

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПОД  
ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Магистерская диссертация  
обучающейся по направлению подготовки 06.04.01 Биология  
очной формы обучения, группы 11001741  
Рыжковой Марины Николаевны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент кафедры биологии  
Зубарева Е. В.

Рецензент  
Генеральный директор  
фармацевтической компании  
ООО «НовиСтем»  
Лаврик А. А.

БЕЛГОРОД 2019

## Содержание

Введение.....	4
1. Обзор литературы по теме исследования .....	4
1.1. Клеточная терапия в регенеративной медицине.....	7
1.2. Способы регенерации нервной ткани .....	12
1.3. Биофармацевтические препараты .....	16
1.4. Клеточные культуры как модель для исследования <i>in vitro</i> .....	19
1.5. Активность биофармацевтических препаратов .....	22
2. Материалы и методы исследования .....	24
2.1. Реактивы и расходные материалы.....	24
2.2. Методика получения первичной культуры дермальных фибробластов крысы.....	25
2.2.1. Выделение первичной культуры дермальных фибробластов крысы ....	25
2.2.2. Пассирование первичной культуры дермальных фибробластов крысы	26
2.2.3. Криоконсервация первичной культуры дермальных фибробластов крысы.....	26
2.2.4. Деконсервация первичной культуры дермальных фибробластов крысы .....	27
2.3. Методика получения первичной культуры клеток головного мозга крысы .....	27
2.3.1. Выделение клеток головного мозга крысы .....	27
2.3.2. Культивирование и пассирование первичной культуры клеток головного мозга крысы .....	28
2.3.3. Криоконсервация первичной культуры клеток головного мозга крысы .....	28
2.3.4. Деконсервация первичной культуры клеток головного мозга крысы...	29
2.4. Иммуноцитохимическое исследование клеток головного мозга крысы..	29
2.5. Оценка активности исследуемых препаратов с помощью теста «Модель раны» .....	30
2.6. Статистический анализ.....	33

3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	34
3.1. Получение и культивирование дермальных фибробластов крысы .....	34
3.2. Выделение и культивирование клеток головного мозга крысы.....	35
3.3. Изучение активности первичных культур дермальных фибробластов и клеток головного мозга крысы под влиянием регенеративных препаратов...	40
3.3.1. Особенности перемещения первичных культур дермальных фибробластов и клеток головного мозга крысы .....	40
3.3.2. Регенеративная активность дермальных фибробластов крысы под влиянием биологических препаратов .....	42
3.3.3. Влияние биофармацевтических препаратов на миграционную и пролиферативную активности клеток головного мозга крысы.....	47
Заключение .....	54
Список использованной литературы:.....	56

## Введение

Изучение механизмов регенерации и создание на их основе медицинских технологий позволит излечивать тяжелейшие заболевания, которые ранее считались неизлечимыми или требовали длительной терапии. Такой эффект возможно получить благодаря методам регенеративной медицины.

Стремительное развитие регенеративной медицины привело к формированию ее нового направления – клеточной терапии. Помимо трансплантации уже готовых стволовых клеток в патологический участок, клеточная терапия изучает способы мобилизации эндогенных ресурсов организма – региональных стволовых клеток – в дегенеративный участок. Такими регуляторами могут выступать различные биологически активные вещества (цитокины, регуляторные пептиды, хемокины и др.) [13].

Как известно, приобретенные или генетические нейродегенеративные заболевания зачастую носят необратимый характер, так как нервная ткань у млекопитающих и человека имеет низкую регенеративную способность. Однако в нервной ткани присутствуют региональные мультипотентные стволовые клетки, которые способны к замещению дефектов и частично восстанавливают структуру нервной ткани и ее функции. Активацию региональных стволовых клеток запускают различные факторы, в том числе и метаболиты самих стволовых клеток. Есть вероятность, что введение таких факторов в организм в качестве биофармацевтических средств позволит регулировать процессы восстановления в нервных тканях.

Компания «НовиСтем» выпускает биофармацевтические ветеринарные препараты линейки ULTRACELL- для кошек, собак и лошадей, не имеющие аналогов в мире. Данная группа лекарственных средств оказывает регенерирующее действие на организм благодаря белково-пептидному комплексу, полученному из кондиционной среды при культивировании МСК животных. Полученные ранее данные о возможном регенерирующем влиянии

ULTRACELL-DOG на нервную ткань, способствовали началу исследований действия препарата на восстановление нервной ткани.

Биофармацевтические терапевтические препараты проходят контроль качества, подтверждающий их безопасность, подлинность, физико-химические, микробиологические и другие показатели. Но одним из наиболее важных показателей качества является эффективность – «характеристика степени положительного влияния лекарственного препарата на течение, продолжительность заболевания или его предотвращение...» [40, с. 4].

В нашем эксперименте в качестве показателя эффективности выступает «регенеративная активность препарата» – количественная мера эффективного действия лекарственного средства, проявляющаяся в совокупности морфологических и некоторых физиологических параметров, таких как миграционная и пролиферативная активность клеточных культур, выраженная в процентном отношении к отрицательному контролю.

Объект исследования – культуры клеток головного мозга крысы и дермальные фибробласты крысы

Предмет исследования – морфологические параметры, миграционная и пролиферативная активности клеточных культур под влиянием биофармацевтических препаратов

Цель работы – изучение действия препарата ULTRACELL-DOG на морфологические характеристики и функциональные свойства первичных культур клеток головного мозга крысы (КГМк) и дермальных фибробластов крысы (ДФк) в сравнении с референсным препаратом.

Задачи исследования:

1. Освоить методики получения первичных КГМк и ДФк.
2. Исследовать морфофункциональные особенности полученных клеточных культур.
3. Изучить активности КГМк и ДФк в условиях действия биологических терапевтических средств.
4. Сравнить регенеративные активности исследуемых препаратов.

Впервые введен термин «регенеративная активность» и проведена оценка регенеративной активности биофармацевтического ветеринарного препаратов «ULTRACELL-DOG» и «Кортексин» на первичных культурах клеток головного мозга крысы и дермальных фибробластах крысы. Впервые использовалась первичная культура клеток головного мозга крысы для оценки пролиферативной и миграционной активности биофармацевтических средств.

Практическая значимость исследования состоит в том, что модель пролиферативной и миграционной активности первичной культуры клеток головного мозга крысы в фармацевтических предприятиях позволит оценивать эффективность биологических препаратов для лечения различных заболеваний, в том числе и патологий нервной системы.

Работа содержит 67 страниц и 97 источников литературы. В магистерской диссертации используются 23 рисунков, 6 таблиц и 4 математических формулы. Приложения в работе отсутствуют.

## **1. Обзор литературы по теме исследования**

### **1.1. Клеточная терапия в регенеративной медицине**

Обновление и восстановление организма человека становятся одной из наиболее активно развивающихся областей науки. Изучение механизмов регенерации и создание на их основе медицинских технологий позволит излечивать тяжелейшие заболевания, которые ранее считались неизлечимыми или требовали длительной терапии. Такой эффект возможно получить благодаря методам регенеративной медицины.

Регенеративная медицина является одной из перспективных областей медицины, в основу которой заложен принципиально новый подход к восстановлению поврежденных тканей или органов путем использования и/или стимуляции стволовых клеток собственного организма.

Биологические свойства, специализация, пластичность различных типов клеток закладываются еще во время эмбриогенеза. При этом во взрослом организме резервы восстановления достаточно велики и проявляются в постоянном обновлении клеток по разным причинам: болезням, травмам, цикла жизни самой клетки. Например, эпителий слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта обновляется за 7-9 суток [30, 27, 31].

Представление о возобновлении тканей за счет самоподдерживаемого пула стволовых клеток была впервые сформулирована более ста лет назад при изучении кроветворения. Однако только в середине XX века было экспериментально подтверждено существование гемопоэтических стволовых клеток, дающих начало всем клеткам крови. До этого времени полагали, что восполнение клеточного состава тканей взрослого организма обусловлено делением дифференцированных клеток. Считалось, что такой механизм активности стволовых клеток присущ исключительно клеткам крови – уникальной, быстро обновляющейся ткани, включающей большое количество функционально гетерогенных типов клеток.

В настоящий момент доказано, что поддержание и возобновление клеточного состава практически всех тканей организма человека, происходит благодаря пролиферации и дифференцировке соответствующих региональных и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) [97].

По аналогии с гемопоэтическими стволовыми клетками предполагалось, что во главе мезенхимальной иерархии стоят ММСК, находящиеся в костном мозге. Было высказано предположение о том, что в течение жизни потомки этих клеток проходят через дискретные стадии дифференцировки, давая начало различным клеткам соединительных тканей. Позже ММСК были выделены практически из всех эмбриональных и постнатальных тканей млекопитающих, птиц и амфибий.

Одним из многообещающих направлений регенеративной медицины является клеточная терапия, технологии которой сконцентрированы на изучении возможностей использования способностей мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток человека и животных к восстановлению тканей и органов [68, 79].

Доступные для клинического применения источники ММСК делят на взрослые и неонатальные. Взрослые ММСК можно получить из всех тканей, имеющих соединительнотканый компонент, однако чаще всего их выделяют из костного мозга, жировой ткани, периферической крови. К неонатальным источникам относят пуповинную кровь, амниотическую жидкость, плаценту, плодные оболочки, пупочный канатик [2, 23].

ММСК обладают высокой миграционной способностью, секретируют большое число биологически активных молекул, обладают высоким пролиферативным потенциалом, в их фенотипе отсутствуют тканеспецифичные маркеры, они обладают способностью к самоподдержанию в течение длительного времени и возможностью дифференцироваться в различные виды специализированных клеток. Такие свойства лежат в основе регенерации тканей и органов (рис. 1.1.1) [50, 87].

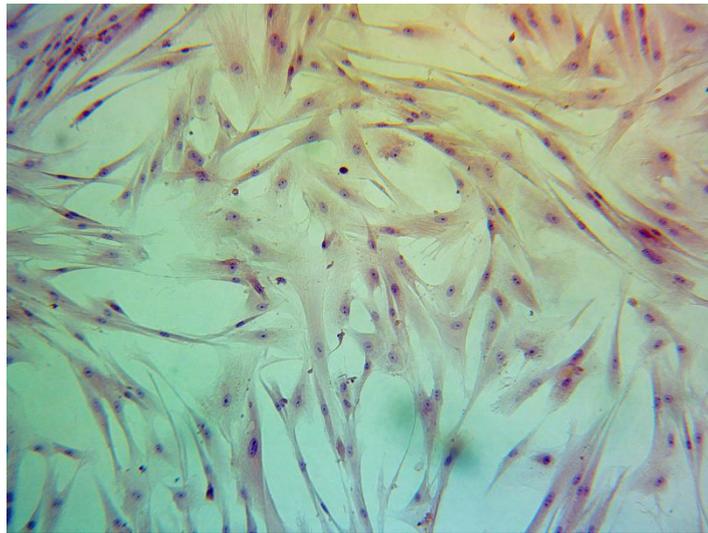


Рис. .1.1.1 Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки собаки  
(x100)

Процессы самоподдержания и дифференцировки стволовых клеток находятся под контролем собственных генов, а также под влиянием внешних сигналов, окружающих клетку, которые посредством образования межклеточных контактов, компонентов межклеточного матрикса или секретируемых клетками биологически активных веществ формируют микроокружение, или нишу стволовых клеток. Такие ниши способны поддерживать характерные для клеток свойства долгое время, а в случае повреждения ткани или органа ниша становится благоприятной средой для индукции стволовых клеток в необходимый клеточный тип [7, 81].

Известно, что ММСК способны дифференцироваться в клетки мезодермального зародышевого листа: остеобласты (рис. 1.1.2.), хондроциты (рис. 1.1.3.) и адипоциты (рис. 1.1.4.).

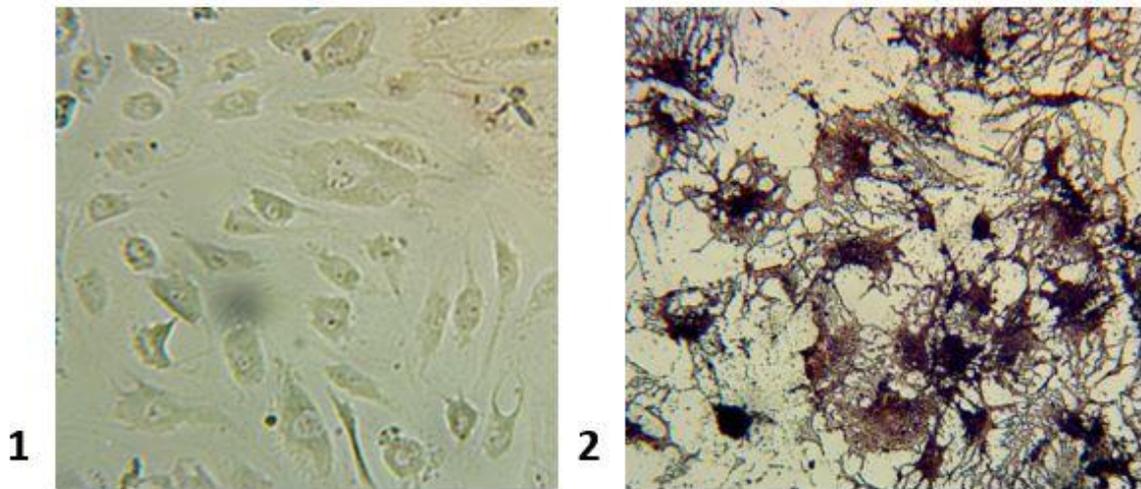


Рис. 1.1.2. Направленная дифференцировка жтМСК человека в хондрогенном направлении: 1 – контроль, недифференцированные клетки; 2 - хондроциты, гликозаминогликаны окрашены красителем Альциановым синим (x200)

Помимо способности дифференцироваться в клетки мезенхимного происхождения, ММСК дают начало кости и хрящу после эктопической трансплантации *in vivo* на животных моделях, а также опосредуют регенерацию костной ткани после травм и при генетических дефектах остеогенеза.

