4$ ), на основании показателей параметров  $P$ ,  $C$ ,  $(F_3 - F_1)$  и  $FF$ . Для анализа отбирали  $30 \pm 3$  клеток. На основании полученных данных распределили клетки по кластерам, что совпало с оценкой экспертов: культуры, оцененные ими в 5 баллов (63 культуры, 9 наблюдений), составили один кластер, в 4 балла (25 и 9 соответственно) — другой и в 3 балла (2 и 3 соответственно) — третий кластер. Кластеризация по величине ЭЭ дает нам основание полагать о пригодности этого метода для оценки жизнеспособности культуры, так как позволяет еще в процессе культивирования выявлять культуры плохого качества, соответствующие маложиливым культурам, и непригодные для дальнейшего ведения прививаемых клеточных линий. В таких культурах большая часть клеток будет погибшей, остальные по своим показателям также будут нежизнеспособными.

На примере культур клеток фибробластов и оценки их жизнеспособности на основании ЭЭ позволяет получать результаты более доступным и экономически выгодным способом, по сравнению с известными методами и приемами.

**Таблица 18** – Количество культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных различного качества в процессе культивирования на среде DMEM n=30.

№ п/п	Пассаж культур	Дермальные фибробласты овец		Дермальные фибробласты крупного рогатого скота		Дермальные фибробласты свиней		
		Культуры отличного качества	Культуры хорошего качества	Культуры отличного качества	Культуры хорошего качества	Культуры отличного качества	Культуры хорошего качества	Культуры удовлетворительного качества
1	Первый пассаж	6	4	5	5	7	1	2
2	Второй пассаж	7	3	8	2	8	2	0
3	Третий пассаж	7	3	7	3	8	2	0

**Таблица 19** – Показатели энтропийного эквивалента культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования на среде DMEM (Усл.Ед.) n=900.

№ п/п	Пассаж культур	Дермальные фибробласты овец		Дермальные фибробласты крупного рогатого скота		Дермальные фибробласты свиней		
		Культуры отличного качества	Культуры хорошего качества	Культуры отличного качества	Культуры хорошего качества	Культуры отличного качества	Культуры хорошего качества	Культуры удовлетворительного качества
1	Первый пассаж	1,62±0,085	2,32±0,142	1,70±0,123	2,28±0,167	1,74±0,111	2,32±0,001	2,96±0,205
2	Второй пассаж	1,74±0,096	2,24±0,206	1,72±0,132	2,40±0,127	1,80±0,060	2,42±0,141	0
3	Третий пассаж	1,83±0,101	2,41±0,212	1,78±0,064	2,31±0,289	1,78±0,071	2,22±0,134	0



### 3. Заключение

Анализ зарубежных и отечественных научных источников свидетельствует о том, что для ветеринарной науки и практики актуальным является исследование в области клеточных технологий, а в частности изучение морфологии и функциональной активности аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных и разработка на их основе новых методов и способов терапии повреждений и заболеваний различной этиологии.

В связи с тем, что в доступной научно-технической литературе вопрос о морфологической и функциональной характеристике фибробластов содержит большое количество противоречивой информации, целью исследования являлось изучить морфофункциональные особенности культур клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных и провести оценку их жизнеспособности.

Были поставлены следующие задачи: получить культуры аутологичных дермальных фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней, соответствующие требованиям ОФС.1.7.2.0011.15, в необходимом для дальнейших экспериментов количестве; провести сравнительное исследование общего состояния монослоя (внешний вид и форма клеток, количество отростков, площадь монослоя); провести сравнительные морфометрические исследования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных; провести сравнительные исследования функциональной активности аутологичных дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных на основании скорости адгезии клеток, изменения оптической плотности ядра, количества синтезируемого проколлагена и жизнеспособности клеток по энтропийному эквиваленту.

Изучение морфологических свойств аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных стало возможным только при комплексном использовании теоретических и экспериментальных методов исследования.

Разработанные теоретические положения и пути их технологического решения были опробованы экспериментально. Экспериментальные исследования были методологически обеспечены и проводились на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», ФКП «Ставропольская биофабрика», ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора».

В результате экспериментальной части диссертационного исследования были внесены изменения в методику культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, которые заключались в:

- увеличен размер биоптата кожи до 5 мм<sup>3</sup>;
- введена двух кратная промывка биоптата кожи в растворах фосфатного буфера с антибиотиком;
- уменьшена концентрация раствора трипсина до 0,20% раствора;
- уменьшено время ферментативной дезагригации биоптатов кожи до 1 минуты
- использовалось двукратное инактивирование раствора трипсина раствором Версена;
- использовалось трехкратное центрифугирование образцов, что дало возможность получать более насыщенный клетками супернатант.

В ходе проведенных морфометрических исследований было установлено, что при культивировании аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных на среде DMEM *in vitro*, клетки веретеновидной формы, уплощены, распластаны по дну

культурального флакона. Аутологичные дермальные фибробласты сельскохозяйственных животных характеризуются следующими значениями размеров клеток: юные формы аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных грушевидной формы с небольшим количеством отростков со средними размерами 19 – 23 мкм, незрелые фибробласты – это клетки веретеновидной формы с 1 – 3 отростками размером 30 – 40 мкм, и зрелые активно функционирующие аутологичные дермальные фибробласты веретеновидной формы с 3 и более отростками и размер клеток составляет 45 – 50 мкм.

Полученные морфометрические значения аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных совпадают с данными, полученными А.А. Заварзиным, С.Н. Кузнецовым, М.Н. Ross и Wojciech Pawlina при культивировании дермальных фибробластов человека, но в то же время противоречат данным, описанными Ricardo Cornejo Uribe и Fernando Matamala Vargas.

В то же время впервые в ветеринарной практике были получены следующие морфометрические показатели аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, культивируемых *in vitro*: оптическая плотность ядер клеток, ядерно-цитоплазматическое отношение и провели их сравнительную оценку.

У аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота, овец и свиней выявлено постепенное снижение пролиферативной активности клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в культурах с 3 и в последующих пассажах, что свидетельствует о достижении клетками состояния зрелости, о чем свидетельствует увеличение концентрации проколлагена, что подтверждается данными масс-спектрометрического исследования.

Методом математического прогнозирования на основании расчетов энтропийного эквивалента, установлена высокая жизнеспособность

культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных без использования дорогостоящих и трудоемких иммуногистохимических методов.

Проведенные исследования расширяют данные о морфологии фибробластов крупного рогатого скота, овец, свиней, выявляют закономерности динамической вариативности клеток в процессе культивирования, позволяют в короткий срок делать заключения об их функциональной и пролиферативной активности. Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы и представить рекомендации по их практическому использованию.

### Выводы

1. Двукратное промывание биоптатов кожи в растворах фосфатного буфера с добавлением антибиотиков, уменьшение концентрации трипсина в растворе до 0,25%, двукратная инактивация трипсина раствором Версена позволяют получать культуры клеток аутологичных дермальных фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней, соответствующие основным требованиям ОФС.1.7.2.0011.15.
2. Внесенные изменения в методику культивирования аутологичных дермальных фибробластов не повлияли на их морфологические и функциональные свойства и позволили добиться в культурах площади монослоя 88,7%.
3. Выявлена динамика изменения морфометрических показателей аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования, составляющая после первого пассажа для показателя длины в среднем 34,8%; ширины 48,3%, площади 76,6%; после второго пассажа для показателя длины в среднем составляла 14,4%, ширины 33,7%, площади 73,3%; после третьего пассажа средняя динамика изменения длины составляла 7,7%, ширины 17,3%, площади 43,5%.
4. Установлено наличие подобности фибробластов крупного рогатого скота, овец и свиней по размерам и формам клеток, количеству отростков, размерам ядер.
5. Установлено, что юные аутологичные дермальные фибробласты сельскохозяйственных животных – грушевидной формы, с 1–2 отростками, со средними размерами 19 – 23 мкм; незрелые фибробласты – веретеновидной формы, с 2 – 3 отростками, размером 30 – 40 мкм; зрелые, активно функционирующие аутологичные дермальные фибробласты – веретеновидной формы с 3 и более отростками, размер клеток составляет 45 – 50 мкм.

6. Выявлена максимальная скорость адгезии клеток, составляющая для фибробластов овец 86,2%, для фибробластов крупного рогатого скота 85,9% и для фибробластов свиней 85,3% на временном промежутке 60 минут.
7. Установлено, что наибольшей функциональной активностью обладают аутологичные дермальные фибробласты свиней с 3 пассажа, овец с 4, а крупного рогатого скота с 5 пассажа, о чем свидетельствует концентрация проколлагена свыше 70%.
8. Установлено, что внесенные изменения в методику культивирования дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных позволяют получать культуры отличного качества со значениями энтропийного эквивалента 1,6 – 1,8 усл.ед и хорошего качества со значениями энтропийного эквивалента 2,2 – 2,4 усл. ед., что также подтверждается экспертной оценкой по методу Шигана.

### **Практические предложения**

1. Положительные результаты, полученные при испытании разработанной методики культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, позволяют рекомендовать её к широкому использованию на биофабриках, при использовании заместительной клеточной терапии в ветеринарной хирургической практике.

2. Полученные данные могут использоваться при составлении учебных и справочных пособий, проведении научных исследований, чтении лекций и проведению практических занятий по морфологии, цитологии и гистологии, биологии развития в учебных заведениях биологического профиля.

### **Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы**

Проведенные исследования позволили более глубоко понять морфофункциональные особенности аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Это создает предпосылки к разработке новых подходов в лечении животных с использованием клеточных технологий, а в частности разработка кожных эквивалентов для животных.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аксенова, Н.Н. Роль адипокинов и провоспалительных цитокинов в регуляции метаболических и иммунопатологических процессов при коррекции ожирения : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Аксенова Наталия Николаевна. – Калининград, 2014. – 24 с.
2. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Роберте, Д. Уотсон ; под ред. Г.П. Георгиева, Ю.С. Ченцова. – М : Мир 2, 1994. – 539 с.
3. Алексеев, А.А. Современные методы трансплантации культивированных клеток кожи и ее эквивалентов при лечении ожогов / А.А. Алексеев, С.В. Попов // Комбустиология. – 1999. – №1 – С.1-12.
4. Алексеева, Н.Т. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран / Н.Т. Алексеева, А.А. Глухов, А.П. Остроушко // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Т. V, № 3. – С. 601-608.
5. Андреев, С.М. Коллаген: структура и функции (Часть 2) / С.М. Андреев // Косметика и медицина. – 2001. – Т.4, № 23. – С.14-23.
6. Андреев, С.М. Коллаген: структура и функции / С.М. Андреев // Косметика и медицина. – 2001 –Т.3, № 22. – С. 41-46.
7. Анциферова, М.А. Местные и системные эффекты интерлейкина 8 / М.А. Анциферова, Г.А. Казаков, Г.А. Александров // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 65.
8. Арсений, И.А. и др. Сравнительная характеристика методов выделения эпидермоцитов из кожи человека / И.А. Арсений, Е.В. Маркелов, Т. А. Назаренко и др. // Актуальные вопросы теоретической и практической медицины. – Харьков, 1976. – С. 7.
9. Арэ, А.Ф. Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного



матрикса / А.Ф. Арэ, Т.В. Поспелова, Г.П. Пинаев // Цитология. – Т. 41 № 8. – 1999. – С. 707–715.

10. Байрейтер К. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации / К. Байрейтер, П. Франц, Х. Родеман // Онтогенез. — 1995. — Т. 26, № 1. — С. 22–37.

11. Сравнительное исследование влияния фибробластов кожи и стромальных клеток костного мозга, заключенных в коллагеновый гель, на регенерацию десны / А.А. Бармашева, Н.С. Николаенко, И.А. Самусенко, Л.Ю. Орехова, Г.П. Пинаев // Пародонтология. – 2012. – Т. 17, № 4 (65). – С. 20 – 25.