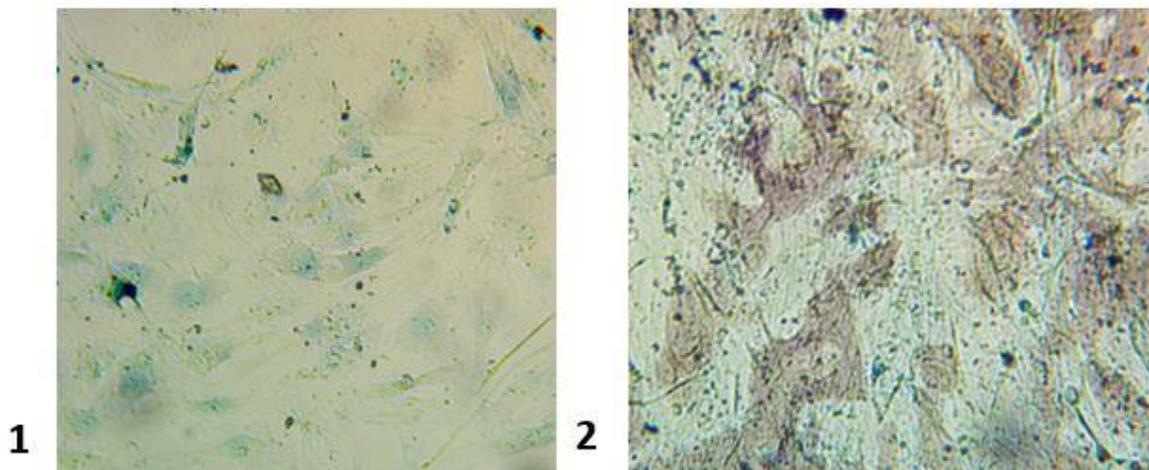


Рис. 1.1.3. Направленная дифференцировка жтМСК человека в остеогенном направлении: 1 – контроль, недифференцированные клетки; 2 – остеоциты, отложения кальция окрашены красителем Ализариновым красным (x200)

Более того, исследования показали, что ММСК могут индуцироваться в клетки эктодермального и энтодермального происхождения, включая глиальные клетки, нейроны, гепатоциты, миобласты, кардиоциты [53, 96].

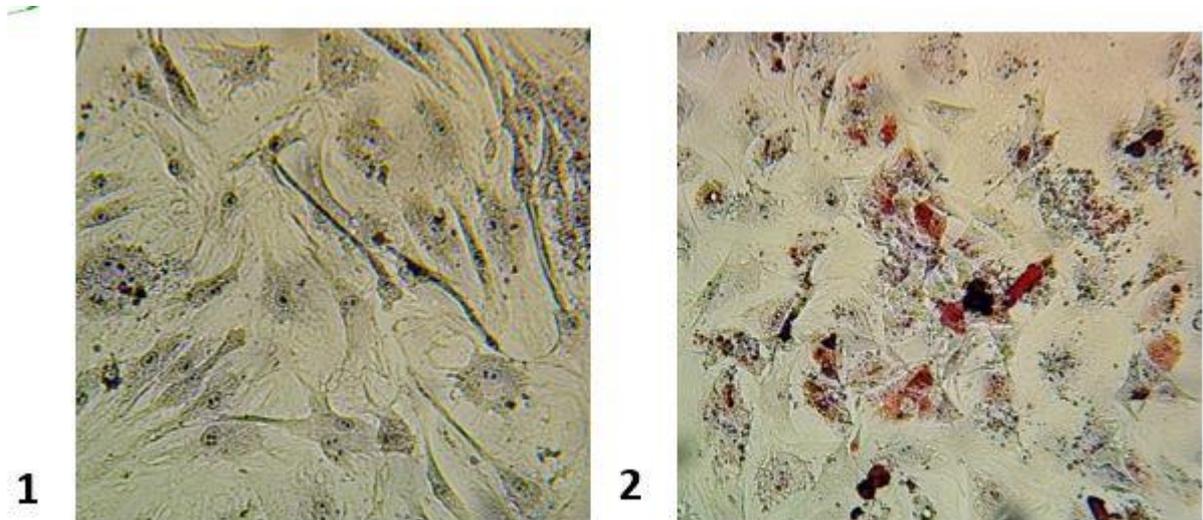


Рис. 1.1.4. Направленная дифференцировка жтМСК человека в адипогенном направлении: 1 – контроль, недифференцированные клетки; 2 – адипоциты, жировые отложения окрашены красителем Oil Red (x200)

Миграционная способность ММСК обусловлена биохимическими сигналами, распознаваемыми системой рецепции клетки, запускающими реакции их тропизма. Такими сигналами могут быть различные вещества белковой природы. Например, фактор роста гепатоцитов, фактор роста эндотелия сосудов, активатор урокиназы плазминогена могут вызывать миграцию ММСК посредством их связи с рецепторами клеток – лигандных миграционных осей [69, 84, 88].

Вероятно, в раннем онтогенезе ММСК мигрируют по организму, заселяя различные ткани. В основе перемещения ММСК лежит регуляторный механизм поддержания тканевого гомеостаза. Так, в месте повреждения ткани во внутреннюю среду организма высвобождаются различные молекулы: цитокины, разные факторы, хемокины, регуляторные пептиды и другие

биологически активные вещества. Они способны включать региональные стволовые клетки в процессы регенерации повреждения [54, 55, 56].

Региональные стволовые клетки – мультипотентные соматические клетки взрослого организма человека и животных. Они находятся в различных тканях и, теоретически, их число соответствует числу тканей. Так, гемопоэтические стволовые клетки встречаются в сердце, легких, печени, эпидермисе кожи, в нервной ткани и органах ЦНС. Региональные стволовые клетки составляют тканевый резерв и способствуют замещению дефектов в разных органах, включая и нервную систему. [39, 62].

## **1.2. Способы регенерации нервной ткани**

Как известно, приобретенные или генетические нейродегенеративные заболевания зачастую носят необратимый характер, так как у млекопитающих и человека нервные ткани практически не восстанавливаются. Однако при этом взрослая ткань ЦНС включает нейральные стволовые клетки, обеспечивающие локальный нейрогенез и латентные нейрональные предшественники, способные активироваться во время повреждения.

Процесс нейрогенеза у взрослых начинается с момента деления клеток-предшественников и заканчивается образованием нейронов или глиальных клеток. Такие предшественники обладают высокой подвижностью, устойчивы к гипоксии, характеризуются пролиферативной активностью и способны дифференцироваться в зрелые клетки [49].

Участки, где имеются делящиеся клетки в ткани взрослого головного мозга, называют нейрогенными регионами. При пересадке прогениторных клеток в такие районы, происходит их дифференцировка в нейроны. Помимо нейрогенной зоны, процесс нейрогенеза происходит в очагах гибели нейронов и в участках разрушения нервных тканей. Исходя из чего, можно предположить, что репаративные процессы в нервных тканях вполне возможны [49, 89]

Выделяют два основных нейрогенных участка, где сконцентрирована большая часть клеток-предшественников. Настоящие нейральные стволовые клетки находятся в субэпендимальном слое боковых желудочков. Они представлены несколькими классами клеток, развивающимися из нейральной стволовой клетки. Так, астроциты относятся к клеткам первого типа. Они дают начало промежуточным нервным клеткам-предшественникам – клеткам второго типа, которые порождают третий тип. Последние являются незрелыми клетками, которые дифференцируются в нейробласты. После чего они постепенно и долго созревают до зрелого нейрона [49, 51, 80].

Другой основной зоной локализации региональных стволовых клеток является зубчатая фасция гиппокампальной формации. Стволовые клетки этой зоны способны дифференцироваться в зрелые клетки-зерна и глиальные клетки (клетки первого типа) [74, 93].

Стволовые клетки головного мозга находятся в определенных нишах, основным компонентом которых являются межклеточные взаимодействия, внеклеточный матрикс, взаимосвязь с кровеносными сосудами и специализированная базальная мембрана. Кроме того, в определенных областях головного мозга немаловажным компонентом микроокружения региональных стволовых клеток является близость цереброспинальной жидкости [45].

Важнейшим компонентом нейрогенеза является связь стволовых клеток с кровеносными сосудами. Установлено, что в перивентрикулярной васкуляризированной зоне образуется наибольшее количество новых нейронов. Такие взаимодействия обеспечивают прогениторные клетки митогенными и трофическими факторами, вызывая их пролиферацию и дифференцировку. Так, нейрогенез стволовых клеток в зубчатой извилине и субэпендимальном слое боковых желудочков происходит в васкуляризированных локусах [92].

Вне нейрогенных участков выделяют две формы нейрогенеза. К первой относят местный нейрогенез, который связан с активацией прогениторных

клеток в ответ на патологическое воздействие. Ко второй форме относят миграцию клеток-предшественников из нейрогенных регионов, стимулированных внешним сигналом. Было доказано, что под влиянием эндогенных стимулов нейральные стволовые клетки вне нейрогенного участка дифференцируются в нейроны в коре головного мозга взрослой мыши [86].

Клетки-предшественники способны перемещаться или мигрировать. Так, для поддержания обонятельной функции прогениторные клетки субвентрикулярной зоны постоянно мигрируют по ростральному миграционному потоку в обонятельные луковицы, где рассеиваются по слоям и созревают. Ростральный миграционный поток представляет собой цепь кластеров перемещающихся клеток, окруженную специфичной сетью глиальных клеток. При патологических процессах путь миграции клеток может изменяться – клетки способны покинуть ростральный миграционный поток и перемещаться в участки, где происходит гибель нейронов [78, 90, 91].

В силу постмитотической дифференцировки нейронов, их высокой ранимости и низкого репаративного потенциала, возможность восстановления поврежденной ЦНС в последние годы пытаются решить с помощью клеточной терапии. В настоящее время перспективы возможных применений нейральных стволовых клеток в медицине можно подразделить на два основных направления – алло- или аутотрансплантация стволовых клеток и фармакологическая активация собственных стволовых клеток.

Существует множество работ, связанных с применением региональных стволовых клеток в лечении ЦНС. Так, применение аутологичных ММСК для лечения у пациентов фармакорезистентной симптоматической эпилепсии снизило количество и тяжесть приступов, а у некоторых больных даже улучшились когнитивные функции и снизился уровень тревожности [43].

Исследования трансплантации нейральных и мезенхимальных стволовых клеток на моделях спинномозговых травм уменьшило области вторичного повреждения и привело к частичному восстановлению двигательной и сенсорной активности лабораторных животных [12, 51].

При ишемии, инсультах и инфарктах головного мозга применение клеточных технологий, в том числе и в клинической практике, приводило к улучшению неврологического статуса [83].

Клеточная терапия способствует значительному выживанию нейронов спинального ганглия после аутогенной вставки, улучшает микроциркуляцию травмированного участка, способствует восстановлению двигательной активности [59].

При нейродегенеративных заболеваниях клеточная терапия дает возможность коррекции нарушений моторики и когнитивных функций [64].

Трансплантация стволовых клеток – процесс трудоемкий, длительный и дорогой. Такая процедура требует хороших медицинских и биотехнологических навыков специалистов, которые проводят процедуру забора биоматериала, выделяют и накапливают стволовые клетки, а затем подсаживают их больному. Помимо мастерства специалистов, для проведения такой процедуры требуется специально оборудованная лаборатория, а также реактивы и вспомогательные материалы, что приводит к значительному удорожанию трансплантации стволовыми клетками.

Клеточная терапия, основанная на мобилизации эндогенных ресурсов, имеет ряд преимуществ, одним из которых является отсутствие необходимости получения, индукции (в некоторых случаях), трансплантации стволовых клеток в патологический участок. Для успешного восстановления погибших нейронов необходимо регулировать миграцию нейральных стволовых клеток в зону дегенерации. Такими указателями могут выступать цитокины, факторы роста, хемофакторы или другие биологически активные вещества [81, 94].

Как уже было отмечено ранее, важную роль в миграции нейробластов играет локальная васкуляризация тканей. Так, эндотелиальные клетки синтезируют факторы, регулирующие процессы дифференцировки и миграции стволовых клеток. Кроме того, в сосудистом русле могут циркулировать хемофакторы и цитокины других источников, также

оказывающих влияние на нейрогенез. Такими источниками могут быть биофармацевтические средства [76].

Таким образом, есть вероятность, что введение таких факторов в виде биологических препаратов в организм при дальнейшем их попадании в кровяное русло и после преодоления гематоэнцефалического барьера, позволит регулировать процессы восстановления в нервных тканях.