12. Беляев, В.А. Исследование возможности ведения фибробластов в перевиваемых культурах/ В.А. Беляев, Я.И. Переверзева, Н.В. Федота, В.М. Левченко, А.В. Метляева, А.И. Сидельников // Вестник АПК Ставрополя. – 2015. – №1 (17). – С. 80-84.

13. Восполнение голосовых связок культивированными фибробластами / Г.С. Берк, Дж.Х. Блюмин, Дж.Л. Себастиан, Г.С. Келлер, Е.С. Ревазова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 8 – С. 207-210.

14. Бобро, Л.И. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях / Л.И. Бобро // Арх. патологии. – 1990. – Т. 52, № 12. – С. 65-68.

15. Бозо, И.Я. «Фибробласт» - специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимального происхождения / И.Я. Бозо, Р.В. Деев, Г.В. Пинаев // Цитология. –2010. – Том 52, №2. – С.99 – 109.

16. Бурда, Ю.Е. Эффективность местного лечения неспецифического язвенного колита фармакологически модифицированными эмбриональными фибробластами / Ю.Е. Бурда, С.Н. Нестеренко, А.С. Калабухов // Медицинская иммунология. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 214-215.

17. Бурда, Ю.Е. Влияние, супернатанта аллогенных эмбриональных фибробластов на функциональную активность нейтрофилов *in vitro* / Ю.Е. Бурда, С.Н. Нестеренко, С.М. Шевченко // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4, № 1. – с. 118-119.
18. Бурда, Ю.Е. Сравнительный анализ эффективности применения аллогенных эмбриональных фибробластов и их супернатанта при пограничных ожогах / Ю.Е. Бурда, Д.В. Ершов, В.А. Лазаренко // Современные проблемы науки и образования. – 2005. – № 2. – С. 56.
19. Вахтин, Ю.Б. Методы культивирования клеток // Ю.Б. Вахтин, А.А. Соминина // Методы культивирования клеток. – Л.:Наука. – 1988. – С. 313.
20. Изменения пролиферации дермальных фибробластов при старении кожи / Т.Ю. Витрук, П.Н. Пестерев, Н.В. Рязанцева, Т.Л. Мирютова, А.Ю. Беляева // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 12. – С. 69.
21. Вялов, С.Л. Современные представления о регуляции процесса заживления ран (обзор литературы) / С.Л. Вялов, К.П. Пшениснов, П. Куиндоз и др. // Анналы пласт., реконстр., эстет, хирург. – 1999. – № 1. – С.49– 56.
22. Дермальные фибробласты и старение кожи человека / Т.Ю Витрук, Т.Л. Мирютова, Н.В. Рязанцева, П.Н. Пестерев, А.Ю. Беляева // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 10. – С. 40–41.
23. Герасимов И. Г. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов / И. Г. Герасимов, А. Г. Попандопуло // Цитология. – Т. 49, №3. – 2007. – С. 204-209.
24. Глущенко, Е. В. Динамика синтеза фибронектина фибробластами человека в культуре / Е. В. Глущенко [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – № 5. – С. 575–577.

25. Грудянов, А.И. Хирургические методы лечения заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, А.И. Ерохин. – М: ООО "Медицинские информационное агентство", 2006. – 128 с.
26. Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов в коже человека / А.Г. Гунин, Н.К. Корнилова, В.В. Петров, О.В. Васильева // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 43– 47.
27. Технология получения и культивирования аллогенных и аутологичных фибробластов человека для заместительной клеточной терапии / Г.А. Данлыбаева, Р.А. Аманжолов, В.Т. Кумашева, В.Б. Огай, К.Н. Мукантаев // Биотехнология. Теория и практика. – 2011. – № 2. – С. 77– 82.
28. Морфо-функциональные характеристики новых штаммов диплоидных эмбриональных фибробластов для клеточной терапии / Г.А. Данлыбаева, В.Т. Кумашева, А.М. Мынбай, А.Н. Исакова, В.Б. [ и др.] // Science and world. – 2014. – № 2 (6), Vol. I. – С. 106-111.
29. Есаулова, И.Н. Исследование супернатанта, полученного при добавлении пептидов из тканей печени и сердца баран к культуре фибробластов / И.Н. Есаулова // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2009. – Т. 90, № 7. – С. 118 – 120.
30. Зайцева, Ю.Н. Возрастная динамика функциональной активности фибробластов кожи / Ю.Н. Зайцева, Е.В. Хлюпина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4 (41). – С. 37-38.
31. Золотовицкая, Н.Н. Экспериментально-клиническая оценка эффективности применения культуры фибробластов / Колсанов А.В., Иванова В.Д., Волова Л.Т., Дорожкина Е.Б. // Клиническая анатомия и экспериментальная хирургия: Ежегодник Российской ассоциации клинических анатомов в составе ВНОАГЭ. Приложение к журналу «Морфологические ведомости». – 2006. – № 6. – Р. 68—73.

32. Зорина, А.И. Фибробласты дермы: Особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения / Зорина А.И., Бозо И.Я., Зорин В.Л. [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т.6, №2. – С. 15–26.
33. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи / В.Л. Зорин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т.4, № 4. – С. 26– 40.
34. Зорин, В.Л. Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины/ В.Л. Зорин, А.И. Зорина, В.Р. Черкасов // Клет. трансплантол. и тканевая инженерия. — 2009. – Т. 4, №3. – С. 68–78.
35. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека / В.Л. Зорин [и др.] // Гены & Клетки. – Том 9, №2. – 2014. – с. 53-60.
36. Зыкова, Е.В. Оптимизация протокола выделения первичных фибробластов из различных тканей крыс / Е.В. Зыкова, Е.Г. Зайцев, В.Н. Перфилова // Наука в современном мире: приоритеты развития. – 2015. – № 1. – С. 3-5.
37. Применение аллогенных эмбриональных фибробластов при эндопротезировании передней брюшной стенки / С.В. Иванов, А.А. Должиков, И.С. Иванов, А.А. Мартынец // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – Т. 16, № 11. – С. 78-84.
38. Игнатъева, Н. Коллаген — основной белок соединительной ткани/ Н. Игнатъева // Эстетич. мед. – 2005. – Т. 4, №3. – С. 243-256.
39. Пат. 2017818 Российская Федерация, МПК С12N5/02, С12N5/00. Способ анализа популяции фибробластов человека / Квитко О.В., Николаевич Л.Н. ; заявитель и патентообладатель Институт радиобиологии АН Беларуси. – № 4904835/13 ; заявл. 21.09.1990 ; опубл. 15.08.1994.