### **1.3. Биофармацевтические препараты**

Разработка новых лекарственных препаратов с использованием биологических подходов является одним из перспективных направлений в области создания лекарственных средств, влияющих на патогенетические значимые звенья в развитии заболевания. Активным компонентом в таких препаратах являются биологически активные вещества – цитокины, факторы роста, моноклональные антитела, хемокины, регуляторные пептиды и другие.

Биофармацевтические препараты эффективны в малых концентрациях и легко расщепляются в тканях без образования токсичных продуктов. Механизм их действия направлен на регуляцию энергетического метаболизма мозга, поддержание редокс-баланса, собственного нейротрофического влияния и модуляции активности эндогенных факторов роста, взаимодействия с системами нейропептидов и нейромедиаторов. Однако влияние таких препаратов на организм все еще изучены недостаточно и их исследования продолжаются [3, 24].

При клинических и экспериментальных исследованиях препараты на основе пептидов показали высокую эффективность в условиях повреждения головного мозга вследствие ишемии. Также обнаружено нейропротекторное и антиамнестическое действия при гипоксическом повреждении тканей мозга после терапии биологическими средствами. Применение пептидных препаратов позитивно влияет на память и процессы обучения крыс при алкогольной интоксикации. Их с успехом применяют для терапии

энцефалопатий, повышения стрессоустойчивости и повышения работоспособности [9, 46, 52, 66, 73, 85].

Полипептидные препараты уже несколько десятков лет используют в качестве терапевтических средств. Чаще всего такие препараты получают путем гомогенизации тканей и органов животных с их последующей очисткой от фракций высокомолекулярных белков. Так, «Тималин» получают из тимуса крупного рогатого скота, препарат «Сампрост» – из ткани простаты бычков, достигших половой зрелости, «Кортексин» – из коры головного мозга крупного рогатого скота. Такие препараты выполняют регуляторную и восстанавливающую функции. Кроме того, они являются тканеспецифичными, что позволяет им «нацеливаться» на определенный орган и восстанавливать его. Их можно назначать при наличии хронических заболеваний у больного. Как написано в инструкциях по применению биологических средств, побочные эффекты встречаются достаточно редко. В некоторых случаях при индивидуальной непереносимости активного вещества могут встречаться аллергические реакции [67].

Инновационным этапом в развитии биотехнологических препаратов явилось получение средств на основе кондиционной среды ММСК. Одним из первых фармацевтических препаратов является ветеринарный регенеративный препарат ULTRACELL-DOG компании «НовиСтем». ULTRACELL-DOG стимулирует собственные ММСК организма за счёт входящих в состав низкомолекулярных пептидов. Так же в нем содержатся вещества кондиционной среды, полученные при культивировании ММСК.

ММСК служат важнейшим источником факторов роста и цитокинов, принимающих участие в регуляции регенерации тканей. Так, в костном мозге именно ММСК продуцируют факторы, необходимые для самоподдержания гемопоэтических стволовых клеток и удержания их в нише, включая SCF (фактор стволовых клеток), SDF-1 (фактор стромы-1 $\alpha$ ), ангиопоэтин-1 и интерлейкин-7.

Кроме того, было установлено, что ММСК продуцируют ангиогенные и нейротрофные факторы роста, включая vascular endothelial growth factor (VEGF, фактор роста сосудистого эндотелия), basic fibroblast growth factor (bFGF, основной фактор роста фибробластов), hepatocyte growth factor (HGF, фактор роста гепатоцитов), ангиопоэтин, nerve growth factor (NGF, фактор роста нервов), brain-derived neurotrophic factor (BDNF, нейротрофный фактор головного мозга) и glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF, нейротрофный фактор глиальных клеток) [24].

Помимо этого, ММСК секретируют необходимые для функционального созревания сосудов и их стабилизации факторы, включая bFGF, Platelet-derived growth factor (PDGF-BB, фактор роста тромбоцитов-BB) и Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ , трансформирующий фактор роста- $\beta$ ).

Так, PDGF-BB вызывает ветвление растущих кровеносных сосудов и привлечение к ним перицитов, гладкомышечных и мезенхимальных клеток, а TGF- $\beta$  стимулирует дифференцировку гладкомышечных клеток и продукцию компонентов внеклеточного матрикса сосудистой стенки.

Продукцию факторов роста и цитокинов в ММСК многократно возрастает при повреждении органов и тканей. Гипоксия вызывает кардинальные изменения экспрессии генов в ММСК: содержание мРНК проангиогенных факторов, включая VEGF, placental growth factor (PlGF, плацентарный фактор роста), HGF, PDGF-BB, bFGF и TGF- $\beta$ , возрастает до четырех раз, а мРНК ангиогенных факторов, таких как ингибитор активаторов плазминогена-1 (PAI-1, plasminogen Activator Inhibitor-1), ангиостатин и тромбоспондин, снижается более чем в два раза.

ММСК также секретируют нейротрофические факторы, включая NGF, BDNF и GDNF, которые обуславливают стимуляцию роста и регенерации нервных волокон, вызванную трансплантацией этих клеток.

Секреторная активность ММСК также влияет на их иммуномодулирующие свойства. На нескольких животных моделях показано, что инъекции культивируемых ММСК вызывают иммуносупрессию *in vivo*.

Кондиционная среда ММСК является эффективной при лечении ожоговых ран, с ее помощью удалось достичь прогресса в терапии острых проявлений лучевых повреждений, ее успешно применяют в гинекологии. Кроме того, кондиционная среда за счет входящих в нее цитокинов, проявляет иммуномодулирующее действие [5, 22, 29].

Активная фармацевтическая субстанция ULTRACELL-DOG представляет собой белково-пептидный комплекс, полученный из кондиционной среды при культивировании мезенхимальных стволовых клеток собаки. Входящие в состав белково-пептидного комплекса низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой до 10 кДа оказывают регенерирующее и репаративное действие, стимулируя восстановление поврежденных тканей за счет активации систем клеточного обновления организма, обеспечивая замещение поврежденных клеток.

ULTRACELL-DOG рекомендован для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата (травмы связок конечностей, остеоартроз), поражений кожи неинфекционной этиологии, асептических ранах, а также в комплексной терапии перечисленных заболеваний, осложненных инфекцией.

В результате последних исследования препарата было выдвинуто предположение о положительном влиянии ULTRACELL-DOG на нервную ткань.

#### **1.4. Клеточные культуры как модель для исследования *in vitro***

На сегодняшний день во всем мире передовые научные центры и университеты, а также фармацевтические компании отказываются от проведения тестирований фармакологических субстанций на животных и ищут альтернативные методы. Такие организации придерживаются концепции трех R (reduction, refinement, replacement), предложенной У. Расселом и Р. Берчем в их трактате под названием «Принципы гуманной методики эксперимента». В основе данной концепции лежат следующие

принципы: *reduction* – сокращение числа животных в эксперименте; *refinement* – совершенствование эксперимента в направлении его гуманизации; *replacement* – по возможности замена животных в эксперименте альтернативными моделями (использование математических систем, компьютерного моделирования, биологических моделей *in vitro*). Наибольшее распространение сегодня получили культуральные методы – использование культур клеток в качестве альтернативы организму животного [65].

В современной биологии, фармацевтике и медицине культуры клеток активно используются в качестве модели для проведения широкого спектра фундаментальных исследований, испытаний, а также производства биотехнологических препаратов. Преимущества таких моделей заключаются в том, что они выявляют действие испытываемых препаратов на глубоком, клеточном уровне, являются более дешевыми, демонстративными, а также предпочтительными с точки зрения биоэтики.

Существует тысячи различных тест-систем для исследования *in vitro*: изолированные перфузируемые органы, клеточные культуры/суспензии, тканевые срезы, изолированные органеллы/мембраны/ферменты, системы беспозвоночных и другие. Наиболее простыми и доступными системами являются монослойные клеточные культуры [19].

Культуры клеток могут быть первичными, диплоидными или перевиваемыми.

Первичные клеточные культуры – это культуры, полученные из клеток тканей или органов, взятых от одного или более организмов, которые выращиваются *in vitro* от начала субкультивирования [28, с 2]. Ее получают путем стерильного удаления фрагмента ткани и его механической и/или ферментативной дезагрегацией, с последующим культивированием клеток в питательной среде *in vitro* [63].

Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом. Срок жизни таких культур ограничен. Однако в них наиболее полно представлены типы клеток, присущие данной

ткани, а также четко обнаруживается ряд свойств ткани, из которой была получена первичная культура. Предпочтительнее получать биологический материал от новорожденных животных, так как он содержит большое количество прогениторных клеток в отличие от тканей взрослых животных [37].

Лишенные естественного микроокружения культуры клеток в процессе культивирования меняют свой фенотип и теряют ряд свойств, присущих первичной культуре, в результате чего она становится диплоидной линией. Такая культура клеток может выдерживать до 50 пассажей (предел Хейфлика). В течение всего периода культивирования диплоидная культура имеет стабильный кариотип, у нее отсутствуют онкогенная и туморогенная активности [16].

Первичные и диплоидные культуры клеток используют в производстве лекарственных средств (вакцины, биофармацевтические препараты), для тестирования терапевтических препаратов, типирования вирусов или других целей.

Некоторые клетки при культивировании приобретают способность к длительному размножению. Такие культуры называют перевиваемыми. Их бессмертие – результат генетической изменчивости клеток. Они, как правило, имеют одинаковую форму, сохраняют гетероплоидный кариотип, стабильны в условиях *in vitro*, а некоторые из них обладают онкогенной активностью. Последнее качество затрудняет их использование при производстве лекарственных препаратов.

Источником перевиваемых линий могут быть первичные клеточные культуры, прошедшие трансформацию *in vitro*: ВНК-21 – из почек однодневных сирийских хомяков; СНО – из яичника китайского хомячка). Злокачественные новообразования также являются источником перевиваемых культур. В этом случае трансформация клеток происходит *in vivo* (HeLa – получена из карциномы шейки матки; Нер-2 – из карциномы гортани).

### 1.5. Активность биофармацевтических препаратов

Одним из условий при регистрации биофармацевтических препаратов является оценка активности белка биологическим методом, так как популярный и точный иммуноферментный метод определения белка может не уловить отличий пространственной организации пептидных молекул. Такие отличия могут уменьшить биологическую активность белка, в связи с чем производимые лекарственные препараты должны быть охарактеризованы по показателю эффективность – это величина отклика биологической системы на фармакологическое воздействие [44, 48].

Оценка биологической активности позволяет охарактеризовать фармакологическое действие препарата и позволяет изучить механизмы его лечебных эффектов.

Для определения эффективности должен быть использован широкий спектр методик, базирующихся на разных принципах, для выяснения механизмов действия лекарственного препарата и выбора наиболее информативного метода оценки активности с последующим внесением его в нормативную документацию предприятия, производящего биотехнологические лекарственные средства [11, 14].

Эффективность препарата возможно определить при помощи методов *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*. На модельных животных эффективность оценивается по выполнению белком той функции, ради которой его производят. Методы *in vivo* позволяют получить достоверные и достаточные по объему результаты, которые могут быть с успехом экстраполированы в клинику. Однако, не смотря на высокую информативность исследований *in vivo*, наиболее успешный подход к разработке дизайна исследований может быть обеспечен результатами исследований *in vitro* и *ex vivo*. Эти методы также позволяют сократить количество животных в эксперименте, что имеет ключевое значение с точки зрения биоэтики.

Кроме того, результаты на моделях *in vitro* получают значительно быстрее, чем на целом организме животных. На клеточных моделях *in vitro* изучение эффективности позволяет адекватно оценивать действие данного белка на организм, хотя белок может и не иметь ничего общего с функцией в организме.

Методики оценки эффективности биофармацевтических препаратов *in vitro* основаны на стимулировании или угнетении роста, деления, миграции определенного вида клеток в культуре, что обусловлено непосредственным взаимодействием препарата со специфическими рецепторами на их поверхности. Такой эффект детектируют и, по возможности, сопоставляют полученные данные со стандартом или референтным препаратом.

Миграции клеток, или клеточные перемещения, наряду с другими клеточными процессами имеют очень большое значение, начиная с процесса гаструляции и далее, в процессах морфогенеза. Это центральный процесс в развитии и обслуживании многоклеточных организмов. Миграционная способность обусловлена биохимическими сигналами, распознаваемыми системой рецепции клетки и способностью клеток к хемотаксису. Этот процесс протекает с участием сигнальных молекул и заканчивается «заякориванием» клетки в своей нише.

Пролиферация – это разрастание ткани организма путём размножения клеток митозом.

Модель «раны» является общепринятой в качестве простого и информативного метода *in vitro*, характеризующего пролиферацию и миграцию клеток, направленную в область повреждения. Данный метод позволяет в режиме скрининга оценить функциональные различия между разных типов клеток, исследовать активность препарата, сравнить действия различных препаратов между собой на целевой культуре клеток, подобрать эффективную концентрацию терапевтического средства и разработать стандарты для промышленного получения биотехнологических препаратов [74].