40. Келлер, Г. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов/ Г. Келлер, Дж. Себастиан, Ю. Лакомбе и др.//Бюлл. эксп. биол. мед. – 2000. – Т. 130, №8. – С. 203–206.
41. Колокольцова, Т.Д. Создание аттестованных коллекций и банков культур клеток для научных исследований, производства препаратов, диагностики и лечения : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Колокольцова Тамара Дмитриевна. – 2008. – 46 с.
42. Косов, И.С. Изучение влияния фактора роста фибробластов на заживление кожных ран (экспериментальное исследование): автореф. дис. канд. мед. наук / Косов Игорь Семёнович. – Москва, 1994. – 16 с.
43. Кузнецов, С.Л. Гистология, цитология и эмбриология: учеб. для медицинских вузов / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров – М.: ООО «Медицинское информационное агентство». – 2007. – 600 с.
44. Культивирование клеток [Электронный ресурс] : [Библиогр. база данных] // BioFile: научно-информационный журнал : [Официальный сайт]. 2014. – Режим доступа: [http:// biofile.ru/bio/19077.html](http://biofile.ru/bio/19077.html) biofile.ru/bio/16201.html (дата обращения: 15.08.2016)
45. Куркин, А.В. Оценка структурно функционального состояния ядер гепатоцитов при различной мощности СВЧ – облучения [Электронный ресурс] / А.В. Куркин, Д.Х. Рыбалкина, К.К. Кайырбекова, Ж.А. Даулеткалиева. –Карагандинский государственный медицинский университет : Наука и здравоохранение. – 2014. – URL : <http://journal.ssmu.kz/index.php?statja=782&lang=ru>.
46. Крехели, Э.А. Применение аутогенных фибробластов в косметологии. / Э.А. Крехели, А.А. Згурский, С.М. Терехов // Эстетическая медицина. –2004. Т.3, № 4. – С.336–342.
47. Опыт культивирования фибробластов овцы / А.Ю. Криворучко, В.А. Беляев, И.И. Некрасова, Н.В. Федота //Вестник АПК Ставрополя. – 2013. – № 3 (11). – С. 139–141.

48. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологического исследований / А.С. Лабинская. Москва : «Медицина». – 1978. – 394 с.
49. Лактионова, А.А. Синцитиальная цитоплазматическая связь и слияние нейронов некоторых беспозвоночных : автореф. дис. ... канд.биол. наук / Лактионова Александра Александровна. – Санкт-Петербург, 2011. – 22 с.
50. Левченко, В.М. Разработка современной методики культивирования аутологичных дермальных фибробластов / В.М. Левченко, Н.А. Гвоздецкий // Известия Оренбургского государственного аграрного университета 2016. – №2 (58). – С. 88–90.
51. Левченко, В.М. Морфологическая характеристика аутологичных дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных / В.М. Левченко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2016. – №07(121). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2016/07/pdf/55.pdf>, 0,750 у.п.л. – IDA [article ID]: 1211607055. <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-121-055>.
52. Левченко, В.М. Разработка современной методики культивирования фибробластов для генной инженерии / В.М. Левченко, В.Н. Ключникова // Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса: сб. науч. тр. по материалам Междунар. научн. -практ. конф. (г. Ставрополь, 18-19 сентября 2015г.) / ВНИИОК. – Ставрополь. – 2015. – С. 450 – 453.
53. Левченко, В.М. Морфологическая характеристика аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM по усовершенствованной методике / В.М. Левченко // Вестник Курганской ГСХА. – 2016. – №3 (19). – С.37-39.

54. Лига, А.Б. Фармако-биохимический анализ влияния некоторых производных стероидных гормонов на фибробласты кожи в норме и при псориазе : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Лига Ариуна Болдбатовна. Москва, 2009. – 26 с.
55. Любченко, Е. Н. Морфофункциональная оценка заживления ран у животных при применении "БиоэффектДВ-1": дис. ... канд. ветер. наук. : 16.00.02 : защищена 10.11.2004 / Любченко, Елена Николаевна. – Благовещенск–Уссурийск, 2003. – 145 с.
56. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г / Г.И. Лямкин, Д.Г. Пономаренко, А.А. Худолеев, Д.В. Русанова, С.В. Вилинская, А.Н. Куличенко / Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 11-13.
57. Максимов, А.А. Основы гистологии. Часть 2 / А.А. Максимов // Петроградъ.: Пг.: К. Л. Риккер. — 1914 – 1915. – С. 180– 181.
58. Маркелова, П. П. Структурная, морфометрическая и иммуногистохимическая характеристика кожного регенерата и иммунокомпетентных органов на фоне локального воздействия температурного фактора : автореф. ...дис. канд. биол. наук / Маркелова Полина Павловна. – Оренбург, 2014. – 24 с.
59. Использование аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи / О.Г. Макеев, А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, Е.Г. Малишевская // Вестник эстетич. медицины. — 2008. — Т. 7, № 2. — С. 72–78.
60. Применение аутологичных дермальных фибробластов, обогащенных мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, для лечения нейротрофических язв конечностей у больных сахарным диабетом II типа / Макеев О.Г., Зверева А.Е., Васильева М.С. [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2010. – № 1 (28). – С. 49 – 52.

61. Отчет о трехлетних клинических испытаниях аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи / О.Г. Макеев, А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, Е.Г. Малишевская // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2008. – №4 (22). – С. 63-70.
62. Мельчиков, А.С. Морфология фибробластов кожи при действии рентгеновских лучей / А.С. Мельчиков, Н.М. Мельчикова // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – №2. – С. 69
63. Меркулова, Е.В. Создание модели определения жизнеспособности культивируемых фибробластов для автоматизированных систем / Е.В. Меркулова // Вестник херсонского национального технического университета. – 2006. – № 1 (19). – С. 250–255.
64. Михайлов, И.Н. Структура и функция эпидермиса / И.Н. Михайлов // Медицина. – 1979. – 240 с.
65. Озерская, О.С. Использование многослойной, культуры аутологичных кератиноцитов для косметической коррекции нормо- и гипотрофических рубцов кожи / О.С. Озерская // Журн. дерматовенерологии и косметологии. – 2001. №2. – С. 25-26.
66. Морфофункциональная характеристика фибробластов крыс после культивирования и аллотрансплантации в дерму / О.С. Озерская, Л.И. Хожай, А.О. Данилов // Морфология. – 2010. – Т. 138, № 5. – С. 52 – 54.
67. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий // Известия. – М, 2009. – С. 380.
68. Пат. 2165765 Российская Федерация, А61К35/14, А61F11/00. Способ устранения травматического дефекта барабанной перепонки / Пальчун В.Т., Туманов В.П., Миронов А.А., Поматиллов А.А.; заявитель и патентообладатель Российский государственный медицинский университет. – № 2000101983/14; заявл. 28.01.2000; опубл. 27.04.2001.



69. Пат. 2382077 Российская Федерация МПК C12N5/071. Среда культивирования мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани человека и способ культивирования этих клеток с ее использованием / Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Рубина К.А., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю. ; заявитель и патентообладатель ООО "Генная и клеточная терапия", Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. - № 2010116668/10 ; заявл. 29.04.2010 ; опубл. 20.05.2011., Бюл. № 14. – 21 с.
70. Пат 2320720 Российская Федерация МПК C12N5/08, A61L27/38. Способ культивирования фибробластов для заместительной терапии / Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Калинина Н.И., Рубина К.А., Друбич Т.Л., Балашова М.Б. ; заявитель и патентообладатель Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Калинина Н.И., Рубина К.А., Друбич Т.Л., Балашова М.Б. – № 2006102043/15 ; заявл. 25.01.2006 ; опубл. 27.03.2008, Бюл. № 9. – 13 с.
71. Петров, А.Н. Основные аспекты культивирования и трансплантации культур фибробластов человека [Электронный ресурс] / А.Н. Петров. – Новосибирск : Институт Новых Медицинских Технологий, 2007. – Режим доступа: <http://www.medlinks.ru/article.php?sid=29050> (Дата обращения: 30.06.16)
72. Исследование изменений экспрессии генов раннего ответа A431 при реорганизации цитоскелета / О.А. Петухова, Л.В. Туроверова, И.В. Кропачева, О.А. Черепанова, А. Емельянов, Г.П. Пинаев // Цитология. тез. докл. и сообщ. предст. на Всесоюз. симп. "Клеточная биология на пороге ХХ1 века". – Т. 43, № 4. – 2001. – С.377.
73. Питательные среды и условия культивирования в биотехнологии [Электронный ресурс] : [Библиогр. база данных] // BioFile: научно-

информационный журнал: [Офиц. сайт]. 2014. – Режим доступа: <http://biofile.ru/bio/16201.html> (дата обращения: 15.08.2016)

74. Фибробласты кожи человека : жизнеспособность и пролиферативная активность *in vitro* после гамма облучения/ А. В. Попов, М. Л. Лим, Е. А. Губарев, А. Х. Каде // Кубанский медицинский вестник. – 2014. – №5 (147). – С. 95 – 101.

75. Фибробласты кожи человека: жизнеспособность и пролиферативная активность *in vitro* после гамма-облучения / А.В. Попова, М.Л. Лим, Е.А. Губарева, А.Х. Каде // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – № 5 (147). – С. 95–101.

76. Прозоркина, Н. В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для средних специальных медицинских учебных заведений / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина.— Ростов на Дону: Феникс, 2002. – 416 с.

77. Прощенко, Д.А. Влияние наночастиц меди на культуру фибробластов человека / Д.А. Прощенко // Интеллектуальный потенциал XXI века: ступени познания. – 2016. – № 32. – С. 35-40.

78. Аутофибробласты: эстетические перспективы / Рубина К. [и др.] // Kosmetik international. – 2008. – № 1. – С. 73-75.

79. Иммуноцитохимическая характеристика клеток, используемых для аутотрансплантации / К.А. Рубина, Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, Е.В. Парфенова // V Международный симпозиум по эстетической медицине (Москва, 16-18 февр. 2006 г.): тез. докл. – М. – 2006. – С. 31.

80. Рунова, Г. С. Использование культивированных аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта (клинико-экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Рунова, Галина Сергеевна. – Москва, 2000. – 18 с.

81. Большая медицинская энциклопедия : В 35-ти т. / Глав. ред. ... Н. А. Семашко. Т. 15: Крупа-Лексер // М.: Сов. энцикл., – 1930. – 808 с.

82. Серов, В.В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология / В.В Серов., А.Б. Шехлер // Медицина. – М,1981. – С.312.
83. Перспективы применения культур фибробластов и кератиноцитов человека в дерматологии/ Ю.К. Скрипкин, А.А. Кубанова, В.А. Самсонов [и др.] // Вестник дерматологии и венерологии. – 1994. – №6. – С. 4–6.
84. Аутологичные культивируемые фибробласты дермы: перспективы применения в медицине / Сысоева В.Ю. [и др.]// Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения: материалы Всерос. школа-конф. (Москва, 9-11 июня 2008 г) / ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2008.
85. Тафришьян, Н.Р. Применение культивированных кератиноцитов и фибробластов для восстановления кожного покрова после лазерной дермабразии : автореф. канд. мед. наук / Тафришьян, Неля Рамисовна. – Санкт-Петербург, 2007. – 17 с.
86. Терехов, С.М. Усовершенствованный метод клонирования диплоидных фибробластов человека / Терехов С.М. // Цитология. – 1981. – Т. 23, №6. – С. 717–718.
87. Саркисов, Д.С. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожных покровов / Д.С. Саркисов, А.А. Алексеев, Е.В. Глущенко // Вест. Рос. акад. мед. наук. – 1996. – №6. – С. 6–11.
88. Сергиенко, Н.Ф. Лечение мочевого свища с применением культуры роста аллогенных фибробластов / Н.Ф. Сергиенко, А.С. Девятков, Л.В. Шаплыгин // Урология. Нефрология. – 1999. – № 1. – С. 44-46. Степанова, Г. Получение и характеристика нового штамма диплоидных клеток из фетальной ткани легкого человека / Г.Степанова, С.Б.Алексеев, А.А. Згурский, Г.А.Ломанова, Н.В.Шалунова.// Цитология. – 1986. – Т.28, №12. – С.1373–1376.