## 2. Материалы и методы исследования

### 2.1. Реактивы и расходные материалы

Для работы с клеточными культурами использовали питательную среду ДМЕМ с L-глутамином, обогащенную 0,1% глюкозой (Биолот, Россия) и питательную среду ДМЕМ с L-глутамином, обогащенную 0,45% глюкозой (Биолот, Россия). В качестве ростового фактора добавляли сыворотку эмбриональную телячью (BioSera, Франция). Для дезагрегации клеточного конfluence использовали раствор Версена в ЭДТА (ПанЭко, Россия) и раствор трипсина 0,25% (ПанЭко, Россия). Для работы с первичными культурами в культуральную среду вносили антибиотик – гентамицин (ПанЭко, Россия) и антимикотик – амфотерицин В (BioWest, США). Криоконсервацию клеток проводили с использованием диметилсульфоксида (ДМСО) (AppliChem, США).

Для промывки клеточного монослоя, а также приготовления некоторых растворов использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко – DPBS (ПанЭко, Россия).

Клетки считали с помощью камеры Горяева (МиниМед, Россия), определяли их жизнеспособность витальным красителем трипановым синим (ПанЭко, Россия).

Фиксацию клеток для проведения иммуноцитохимического анализа осуществляли раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США); пермеабиллизацию – с помощью Triton X-100 (AppliChem, США). Для приготовления блокирующего буфера использовали бычий сывороточный альбумин (Биолот, Россия), глицин (ПанЭко, Россия). Для иммуноцитохимического окрашивания были взяты первичные мышинные антитела к нейрон специфичному  $\beta$ -III-тубулину («Abcam», Великобритания) и вторичные козы антимышинные Alexa Fluor 488-конъюгированные антитела («Abcam», Великобритания).

Все работы с клеточными культурами проводились с использованием культурального пластика (SPL, Корея).

## **2.2. Методика получения первичной культуры дермальных фибробластов крысы**

### **2.2.1. Выделение первичной культуры дермальных фибробластов крысы**

Первичная культура дермальных фибробластов крысы (ДФк) была получена из кожи эмбрионов нелинейных неонатальных крыс (*Rattus norvegicus f. domestica*), массой до 5 г. Животные помещались в эксикатор с диэтиловым эфиром. По истечении 10 минут проводили декапитацию крыс. Получали биоптат кожи, обработанный 70% этанолом. Дальнейшие работы проводили в асептических условиях [30].

Биоптат кожи механически измельчали и подвергали ферментативной обработке 0,1% раствором трипсина в течение 30 мин при температуре 37°C. Для очистки от фрагментов ткани суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры с диаметром пор 100 мкм. Профильтрованную суспензию клеток центрифугировали с помощью лабораторной центрифуги (MPW, Польша) при 1500 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде ДМЕМ, обогащенной 0,1% глюкозы и содержащей 100 мкг/мл гентамицина и 2 мкг/мл амфотерицина В, и высевали в культуральные флаконы (площадью 75 см<sup>2</sup>) с добавлением 10% сыворотки эмбриональной телячьей. Посевная концентрация клеток составляла 1×10<sup>4</sup> кл./см<sup>2</sup>. Клетки считали при помощи камеры Горяева и витального красителя трипанового синего. Инкубировали флаконы во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Binder, Германия). На следующий день проводили замену ростовой среды для исключения неадгезивных клеток [1, 15, 20, 32, 42].

### **2.2.2. Пассирование первичной культуры дермальных фибробластов крысы**

Пассирование культуры ДФк проводили после достижения клетками 80-90 % конfluence. Для снятия клеток с подложки флакона использовали смесь раствора Версена и раствора трипсина, с конечной концентрацией трипсина 0,05% (далее диспергирующий раствор). Процесс открепления клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа Биомед-4 Инверт (БИОМЕД, Россия). Посевная концентрация клеток составляла  $1 \times 10^4$  кл./мл. Клеточную суспензию высевали в питательной среде ДМЕМ, обогащенной 0,1% глюкозы, добавляли 10% сыворотки эмбриональной телячьей и 80 мкг/мл гентамицина. По мере увеличения количества пассажей концентрацию антибиотика и антимикотика в ростовой среде снижали. Культивировали клетки во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Для получения более «чистой», лишенной неадгезивной фракции клеток кожи, культуры ДФк пересевали до 3-4 пассажей, после чего криоконсервировали [38].

### **2.2.3. Криоконсервация первичной культуры дермальных фибробластов крысы**

Криоконсервирование ДФк осуществляли на 3-4 пассаже. Для этого клеточный монослой дезагрегировали диспергирующим раствором, как и при пассировании. Клеточную суспензию помещали в пробирку с питательной средой и центрифугировали со скоростью 1500 об./мин в течение 10 мин. Супернатант тщательно ресуспендировали в охлажденном растворе, содержащем 95% эмбриональной телячьей сыворотки и 5 % ДМСО (далее криопротекторная среда), затем суспензию переносили в криоампулы по 1 мл с концентрацией клеток  $1 \times 10^6$  клеток/мл. Ампулы помещали в термический контейнер и охлаждали со скоростью 1-3°C в минуту. Хранили культуру при -196°C.

#### **2.2.4. Деконсервация первичной культуры дермальных фибробластов крысы**

Ампулу с клетками быстро нагревали в водяной бане при 37°C. Оттаявшую клеточную суспензию помещали в культуральный флакон площадью 75 см<sup>2</sup> и по капле, постоянно помешивая, вносили питательную среду ДМЕМ, обогащенную 0,1% глюкозы, затем добавляли 10% сыворотки эмбриональной телячьей. Культивировали клетки при 37°C в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>.

Жизнеспособность клеток оценивали по исключению трипанового синего. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

### **2.3. Методика получения первичной культуры клеток головного мозга крысы**

#### **2.3.1. Выделение клеток головного мозга крысы**

Первичную культуру клеток головного мозга крысы (КГМк) выделяли из ткани головного мозга нелинейных новорожденных крыс. Животное усыпляли диэтиловым эфиром и проводили декапитацию. Извлекали головной мозг, дважды промывали в питательной среде ДМЕМ с высоким содержанием антибиотика и антимикотика. Далее ткань головного мозга измельчали и инкубировали при 37°C в течение 10 минут в 0,1% растворе трипсина. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр, центрифугировали при 1300 об./мин в течение 7 минут. Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в питательной среде ДМЕМ, обогащенной 0,45% глюкозой. Производили подсчет клеток в камере Горяева и определяли их жизнеспособность с помощью витального красителя трипанового синего, после чего высевали клетки в культуральные флаконы в концентрации 0,5-1×10<sup>6</sup> кл./мл. Росточная среда содержала 10% сыворотки эмбриональной телячьей, 100 мкг/мл гентамицина и 2 мкг/мл амфотерицина В. На следующие

сутки заменяли ростовую среду на аналогичную. Клетки содержали в условиях 5% CO<sub>2</sub> и при температуре 37°C [33, 34, 61, 70, 71].

### **2.3.2. Культивирование и пассирование первичной культуры клеток головного мозга крысы**

Инкубацию КГМк проводили в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, при температуре 37°C. В качестве среды для культивирования использовали питательную среду ДМЕМ, обогащенную 0,45% глюкозы и 10% сыворотки эмбриональной телячьей. Среда также содержала 100 мкг/мл гентамицина и 2 мкг/мл амфотерицина. Половину объема среды для культивирования заменяли на свежую порцию каждые 3-4 суток. Концентрации антибиотика и антимикотика постепенно снижали [72].

По достижению 90-100 % конfluence клетки снимали с подложки диспергирующим раствором. Процесс открепления клеток контролировали микрокопированием. После дезагрегации клеточную суспензию дважды промывали от фермента питательной средой, центрифугировали 3 мин при 1000 об./мин. Осадок восстанавливали в 1 мл среды культивирования, считали клетки и высевали с концентрацией клеток  $1-2 \times 10^5$  кл./мл.

### **2.3.3. Криоконсервация первичной культуры клеток головного мозга крысы**

Для криоконсервации КГМк снимали с подложки аналогичным пассированию способом, клетки отмывали от фермента и восстанавливали в криопротекторной среде. Концентрация клеток в криоампуле составляла  $0,5-1 \times 10^6$  кл. Ампулы помещали в термический контейнер и охлаждали со скоростью 1-3°C в минуту. Хранили культуру при -196°C [17].

### **2.3.4. Деконсервация первичной культуры клеток головного мозга крысы**

Клеточную суспензию оттаивали на водяной бане (37°C), затем перемещали ее в пробирку и вносили при постоянном помешивании теплую питательную среду ДМЕМ, обогащенную 0,45% глюкозой. Добавляли 10% сыворотки эмбриональной телячьей и высевали клетки на культуральные планшеты. Далее клетки инкубировали в стандартных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Binder, Германия).

### **2.4. Иммуноцитохимическое исследование клеток головного мозга крысы**

Иммуноцитохимические исследования КГМк осуществляли после их предварительной фиксации 4% раствором параформальдегида в течение 15 мин. Фиксированные клетки промывали раствором DPBS три раза по 5 мин. Пермеабиллизацию проводили при комнатной температуре 0,3% раствором Triton X-100 в течение 10 мин. Далее лунки с клетками инкубировали 50 мин при комнатной температуре с блокирующим буфером (DPBS, содержащий 0,1% раствор Triton X-100, 1% раствор бычьего сывороточного альбумина и 0,3 М раствор глицина). Инкубацию с первичными антителами проводили при +4°C в течение 15 ч. После чего культуру отмывали от несвязавшихся антител DPBS трижды по 5 мин. Со вторичными антителами клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Для определения экспрессии  $\beta$ -III-тубулина использовали первичные мышинные антитела к нейрон специфичному  $\beta$ -III-тубулину в разведении 1:500 и вторичные козы антимышинные Alexa Fluor 488-конъюгированные антитела в разведении 1:800. Ядерный аппарат окрашивали с помощью флуоресцентного красителя DAPI (AppliChem, США) согласно инструкции производителя [6].

Микрофотосъемку проводили с помощью флуоресцентного микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия).

## 2.5. Оценка активности исследуемых препаратов с помощью теста «Модель раны»

Модель «раны», или метод царапины является общепринятой в качестве простого и информативного метода *in vitro*, характеризующего пролиферацию и миграцию клеток, направленную в область повреждения. Данный тест также позволяет оценить токсичность исследуемого препарата на клеточную культуру по морфологическим параметрам.

Данная модель в нашем эксперименте использовалась для определения регенеративной активности препарата – количественной меры эффективного действия лекарственного средства, проявляющейся в совокупности морфологических и некоторых физиологических параметров, таких как миграционная и пролиферативная активность клеточных культур, выраженной в процентном отношении к отрицательному контролю.

Можно предположить, что помимо миграции, сближение краев «раны» происходит за счет пролиферативной активности клеток, поэтому эти показатели изучали совместно, без вычленения каждого из параметров.

Для оценки пролиферативной и миграционной активности ДФк и КГМк клетки высевали в 24-луночные планшеты и культивировали до выполнения 90-100% конfluence. ДФк высевали в концентрации  $1 \times 10^4$  кл./мл и культивировали в среде ДМЕМ, обогащенной 0,1% глюкозой и 10% сыворотки эмбриональной телячьей в течение 3-х суток. КГМк выращивали 4-5 суток в питательной среде ДМЕМ, обогащенной 0,45% глюкозой и 10% сывороткой эмбриональной телячьей. Посевная концентрация клеток головного мозга крысы составляла  $1-2 \times 10^5$  кл./мл.

После выполнения культурами 90-100% конfluence наносили царапину («рана») наконечником для дозатора и промывали лунки питательной средой дважды. В одной лунке делали две царапины.

Лиофилизированные препараты восстанавливали в 1 мл питательной среды, концентрации общего белка в препаратах выравнивали между собой,

после чего готовили растворы, в концентрациях 1%, 0,1% и 0,01% и вносили их в лунки 24-луночного планшета как показано на рисунке 2.1.

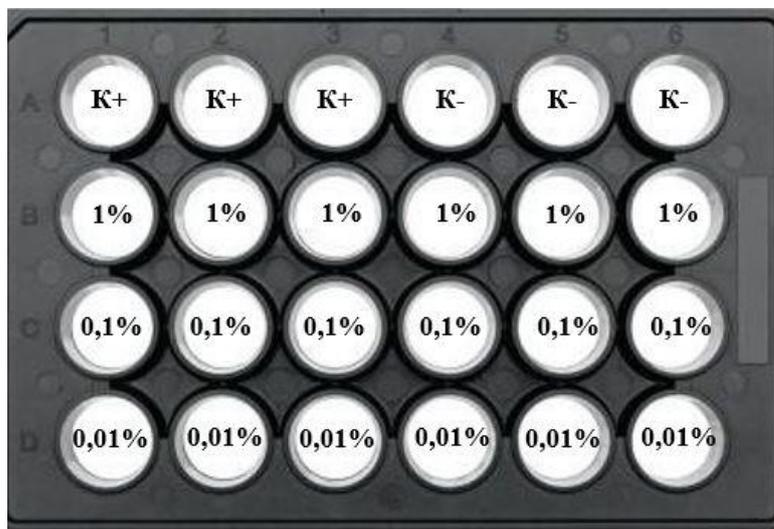


Рис. 2.1. Схема расположения образцов и контролей на планшете

Отрицательный контроль (K-) культивировали в питательной среде без добавления препаратов и сыворотки эмбриональной телячьей, а положительный контроль (K+) – с добавлением 10% сыворотки эмбриональной телячьей.

Содержимое лунок тщательно пипетировали. Отмечали нужные участки зоны повреждения и фотографировали одни и те же участки сразу после постановки теста (0 часов) и спустя 24 часа культивирования. В каждой лунке фотографировали 2 поля зрения. Таким образом, выборка для положительного или отрицательного контроля была равна 6 полям зрения, а для исследуемых образцов – по 12 полей зрения для каждой из концентраций.

Измеряли площадь «раны» спустя 0 часов ( $B_i^0$ ) и 24 часа инкубирования ( $B_i^{24}$ ). Высчитывали среднее значение площади «раны» в момент нанесения царапины в образцах, а также в положительном и отрицательном контролях по формуле 2.1:

$$\overline{B_i^0} = \frac{\sum B_i^0}{n}, \quad (2.1)$$

где  $\overline{B}_i^0$  – среднее значение площади «раны» в момент нанесения царапины;

$\sum B_i^0$  – сумма всех площадей «раны» в момент нанесения царапины;

$n$  – количество исследуемых полей зрения.

Рассчитывали среднее значение площади «раны» для каждого образца, а также отрицательного и положительного контролей через 24 часа инкубирования по формуле 2.2:

$$\overline{B}_i^{24} = \frac{\sum B_i^{24}}{n}, \quad (2.2)$$

где  $\overline{B}_i^{24}$  – среднее значение площади «раны» спустя 24 часа инкубирования;

$\sum B_i^{24}$  – сумма всех площадей «раны» спустя 24 часа инкубирования;

$n$  – количество исследуемых полей зрения.

По формуле 2.3 рассчитывали отношение средней площади «раны» через 24 часа инкубирования к среднему значению площади «раны» через 0 часов инкубирования – «степень зарастания раны» для каждого образца ( $\overline{X}_{обp}$ ), а также отрицательного ( $\overline{X}_k$ ), и положительного контролей ( $\overline{X}_{k+}$ ):

$$\overline{X} = 100 - \left[ \frac{\overline{B}_i^{24}}{\overline{B}_i^0} \right] \times 100\%, \quad (2.3)$$

где  $\overline{X}$  – степень зарастания раны.

Рассчитывали регенеративную активность для каждого образца по отношению к отрицательному контролю по формуле 2.4:

$$A_k = \frac{\overline{X}_{обp} - \overline{X}_k}{\overline{X}_k} \cdot 100\%, \quad (2.4)$$

где  $A_k$  – регенеративная активность по отношению к отрицательному контролю;

$\bar{X}_{обр}$  – степень застания раны, рассчитанная для образца;

$\bar{X}_k$  – степень застания раны, рассчитанная для отрицательного контроля.

Исследуемые образцы считали эффективными, если степень регенеративная активность по отношению к отрицательному контролю была не менее 10%.

Фоторегистрацию осуществляли с помощью программы TourView 3.7, обработку изображений проводили с помощью приложения ImageJ 2 [66].

## 2.6. Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 10. Нормальность распределения данных определяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро-Уилка. Распределение считалось нормальным при  $p > 0,05$ .

Статистическую значимость отличий при нормальном или близком к нормальному распределении оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### 3. Полученные результаты и их обсуждение

#### 3.1. Получение и культивирование дермальных фибробластов крысы

На 1 пассаже культура ДФк представляла собой гетерогенную популяцию из клеток различных размеров и форм: малодифференцированные типы клеток – небольшого размера, с классической веретенообразной, или фибробластоподобной морфологией; зрелые фибробласты – более крупные, овальной, полигональной, веретеновидной или отростчатой формы как показано на рисунке 3.3.1 (А. Б. Шехтер, 1978).

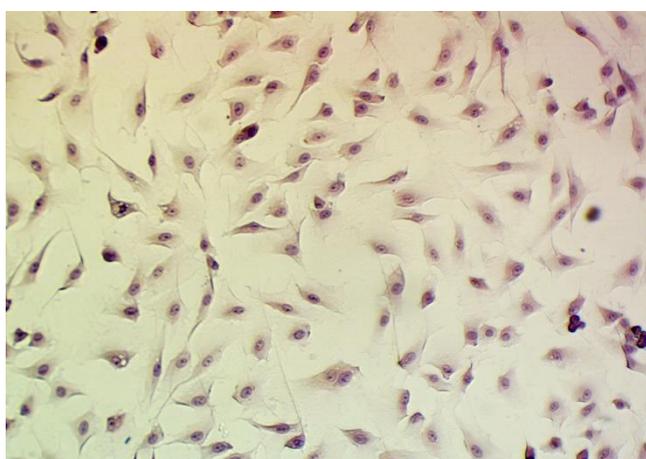


Рис. 3.1.1. Дермальные фибробласты крысы, 7 пассаж. Ядра окрашены гематоксилином, цитоплазма – эозином (x40)

При пассировании клеточная культура становилась более гомогенной, за счет активной пролиферации клеток одного типа. Уже к 3-4 пассажу клетки приобретали веретеновидную форму, располагались параллельными группами, направленными поточному росту фибробластов, как показано на рисунке 3.1.2.



Рис 3.1.2. Дермальные фибробласты крысы, при выполненном 100% конfluence, образуют «завитки» (x40)

На 3-4 пассаже культуру дермальных фибробластов криоконсервировали для создания клеточного банка. Жизнеспособность клеток после деконсервации составляла не менее 90%.

Культивировали фибробласты до 15 пассажей. На 12-13 пассаже в культуре увеличивалось число клеток с сильно гранулированной цитоплазмой, большая часть из них приобретала крупную полигональную форму. Так же снижалась пролиферативная активность – 100% конфлуент выполнялся за 5-7 суток.

Для постановки тестов «Модель раны» использовали культуру ДФк 4-11 пассажей. Изучение морфофункциональных характеристик дермальных фибробластов, культивируемых в присутствии исследуемых препаратов, показало, что на протяжении эксперимента клетки сохраняли типичную веретеновидную форму, формировали монослой в виде «завитков».

### **3.2. Выделение и культивирование клеток головного мозга крысы**

Клетки головного мозга крысы получали ферментативным способом из тканей головного мозга новорожденных крыс на 2-е и 3-и сутки после рождения. При этом использовали раствор трипсина в концентрациях 0,05; 0,1; 0,15 и 0,2%. В присутствии трипсина ткань инкубировали в течение 5, 10

и 15 мин. Как видно из таблицы 3.2.1 и таблицы 3.2.2. самая высокая жизнеспособность клеток при наиболее высоком выходе клеток достигалась при инкубации ткани головного мозга крысы в 0,1% раствором трипсина в течение 10 мин.

Таблица 3.2.1

Жизнеспособность клеток ткани головного мозга крысы после дезагрегации при использовании различной концентрации раствора трипсина и времени инкубации ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Концентрация трипсина, %	Время инкубации, мин		
	5	10	15
0,05	20,75±3,0%	24,75±2,37%	32,75±1,91%
0,1	31,75±3,57%	51,25±1,66%	38±2,36%
0,15	35±2,16%	43,5±1,8%	39,5±2,33%
0,2	47±1,25%	52,75±2,33%	33±1,7%

Таблица 3.2.2

Число клеток, полученных после дезагрегации ткани головного мозга крысы, при использовании раствора трипсина различной концентрации и разным времени инкубации ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Концентрация трипсина, %	Время инкубации, мин		
	5	10	15
0,05	0,08±0,02 × 10 <sup>-6</sup>	0,23±0,01 × 10 <sup>-6</sup>	0,33±0,01 × 10 <sup>-6</sup>
0,1	0,26±0,02 × 10 <sup>-6</sup>	0,57±0,03 × 10 <sup>-6</sup>	0,49±0,01 × 10 <sup>-6</sup>
0,15	0,25±0,02 × 10 <sup>-6</sup>	0,52±0,02 × 10 <sup>-6</sup>	0,51±0,02 × 10 <sup>-6</sup>
0,2	0,45±0,01 × 10 <sup>-6</sup>	0,5±0,02 × 10 <sup>-6</sup>	0,5±0,02 × 10 <sup>-6</sup>

КГМк культивировали в концентрациях 0,5-1×10<sup>6</sup> кл./мл в среде с сывороткой эмбриональной телячьей и без. Жизнеспособность клеток составляла не более 50%. При отсутствии сыворотки эмбриональной телячьей клетки не формировали агрегатов, оседали на поверхность подложки и не распластывались. Культура погибала в течение нескольких дней.

При посеве КГМк в среду с сывороткой эмбриональной телячьей, происходило формирование небольшого количества многоклеточных агрегатов, которые долго плавали во взвеси и, в конечном итоге, адгезировали к подложке (рис. 3.2.1).



Рис. 3.2.1. Формирование агрегатов клеток головного мозга крысы (14 ч культивирования, посевная концентрация  $0,7 \times 10^6$  кл./мл,  $\times 40$ )

После замены культуральной среды на следующий день, большая часть агрегатов удалялась. Помимо них, в суспензии присутствовали единичные клетки, которые практически сразу прикреплялись и распластывались на субстрате (рис. 3.2.2).

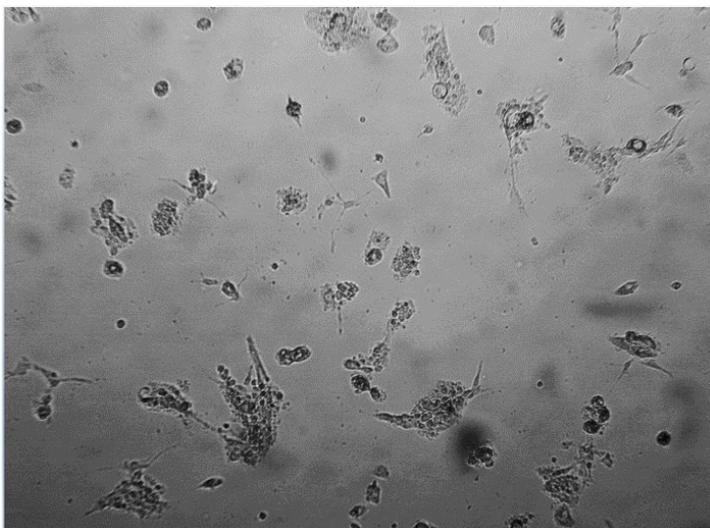


Рис. 3.2.2. Прикрепившиеся агрегаты КГМк после замены культуральной среды (14 ч культивирования, посевная концентрация  $0,7 \times 10^6$  кл./мл,  $\times 40$ )

Из прикрепившихся агрегатов происходила миграция клеток с глиеподобной морфологии (рис. 3.2.3).

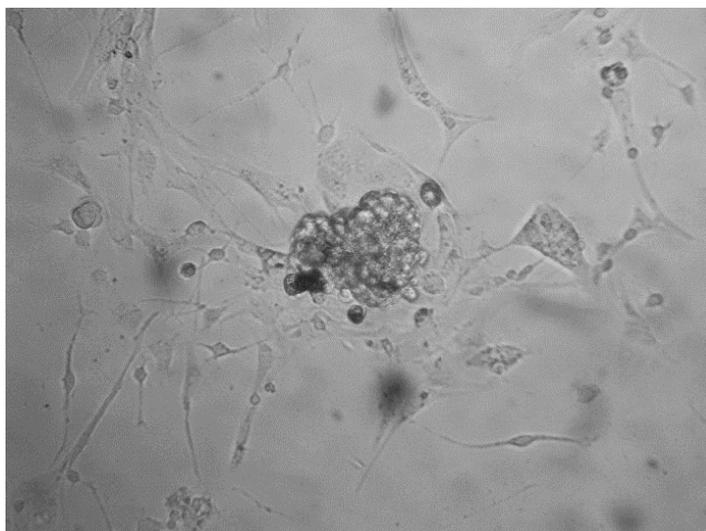


Рис. 3.2.3. Агрегат КГМк с мигрирующими из него клетками ( $\times 200$ )

На 3-и сутки культивирования агрегаты клеток головного мозга крысы разрастались и формировали многочисленные колонии, клетки в которых имели морфологию глии и нейронов (рис. 3.2.4).

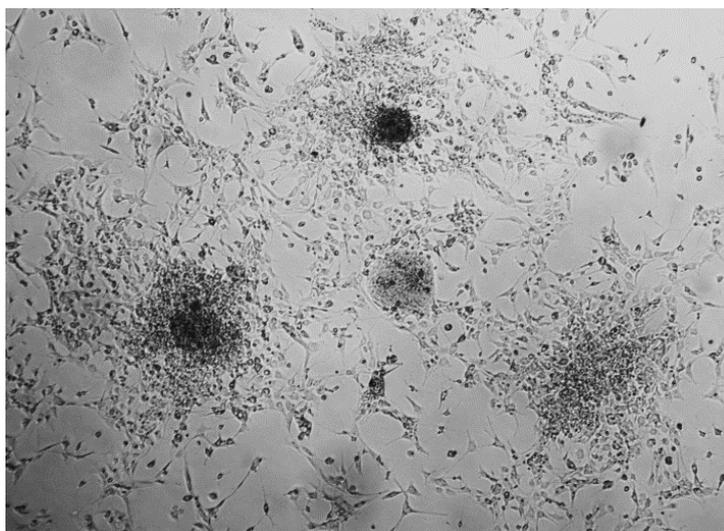


Рис. 3.2.4. Формирование агрегатами КГМк монослоя ( $\times 40$ )

На 5-10 сутки культивирования КГМк формировали 100% конфлуент, на котором появлялась обширная нейробластоподобная сеть (рис. 3.2.5).