89. Использование аллофибробластов, культивированных *in vitro*, для: лечения ран / И.О. Слипченко, А.Г. Попандопуло, Д.А. Зубов, О.М. Корчак // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 10. – С. 941.
90. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов / С.В. Смирнов, И.В. Киселев, А.В. Васильев, В.В. Терских // Хирургия. – 2003. – Т. 12, №2. – С. 58–62.
91. Смирнова, Н.В. Клеточные маркеры старения при прогериях: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Смирнова Наталья Владимировна. – Санкт-Петербург, 2008. – 33 с.
92. Смирнова, О. Базовые методы [Электронный ресурс] / О. Смирнова, А. Солдатов, В. Шаров. – Москва : Лаборатория молекулярной генетики внутриклеточного транспорта, Институт биологии гена, 2013. – Режим доступа: [http://www.molbiol.ru/protocol/19\\_01.html](http://www.molbiol.ru/protocol/19_01.html)
93. Ставицкая, Г.В. Роль исходного функционального состояния фибробластов склеры в механизме ответной реакции на активационное воздействие / Г.В. Ставицкая // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2010. – № 3. – С. 17-21.
94. Туманов, В. П. Применение культуры аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта / В. П. Туманов, Л. А. Дмитриева, Г. С. Рунова [и др.] // Наука – практике : материалы научной сессии ЦНИИС, посвящённой 35-летию института. – Москва, 1998. – С. 164–167.
95. Клеточные технологии в клиническую практику / В.П. Туманов, Т.Д. Каракотова, Н.Л. Стародубцева, Д.И. Пономарева, Г.С. Рунова // Новости клинич. цитологии России.— 2008. — № 3–4.
96. Использование культивированных фибробластов при лечении ожоговых ран / В.П. Туманов, Е.В. Глущенко, С.С. Морозов, Д.С. Саркисов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1990. – Т. 120, №4. – С. 400–402.

97. Туманов, В.П. Морфологический анализ клеточного состава ожоговой раны при трансплантации культивированных аллофибробластов / В.П. Туманов // Онтогенез. – 1998. – Т. 29, № 6. – С. 478.
98. Туманов, В.П. Лечение ожоговых ран при использовании культивированных клеток кожи человека / В.П. Туманов, Л.И. Будкевич // Педиатрия. – 1999. – №4. – С. 53–59.
99. Метод анализа белков внеклеточного матрикса, синтезируемого клетками в культуре / Л. В. Туроверова [и др. ] // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 8. – С. 691–696.
100. Хэм, А. Гистология / А. Хэм, Д. Кормак ; пер. с англ. Ю.И. Афанасьева, Ю.С. Ченцова. – Москва : Мир, 1983. – 244 с.
101. Хрупкин, В.И. Использование фибробластов для лечения гранулирующих ран / В.И. Хрупкин, А.В. Низовой, С.В. Леонов, А.П. Заиконникова, А.В. Васильев, Терских В.В.// Военно-медицинский журнал. – 1998. – №1. – С.38–42.
102. Хрущев, Н.Г. Гистогенез соединительной ткани; экспериментальные исследования происхождения фибробластов / Н.Г. Хрущев // Наука. – М, 1976. – С.118.
103. Черкес, Ф. К. Микробиология / Ф. К. Черкес.— М.: Медицина, 1987. –С. 95-105.
104. Щеголев, В.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения аллогенных фибробластов для лечения рубцов и атрофий кожи : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Щеголев Виталий Владимирович. – Санкт-Петербург, 2009. – 17 с.
105. Юдинцева, Н.С. Трансплантация аллогенных пластов кератиноцитов на ожоговые раны / Н.С. Юдинцева, Ю.В. Горелик, И.А. Дьяконов // Цитология. – 1999. – № 3-4. – С. 328–329.

106. Юдинцева, Н.С. Культивирование клеток человека на полимерной пленке с целью трансплантации на ожоговые раны / Н.С. Юдинцева, Ю.В. Горелик, И.А. Дьяконов // Цитология. – 1999. – № 3-4. – С. 329–330.
107. Юдинцева, Н.М. Различия в морфологии и функциональной активности дермальных фибробластов в зависимости от их происхождения и особенностей культивирования : автореф. дис. ... к-та биол.наук / Юдинцева Наталия Михайловна. –Санкт–Петербург, 2010. – 25 с.
108. Восстановление соединительной ткани в результате трансплантации на раны экспериментальных животных дермального эквивалента на основе фибрина / Н.М. Юдинцева [и др.] // Цитология. – 2010. – Т.9, № 52. – С. 724–728.
109. Юрина, Н.А. Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани: монография / Н.А. Юрина, И.А. Радостина. – Издательство УДН, 1990. – С.322.
110. Клеточные технологии в реабилитации кожи лица / К.Н. Ярыгин, В.А. Ступин, В.В. Бурунова, Г.В. Ставицкая, Н.Е. Мантурова, Т.О. Смирнова // Русский медицин. журнал. — 2009. — Т.17. — Р.1058–1063.
111. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites / R. Abe, S.C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala, C.N. Metz // J. Immunol. – 2001. – №166. – P. 7556–7562.
112. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: Implications for fibrosis and scleroderma / D.J. Abraham, B. Eckes, V. Rajkumar, T. Krieg // Current Rheumatology Reports. – 2007. – №9(2). – P. 136–143.
113. Alvarez, O.M. The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and re-epithelization in superficial wounds / O.M. Alvarez, P.M. Mertz, W.H. Eagleton // J. Surg. Res. – 1993. – Vol. 35, № 2. – P. 142-148.
114. Immunohistochemical localization of collagen types I and VI in human skin wounds / P. Betz, A. Nerlich, J. Wilske, J. Tubel, R. Penning, W. Eisenmenger // Int. J. Leg. Med. – 1993. – № 106 (1). – P. 31–34.