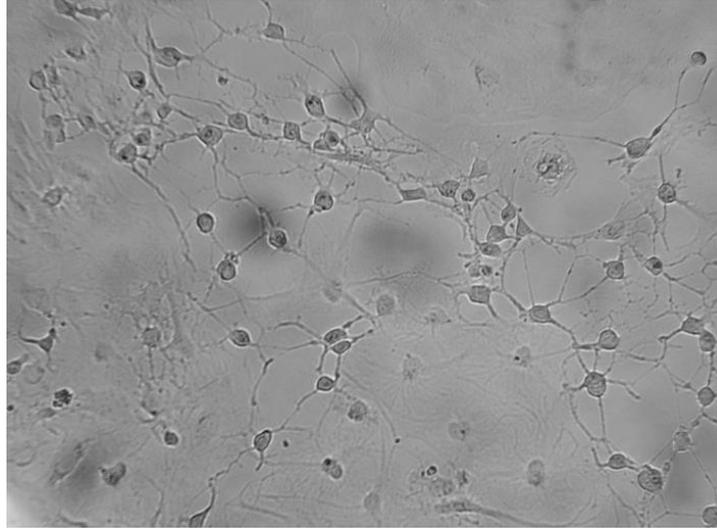


Рис. 3.2.5. Формирование сети нейробластоподобных клеток на 9 сутки культивирования КГМк (x40)

На 13-15 сутки культивирования нейробластоподобные клетки начинали исчезать. Однако, иммуноцитохимический анализ показал наличие в культуре  $\beta$ -III-тубулин-положительных клеток, которые сохранялись в культуре и на первом пассаже, хотя их число резко сокращалось (рис. 3.2.6).

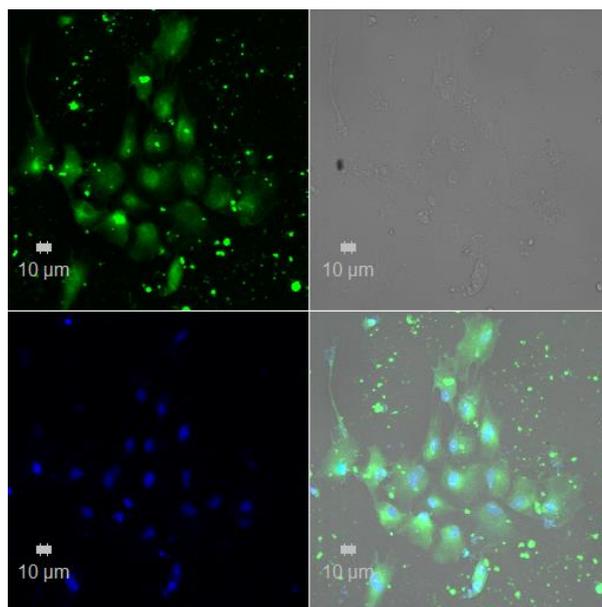


Рис. 3.2.6. Иммуноцитохимическое окрашивание КГМк: зеленое свечение – специфический белок нервных клеток  $\beta$ -III-тубулин (Alexa Fluor 488); синее свечение – ядра клеток (DAPI). (x100)

Культура КГМк могла находиться на подложке более 20 суток без пассирования, при этом она оставалась гетерогенной – присутствовали нейроподобные клетки, а также крупные клетки глиальной морфологии.

При пересеве КГМк жизнеспособность клеток составляла до 40-45%. В культуре на 1-м, 2-м и 3-м пассажах присутствовали только клетки, имеющие глиальную морфологию. Конфлюент такая культура выполняла за 4-6 дней.

Жизнеспособность КГМк до криоконсервации составляла не более 45%, однако после деконсервации – не более 15%. Культивирование свежеразмороженной культуры сопровождалось формированием агрегатов, которые не прикреплялись к подложке и погибали. При этом небольшое количество единичных клеток оседали, прикреплялись и распластывались, приобретая при этом глиальную морфологию. Такая культура не была способна формировать монослой и вскоре погибала.

Для определения регенеративной активности исследуемых препаратов использовали КГМк 1 пассажа.

### **3.3. Изучение активности первичных культур дермальных фибробластов и клеток головного мозга крысы под влиянием регенеративных препаратов**

#### **3.3.1. Особенности перемещения первичных культур дермальных фибробластов и клеток головного мозга крысы**

Регенеративную активность оценивали на модели механического повреждения монослойной культуры ДФк и КГМк. Изменения в количестве клеток в «ране», их местоположение и форму фиксировали с помощью цифровой фотокамеры сразу после постановки эксперимента и спустя 24 часа.

При анализе полученного материала видно, что культуры клеток принципиально различаются между собой по миграционному поведению.

Края царапины в культуре КГМк смыкаются посредством массовой миграции клеток. Клетки переднего края тянут за собой остальную монослой, клетки которого находятся в плотном контакте друг с другом. Можно предположить, что помимо миграции клеток, сближение краев «раны» происходит за счет пролиферативной активности КГМк, когда более мелкие клетки перемещаются в царапину, увеличиваются в размерах и примыкают к монослою (рис. 3.3.1.1).

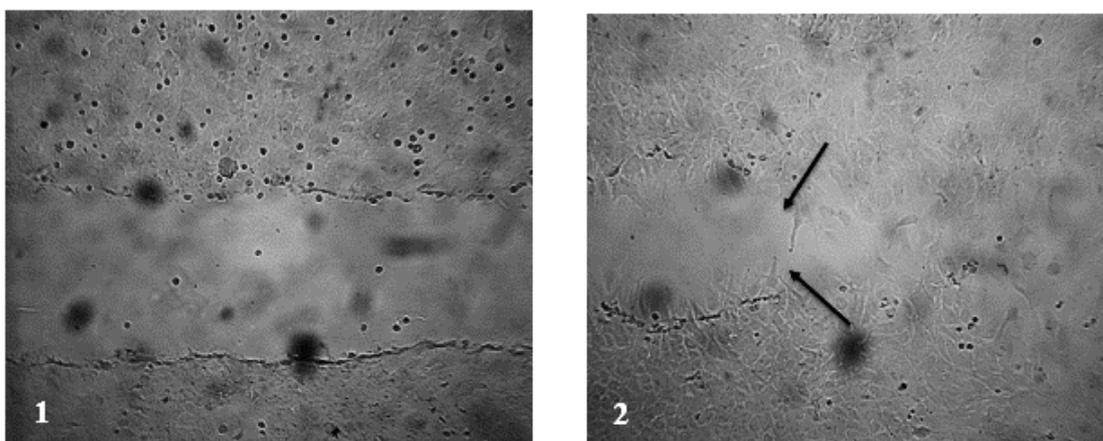


Рис. 3.3.1.1. Регенеративная активность КГМк: 1 – «рана» спустя 0 ч культивирования; 2 – царапина спустя 24 ч, процесс заполнения царапины клетками (x40)

В культуре дермальных фибробластов крысы движение клеток сопровождается дезинтеграцией клеточного монослоя по краям «раны», миграцией и делением клеток в свободное пространство. При этом можно отметить образование клетками псевдоподий и цитоплазматических образований, которые вытягиваются из клеток в начале их передвижения, предположительно, из-за их высокой адгезивности (рис. 3.3.1.2).

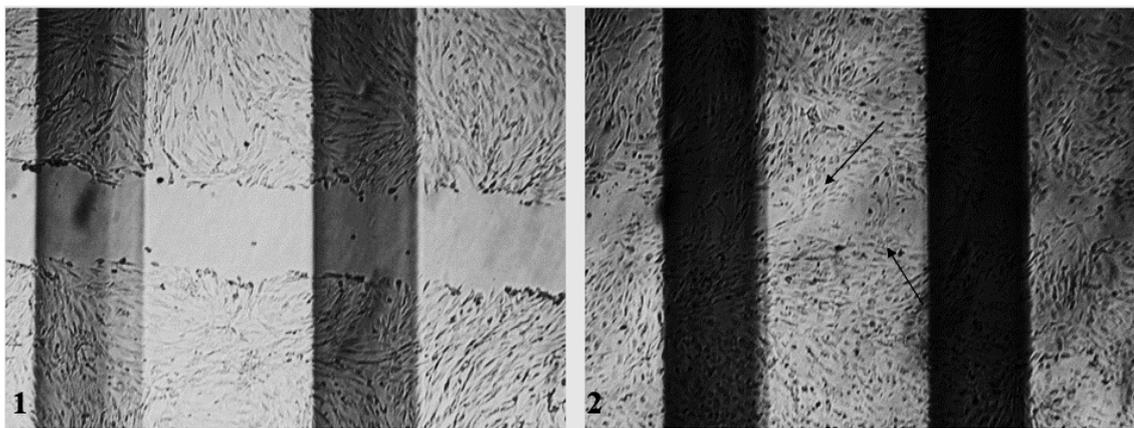


Рис. 3.3.1.2. Регенеративная активность ДФК: 1 – «рана» спустя 0 ч культивирования; 2 – царапина спустя 24 ч, процесс заполнения царапины клетками (x40)

### 3.3.2. Регенеративная активность дермальных фибробластов крысы под влиянием биологических препаратов

Известно, что сыворотка эмбриональная телячья является источником различных факторов для клеточных культур – трофических, факторов роста, адгезии, пролиферации и миграции [98]. В экспериментальной работе положительный контроль содержал 10% сыворотки эмбриональной телячьей, которая оказывала стимулирующий эффект на обе культуры. Площадь просвета «раны» через 24 часа инкубации сокращалась на  $98,8 \pm 0,3\%$  для ДФК и на  $98,6 \pm 0,5\%$  для КГМ крысы. Тем самым, различия активной способности исследуемых первичных культур недостоверны ( $p > 0,05$ ).

Динамика зарастания отрицательного контроля, который содержал только питательную среду, для ДФК составляла  $48 \pm 2,5\%$ , а для КГМ крысы –  $41 \pm 1,9\%$  спустя 24 часа культивирования. В условиях недостатка ростовых факторов миграционная и пролиферативная способности дермальных фибробластов выше, чем клеток головного мозга крысы в **1,2 раза** ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, заселяющая активность ДФК и КГМ крысы при наличии ростовых факторов в среде (сыворотки эмбриональной телячьей) превосходит отрицательный контроль в 2,1 и 2,4 раз соответственно ( $p < 0,05$ ).

Обе первичные культуры имеют практически одинаковые миграционную и пролиферативную активности.

Исследовали регенеративную активность ДФК и КГМ крысы под влиянием препаратов UltraCell-Dog и Кортексин при разведениях 1:100 (1%), 1:1000 (0,1%) и 1:10000 (0,01%)

Препарат UltraCell-Dog является полипептидным средством, биологического происхождения, содержащим различные факторы: цитокины, ростовые факторы, хемокины и др. В организме животных и человека такие факторы способны запускать регенеративные процессы, одним этапом из которых является перемещение клеток в патологические участки [67, 68, 69].

Динамика заращения «раны» в отрицательном контроле в 1,7 раз ниже, чем в положительном ( $99 \pm 0,54\%$ ) и составляет  $58 \pm 1,69\%$  ( $p < 0,05$ ). Данные по миграционной и пролиферативной активности ДФК под влиянием препарата UltraCell-Dog представлены в таблице 3.3.2.1.

Таблица 3.3.2.1.

Средние значения площади «раны» дермальных фибробластов под влиянием препарата UltraCell-Dog спустя 0 и 24 ч инкубации ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Образец	Площадь царапины, спустя 0 ч инкубации	Площадь царапины, спустя 24 ч инкубации
Отрицательный контроль (К-)	$525,87 \pm 78,91$ рх	$219,97 \pm 34,77$ рх
Положительный контроль (К+)	$503,73 \pm 72,76$ рх	$7,4 \pm 3,93$ рх
1% препарата	$539,71 \pm 64,23$ рх	$88,78 \pm 28,83$ рх
0,1% препарата	$543,19 \pm 64,25$ рх	$109,2 \pm 34,78$ рх
0,01% препарата	$541,53 \pm 73,99$ рх	$119,08 \pm 34,69$ рх

Отмечен стимулирующий эффект перемещения ДФК, культивируемых в присутствии препарата UltraCell-Dog в исследуемых разведениях (рис 3.3.2.1.).

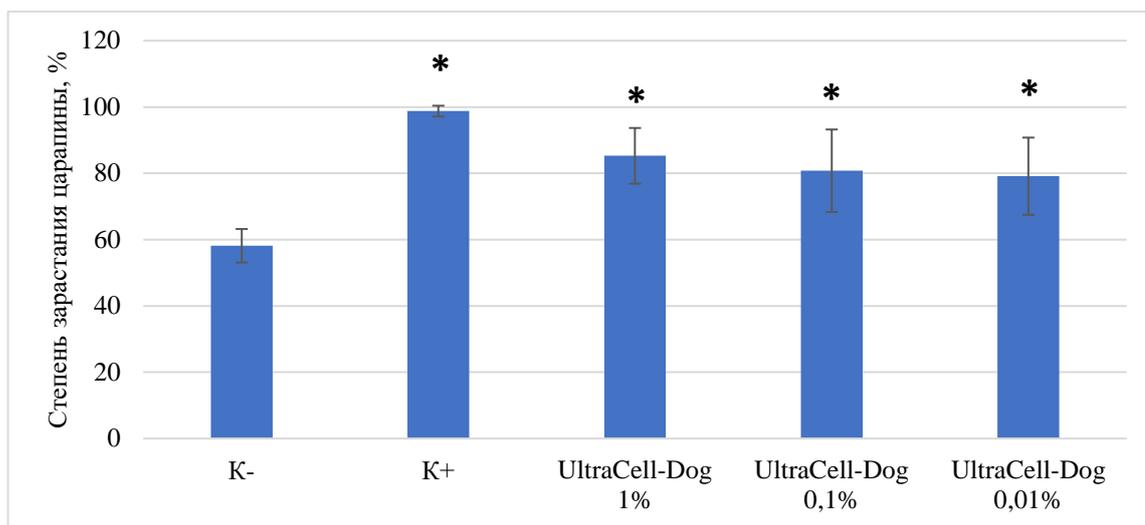


Рис. 3.3.2.1. Степень заращения «раны» дермальных фибробластов крысы под влиянием препарата UltraCell-Dog, (\* отличия статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (ANOVA),  $p < 0,05$ )

Так, степень заращения царапины при разведении препарата до 1%, 0,1% и 0,01% составила  $85 \pm 2,8\%$ ,  $81 \pm 4,15\%$  и  $79 \pm 3,88\%$  соответственно. Отличия миграционной и пролиферативной активности ДФК под влиянием препарата UltraCell-Dog в исследуемых концентрациях статистически достоверны по отношению к отрицательному контролю. Таким образом, препарат способен оказывать стимулирующий регенерирующий эффект на первичную культуру фибробластов крысы, даже при малом разведении – 1:10000.

Однако статистической разницы между исследуемыми концентрациями препарата нет – регенеративная активность UltraCell-Dog во всех разведениях практически одинакова и составляет  $45 \pm 4,82\%$  при разведении 1:100,  $38 \pm 7,13$  при разведении 1:1000 и  $36,1 \pm 6,67$  при разведении 1:10000 (рис 3.3.2.2).

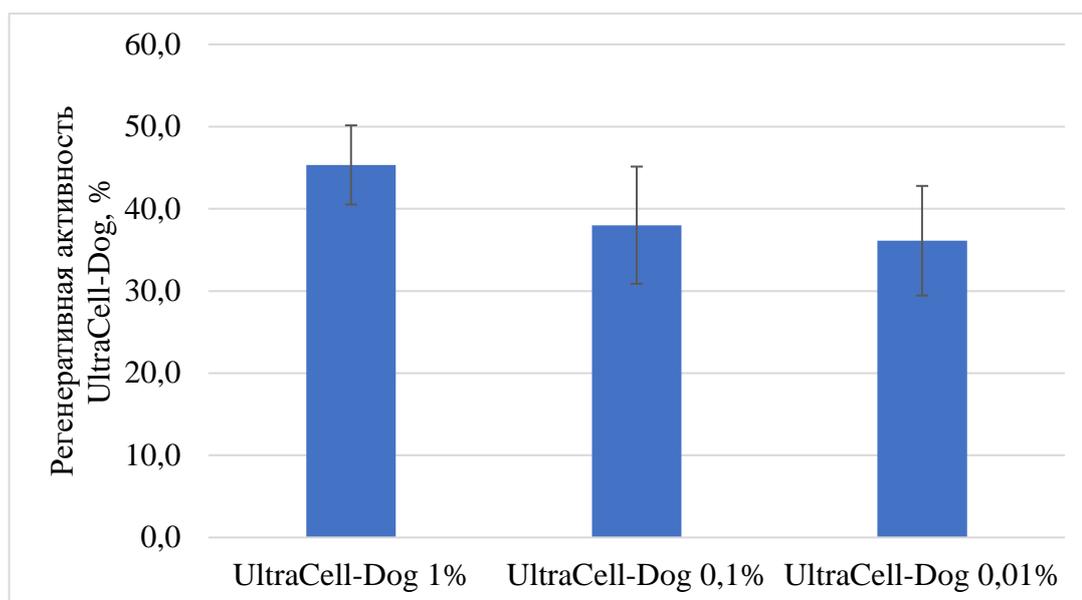


Рис. 3.3.2.2. Регенеративная активность UltraCell-Dog, полученная на культуре ДФК (\* отличия статистически значимы по отношению всех исследуемых концентраций друг к другу (ANOVA),  $p < 0,05$ )

При изучении влияния Кортексина на миграцию и пролиферацию ДФК, была отмечена позитивная динамика. Через 24 ч часа площадь царапины в положительном контроле сократилась на  $99 \pm 0,51\%$ , тогда как в отрицательном – на  $38 \pm 1,44$ . Влияние препарата на динамику заращения царапины в культуре ДФК представлена в таблице 3.3.2.2.

Таблица 3.3.2.2.

Средние значения площади «раны» дермальных фибробластов крысы под влиянием препарата Кортексин спустя 0 и 24 ч инкубации ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Образец	Площадь царапины, спустя 0 ч инкубации	Площадь царапины, спустя 24 ч инкубации
Отрицательный контроль (К-)	$389,70 \pm 32,91$ рх	$242,87 \pm 22,84$ рх
Положительный контроль (К+)	$351,38 \pm 39,00$ рх	$5,18 \pm 2,25$ рх
1% препарата	$360,27 \pm 27,04$ рх	$188,69 \pm 16,18$ рх
0,1% препарата	$369,66 \pm 29,65$ рх	$213,19 \pm 17,38$ рх
0,01% препарата	$363,84 \pm 44,94$ рх	$200,72 \pm 33,82$ рх

Степени заращения «раны» под влиянием Кортексина статистически значимы в концентрациях 1% и 0,1% и составили  $36\pm 2\%$  и  $21\pm 1,73\%$  соответственно по отношению к отрицательному контролю (рис. 3.3.2.3.).

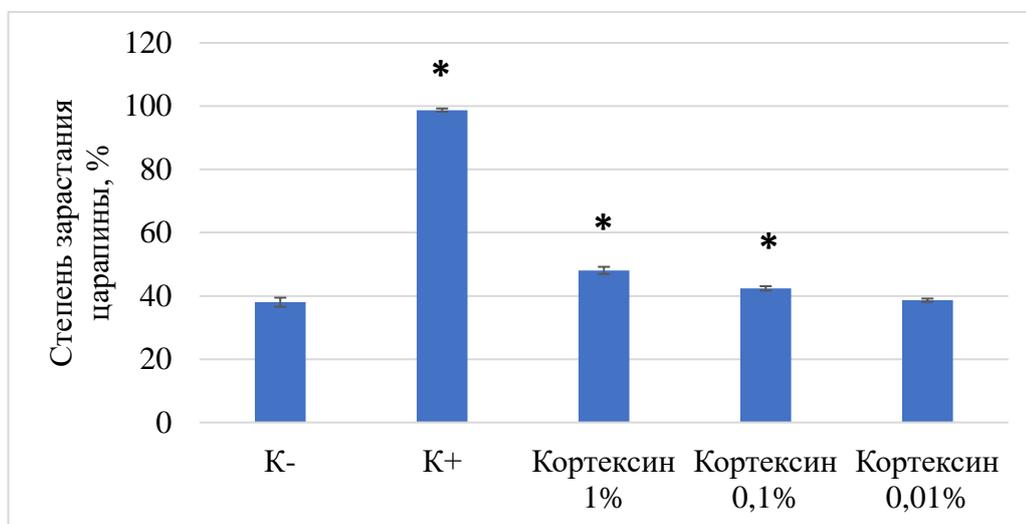


Рис. 3.3.2.3. Степень заращения «раны» дермальных фибробластов крысы под влиянием препарата Кортексин (\* отличия статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (ANOVA),  $p < 0,05$ )

Регенеративная активность Кортексина между исследуемыми концентрациями статистически не значима и составляет  $36\pm 2\%$  при разведении 1:100,  $21\pm 1,73\%$  при разведении 1:1000 и  $11\pm 1,33\%$  при разведении 1:10000 (рис. 3.3.2.4).

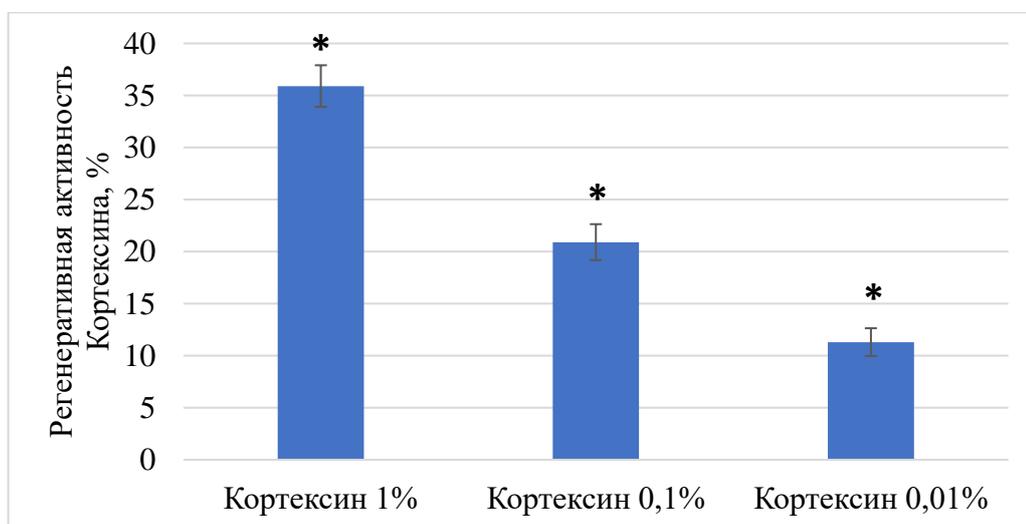


Рис. 3.3.2.4. Регенеративная активность Кортексина, полученная на культуре ДФК (\* отличия статистически значимы по отношению всех исследуемых концентраций друг к другу (ANOVA),  $p < 0,05$ )

Оба препарата оказывают стимулирующий эффект на дермальные фибробласты. Однако такой эффект среди исследуемых препаратов был неодинаков. Так, степень зарастания царапины под влиянием UltraCell-Dog была выше в 1,3 раза при разведении препарата 1:100, в 1,8 раз – при разведении препарата 1:1000 и в 3,3 раза при разведении препарата 1:10000 по отношению к Кортексину в аналогичных концентрациях. Стоит отметить, что Кортексин в концентрации 0,01% оказывает низкий стимулирующий эффект на перемещение клеток в культуре дермальных фибробластов крысы ( $11 \pm 1,33\%$ ).

### **3.3.3. Влияние биофармацевтических препаратов на миграционную и пролиферативную активности клеток головного мозга крысы**

Постановка эксперимента для определения регенеративной активности КГМ крысы под влиянием биологических препаратов проводили аналогично культуре ДФК.

Спустя сутки инкубации КГМ крысы была отмечена отличная динамика зарастания царапины в положительном контроле –  $100 \pm 0,08\%$ , тогда как в отрицательном она составила  $45 \pm 3,47\%$ , что в 2,2 раза меньше. Значимые различия по отношению к отрицательному контролю были обнаружены при культивировании КГМ в присутствии UltraCell-Dog во всех разведениях препарата (таблица 3.3.3.1).

Таблица 3.3.3.1.

Средние значения площади «раны» клеток головного мозга крысы под влиянием препарата UltraCell-Dog 0 и 24 ч инкубации ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Образец	Площадь царапины, спустя	Площадь царапины, спустя
---------	--------------------------	--------------------------

	0 ч инкубации	24 ч инкубации
Отрицательный контроль (К-)	272,93±20,46 рх	149,95±16,10 рх
Положительный контроль (К+)	270,29±13,42 рх	0,17±0,18 рх
1% препарата	319,88±14,61 рх	104,27±5,39 рх
0,1% препарата	310,16±3,20 рх	118,23±2,88 рх
0,01% препарата	304,91±7,39 рх	134,43±2,63 рх

Степень зарастания царапины увеличивалась от 45±3,47% (отрицательный контроль) до 67±1,45%, 62±1,13% и 56±0,6% в разведениях препарата 1:100, 1:1000 и 1:10000 соответственно (рис. 3.3.3.1).