115. Apesos, J. Autologen / J. Apesos, M. G. Muntzing // Clin. Plast.Surg. — 2000. — Vol. 27, №4. — P. 507-513.
116. Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor / C. Ballaun, W. Weninger, A. Uthman, H. Weich, E. Tschachler // J. Invest. Dermatol. — 1995. — Vol. 104, №7. — P. 7–10.
117. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. / T.A. Beyer, S. Werner, C. Dickson, R. Grose // Exp. Cell Res. — 2003. — Vol. 287, № 2. — P. 228–236.
118. Beyth, S. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness / S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Asian, E. Galun, J. Rachmilewitz // Blood. — 2005, Mar 1. — № 105(5). — P. 2214–2219.
119. Briefing Document. Advisory Committee Materials: Available for Public Release. Isolagen Therapy TM. - Autologous Cell Therapy. — 2009.
120. Boss, W.K. Autologous cultured fibroblast: protein repair system / W.K. Boss, Usal Hakan, P.B. Fedor, G. Chemojf // Ann. Plast. Surg. — 2000. — Vol. 44. — P. 536–542.
121. Brown, J.A. Ageing and the role of the fibroblast during the proliferative phase of healing / J.A. Brown // J.Wound Care. — 2004. — Vol.13. — P. 35–40.
122. Bruder, S.P. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells /S.P. Bruder, A.A. Kurth, M. Shea et al. //J Orthop Res. — 1998. — V. 16, № 2. — P. 155–162.
123. In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation / M. Cario-Andre, C. Pain, Y. Gauthier, V. Casoli, A. Taieb // Pigment. Cell Res. — 2006. — № 19. — P. 434–442.
124. Immunohistochemical localization of type V collagen in normal human skin / M. Chanoki, M. Ishii, K. Fukai, H. Kobayashi, T. Hamada, Y. Muragaki, A. Ooshima // Arch. Dermatol. Res. —1988. — № 280 (3). — P. 145–151.

125. Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis / F. Chen, W. Zhang, D. Bi, W. Liu, X. Wei, L. Zhu, L. Cui, Y. Cao // *J. Cell Sci.* — 2007. — № 120. — P. 2875–2883.
126. Chodorowska, G. Basic-fibroblast growth factor (b-FGF)--its biological role in physiologic and pathologic conditions / G. Chodorowska, M. Tomczyk, A. Glowacka // *Ann Univ. Mariae Curie Sklodowska.* – 2004. – Vol. 59, № 1. – P. 286–291.
127. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta / R.A.F. Clark, L.D. Nielsen, M.P. Welch, J.M. McPherson // *J. Cell Sci.* – 1995. – № 108(3). – P. 1251–1261.
128. Covas D. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular / Covas D., Panepuccia R., Fontes A., et al// *Exp Hematol.* – 2008. № 36(5). –.642–654.
129. Dezawa, M. Future views and challenges to the peripheral nerve regeneration by cell based therapy / M. Dezawa // *Rinsho Shinkeigaku.* – 2005. – Vol. 45 (11). – P. 877-879.
130. Fisher, G. Looking older: Fibroblast collapse and therapeutic implications / G. Fisher, J. Varani, J. Voorhees // *Arch. Dermatol.* — 2008. — Vol.144, № 5. — P. 666–672.
131. Fisher, G. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin / G. Fisher, J. Voorhees // *FASEB J.* — 1996. — № 10. — P. 1002–1013.
132. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissue / Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. // *Transplantation.* – 1968. – № 6. – P. 230–247.
133. Froget, S. Wound healing mediator production by human dermal fibroblasts grown within a collagen-GAG matrix for skin repair in humans / S. Froget, E. Barthelemy, F. Guillot, C. Soler // *Eur. Cytokine Netw.* – 2003. – Vol. 14, №1. – P. 60–64.



134. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // *Exp Cell Res.* – 1961. – № 25. – 585-621.
135. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis / C.M. Hogaboam, M.L. Steinhauser, S.W. Chensue, S.L. Kunkel // *Kidney Int.* – 1998. – № 54(6). – P. 2152–2159.
136. Autologous keratinocytes cultured on benzylester hyaluronic acid membranes in the treatment of chronic full-thickness ulcers / D. Hollander, M. Stein, A. Bernd, J. Windolf, A. Pannike // *J. Wound Care.* – 1999. – Vol. 8, № 7. – P. 351-355.
137. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1 / A. Horstmeyer, C. Licht, G. Scherr, B. Eckes, T. Krieg // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272, № 24. – P. 6297–6309.
138. Jain, R. Molecular regulation of vessel maturation // *Nat. Med.* — 2003. — № 9. — P. 685–693.
139. Kopp, J. Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF / J. Kopp, G.Y. Wang, P. Kulmburg // *Mol Ther.* – 2004. – Vol. 10, № 1. – P. 86–96.
140. Kalluri, R. Fibroblasts in cancer / R. Kalluri, M. Zeisberg // *Nature Publishing Group.* – № 006,6. – P. 392–401.
141. Kassem, M. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential use in Therapy / M. Kassem, M. Kristiansen, B.M. Abdallah // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – Vol.95, 5. – P. 209–914.
142. Kassem, M. Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications / M. Kassem // *Cloning Stem Cells.* – 2004. – Vol. 6, № 4. – P.369–374.
143. Kim, B. C. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-beta signaling and decreased TGF-beta Type II receptor expression / B.C. Kim, H.T. Kim, S.H. Park et al. // *J. Cell Physiol.* – 2003. – № 195(3). – P.331–336.

144. Kopp, J. Accelerated wound healing by in vivo application of . keratinocytes overexpressing KGF. / J. Kopp, G.Y. Wang, P. Kulmburg // *Mol Ther.* – 2004. – Vol. 10, № 1. – P. 86–96.
145. Korn, J.H. Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblast / J.H. Korn // *Cell Immunol.* – 1981. – №63(2). – 374–384.
146. Manuskiatti, W. Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging / W. Manuskiatti, H.I. Maibach // *Int. J. Dermatol.* – 1996. – Vol. 35, № 8. – P. 539–544.
147. Use cultured autologous fibroblasts for facial rejuvenation / H. Mentz, A. Ruiz, C. Patronella, G. Newall, G. Mentz, V. Clift // *Annual Meeting, American Society of Plastic Surgeons, Philadelphia, Pennsylvania.* – October 12, 2004.
148. Miyahara, Y. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, et al. // *Nat Med.* – 2006. – № 12(4). – P. 459–465.
149. Morimoto, N. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation / N. Morimoto, Y. Saso, K. Tomihata et al. // *J. Surg. Res.* – 2005. – Vol. 125, №1. – P. 56 –67.
150. Angiogene Faktoren in der Fibroblastenzellkultur des Gehörgangcholesteatoms / R. Naim, H. Sadick, C. Bayerl, G. Bran, K. Hörmann // *HNO.* – 2005. – № 53. – P. 952–956.
151. The role of allogenic fibroblasts in an acute wound healing model / R.D. Price, V. Das-Gupta, P.A. Harris, I.M. Leigh, H.A. Navsaria // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2004. – Vol. 113, № 6. – P. 1719–1729.
152. Parsonage, G. A stromal address code defined by fibroblasts / G. Parsonage, A.D. Filer, O. Haworth et al. // *Trends Immunol.* – 2005. – Vol. 26. – P. 150–156.

153. Quirici, N. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies / N. Quirici, D. Soligo, P. Bossolasco et al. // *Exp. Hematol.* – 2002. – Vol. 30, N 7. – P. 783-791.
154. FGF-2, IL-1beta and TGF-beta regulate fibroblast expression of S100A8 / F. Rahimi, K. Hsu, Y. Endoh, C.L. Geczy // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272, № 11. – P. 2811–2827.
155. Ross, R. The fibroblast and wound repair/ R. Ross // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 1968. – № 43. – P. 51—96.
156. Roux, W. Gesammelte Abhandlungen über die Entwicklungsmechanik der Organismen / W. Roux. – Leipzig: Engelmann. – Bd.2. – P. 1850 – 1924.
157. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes / P, Shephard, B, Hinz, S, Smola-Hess, J,J, Meister, T, Krieg // *Thromb, Haemost.* – 2004. – Vol. 92, № 2. – P, 262–274.
158. Schmeller, W. Autologous fat grafting / W. Schmeller, I. Meier-Vollrath // *Hautarzt.* – 2003. – Vol. 54, №12. – P. 1185 – 1189.
159. Sorrel, J. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis / J. Sorrel, M. Baber, A. Caplan // *Cell Tissue Res.* — 2003. — № 327. — P. 499–510.
160. Sorrell, M. Fibroblasts — a diverse population at the center of it all/ M. Sorrell, A.I. Caplan // *International Review of Cell and Molecular biology.* — 2009. — Vol. 276. — P. 161–214.
161. Supp, D. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice / D. Supp, K. Wilson-Landy, S. Boyce // *FASEB J.* — 2002. — №16. — P. 797–804.
162. Strutz, F. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1 / F. Strutz, H. Okada, C. Lo, et al. // *J Cell Biol.* – 1995. – № 130. – 393–405.
163. Tang, J. Pig-h<sub>3</sub> is involved in HAb18G/CD147 mediated metastasis process in human hepatoma cells / J. Tang, H.W. Zhou, J.L. Jiang, X.M. Yang,

- Y. Li, H.X. Zhang, Z.N. Chen, W.P. Guo // *Exp. Biol. Med.* – 2007. – № 232(3). – P. 344–352.
164. Tang, J.  $\beta$ 1g-h<sub>3</sub> Interacts with  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Integrin to Promote Adhesion and Migration of Human Hepatoma Cells / J. Tang, Y.M. Wu, P. Zhao, J.L. Jiang, Z.N. Chen // *Exp. Biol. Med.* – 2009. – № 234(1). – P. 35–39.
165. Decreased collagen production in chronologically aged skin / J. Varani, M. Dame, L. Rittie, S. Fligiel, S. Kang, G. Fisher, J. Voorhees // *Am. J. Pathol.* — 2006. — № 168. — P. 1861–1868.
166. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin / J. Varani, R.L. Warner, M. Gharaee-Kermani, S.H. Phan, S. Kang, J.H. Chung, Z.Q. Wang, S.C. Datta, G.J. Fisher, J.J. Voorhees // *J. Invest. Dermatol.* — 2000. — № 114. — P. 480–486.
167. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products / N. Verzijl, J. DeGroot, S.R. Thorpe, R.A. Bank, J.N. Shaw, T.J. Lyons, J.W. Bijlsma, F.P. Lafeber, J.W. Baynes, J.M. TeKoppele // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275, № 50. — P. 39027–39031.
168. Watson, D. Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions. A Pilot Study / Watson D1, Keller GS, Lacombe V, et al. // *Arch Facial Plast Surg.* – 1999. – Vol. 1. – P. 165-170.
169. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial / R.A. Weiss, M.A. Weiss, K.L. Beasley, G. Munavalli // *Dermatol. Surg.* — 2007, Mar. — Vol. 33, № 3. — P. 263–268.
170. Wisser, D. Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma / D. Wisser, J. Steffes // *Burns.* – 2003. – Vol. 29, № 4. – P. 375–380.