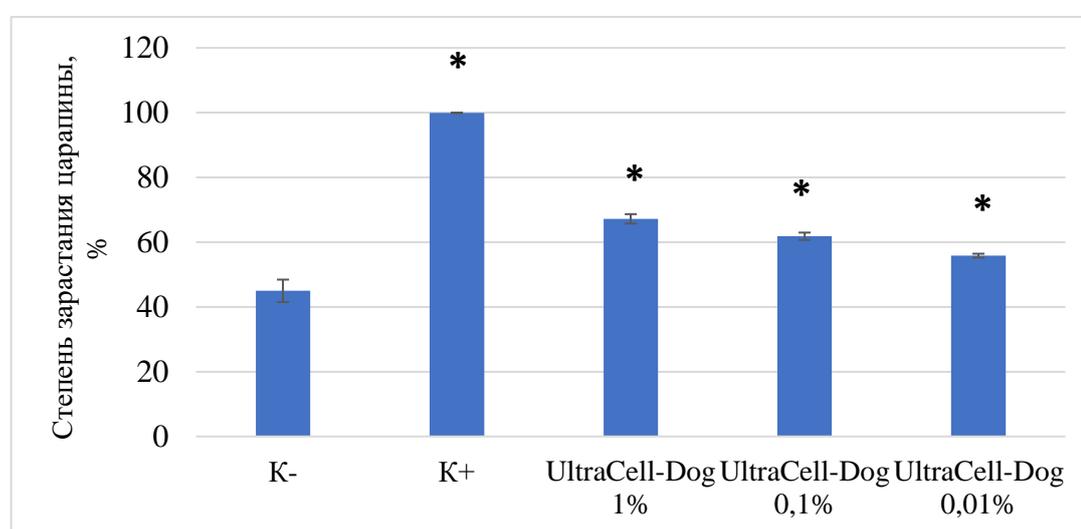


Рис. 3.3.3.1. Степень зарастания «раны» КГМк под влиянием препарата UltraCell-Dog (\* отличия статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (ANOVA),  $p < 0,05$ )

Различные разведения препарата UltraCell-Dog неодинаково влияют на миграционную и пролиферативную активность КГМ крысы. (рис. 3.3.3.2).

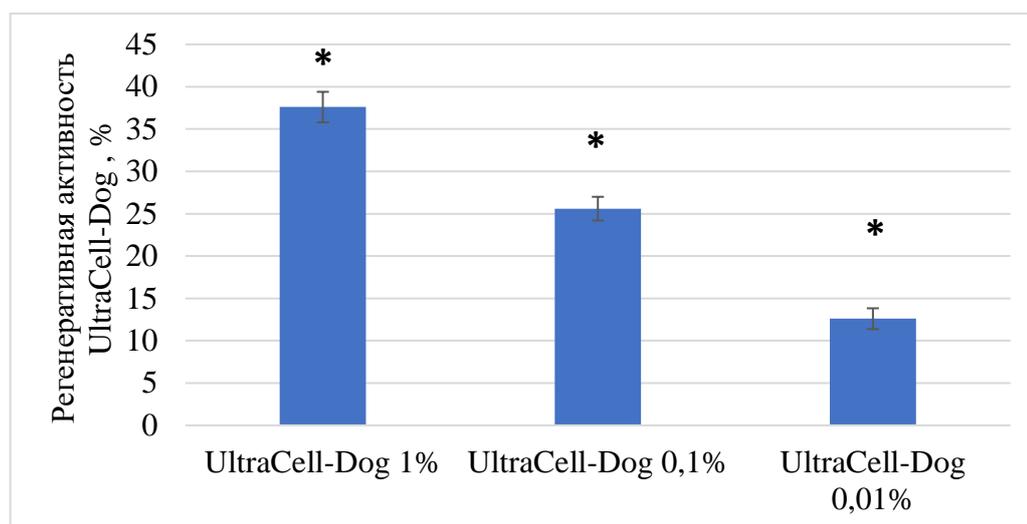


Рис. 3.3.3.2. Регенеративная активность UltraCell-Dog, полученная на культуре КГМк (\* отличия статистически значимы по отношению всех исследуемых концентраций друг к другу (ANOVA),  $p < 0,05$ )

Так, чем выше концентрация препарата в питательной среде, тем выше миграционная и пролиферативная активность клеток. Регенеративная активность UltraCell-Dog при разведении 1:100 в 1,5 и в 2,9 раза выше, чем при разведении 1:1000 и 1:10000 соответственно. Базовая среда, содержащая 0,1% препарата, способствует заполнению царапины клетками в 2 раза эффективней, чем 0,01%

При наличии сыворотки эмбриональной телячьей степень зарастания «раны» составляет  $97 \pm 0,89\%$  (положительный контроль). Тогда как отрицательный контроль в 2,6 раз меньше –  $37 \pm 0,95\%$ . В разведениях 1:100, 1:1000 и 1:10000 наблюдалось стимулирующее действие препарата Кортексин на миграцию и пролиферацию клеток (таблица 3.3.3.2).

Таблица 3.3.3.2.

Средние значения площади «раны» клеток головного мозга крысы под влиянием препарата Кортексин 0 и 24 ч инкубации ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Образец	Площадь царапины, спустя 0 ч инкубации	Площадь царапины, спустя 24 ч инкубации
Отрицательный контроль (К-)	$302,44 \pm 15,25$ рх	$189,55 \pm 7,82$ рх

Положительный контроль (К+)	304,11±16,08 рх	7,44±2,29 рх
1% препарата	311,98±19,72 рх	148,74±6,93 рх
0,1% препарата	310,26±13,68 рх	165,39±6,67 рх
0,01% препарата	305,86±11,79 рх	184,03±6,50 рх

Степень зарастания царапины КГМ крысы, в условиях культивирования клеток с Кортексином в концентрации 1%, составляла  $52 \pm 1,32$ , для 0,1% –  $47 \pm 1,14\%$  и для 0,01% –  $40 \pm 0,54\%$ . При этом отрицательный контроль спустя 24 часа выполнил конфлуент «раны» на  $37 \pm 0,89\%$  (рис. 3.3.3.3.)

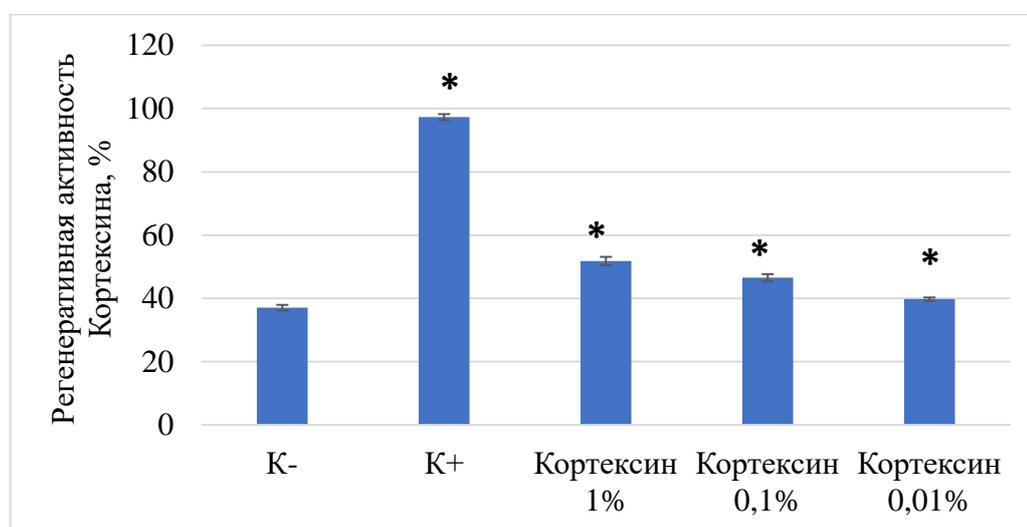


Рис. 3.3.3.3. Степень зарастания «раны» КГМк под влиянием препарата Кортексин (\* отличия статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (ANOVA),  $p < 0,05$ )

Эффективность препарата по отношению к отрицательному контролю статистически значима во всех разведениях. При этом прослеживается тенденция повышения миграционной и пролиферативной эффективности клеток к повышению содержания препарата в базовой среде (рис. 3.3.3.4.).

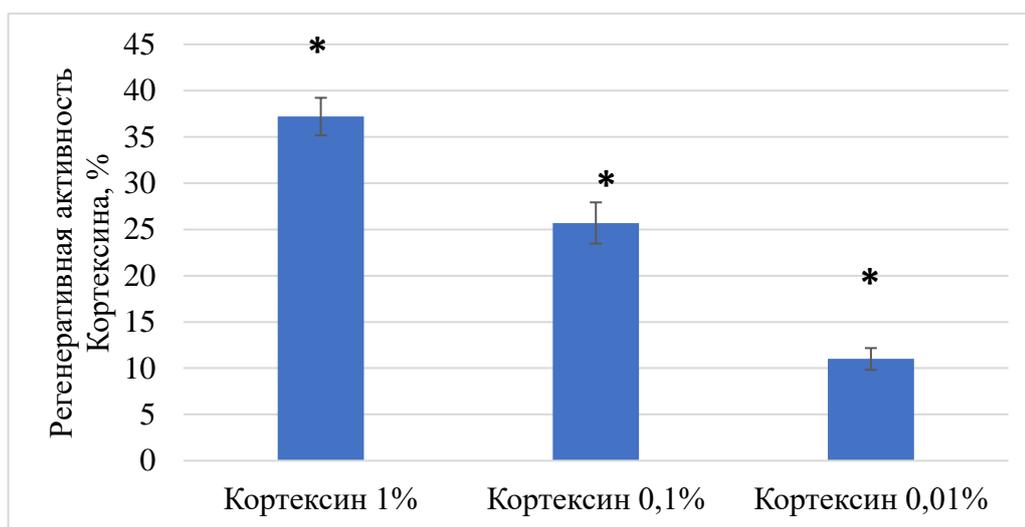


Рис. 3.3.3.4. Регенеративная активность Кортексина, полученная на культуре КГМк (\* отличия статистически значимы по отношению всех исследуемых концентраций друг к другу (ANOVA),  $p < 0,05$ )

При этом стимулирующее действие между разными концентрациями Кортексина достоверно отличается. Для 1% и 0,1% концентрации препарата эффективность составила  $37,2 \pm 2,03\%$  и  $25,7 \pm 2,23\%$  соответственно.

При разведении 1:10000 Кортексин оказывает низкий стимулирующий эффект на первичную культуру клеток головного мозга крысы, который составил  $11 \pm 1,18\%$

В целом, препараты UltraCell-Dog и Кортексин оказывают активный стимулирующий эффект на культуру клеток головного мозга крысы.

При этом миграционная и пролиферативная активность клеток головного мозга крысы под влиянием препаратов UltraCell-Dog и Кортексина не отличается. Так, регенеративная активность UltraCell-Dog при разведении 1:100 составила  $38 \pm 1,8\%$ , при разведении 1:1000 –  $26 \pm 1,4\%$ , при разведении 1:10000 –  $13 \pm 1,23\%$ . Аналогичное действие Кортексина в тех же разведения соответственно равнялось  $37,2 \pm 2,03\%$ ,  $25,7 \pm 2,23\%$  и  $11 \pm 1,18\%$ .

Таким образом, стимулирующее действие UltraCell-Dog и Кортексина на миграционную и пролиферативную активность клеток дермальных фибробластов и клеток головного мозга крысы обусловлено действием как

отдельных компонентов препаратов, так и их совокупности. Нарушение баланса секреции цитокинов, хемокинов, факторов роста в патологическом участке может привести к замедлению или даже нарушению процессов заживления. Такой баланс возможно восполнить с помощью биологических препаратов, одним из которых является UltraCell-Dog, содержащий «природный коктейль» ростовых факторов, веществ аутокринной и паракринной регуляции.

Исследуемые образцы во всех разведениях не оказывали цитопатологического эффекта на первичные культуры клеток головного мозга и дермальные фибробласты крысы. Морфология клеток, инкубируемых в среде с препаратами, была аналогичной клеткам, культивируемым в положительном и отрицательном контролях. Отсутствовали цитоплазматические грануляция и васкуляризация, клетки содержали одно ядро.

Применение препаратов UltraCell-Dog и Кортексина во всех разведения оказывало стимулирующий эффект на степень застания царапины в первичных культурах клеток головного мозга и дермальных фибробластов крысы. Поскольку показатель степени застания «раны» суммарно отражает как миграцию клеток, так и их пролиферацию, трудно с уверенностью сказать, на какой из процессов в большей степени воздействуют препараты. Это требует дополнительных исследований.

В нашем исследовании дермальные фибробласты крысы под влиянием UltraCell-Dog показали наибольшую регенеративную активность, при том, что концентрация препарата не влияла на проявление стимулирующего эффектаДФК (рис. 3.3.2.2.). Тогда как дермальные фибробласты под действием Кортексина и на клетки головного мозга крысы в присутствии обоих препаратов такой эффект не оказывали. Это может быть связано с тем, что клетки дермальных фибробластов содержат чувствительные к компонентам препарата UltraCell-Dog рецепторы, из-за чего большое количество молекул препарата в окружающейДФК среде не имеет особого значения. Отсюда

следует, что препарат UltraCell-Dog, как указано в инструкции, эффективен при терапии кожных заболеваний неинфекционной природы.

Стимулирующее действие UltraCell-Dog на КГМ крысы, а также Кортексина на КГМ крысы иДФК на заращание просвета «раны» имеет одинаковую тенденцию: регенеративную активность тем выше, чем меньше разведение препарата. Это может быть связано с тем, что чувствительность клеток к компонентам препарата невысокая, в результате чего клетки используют эти факторы как трофические, для поддержания пролиферации и миграции.

Кроме того, наименьшую регенеративную активность проявляют препараты при разведении 1:10000: UltraCell-Dog на клетки головного мозга крысы, а Кортексин на клетки головного мозга крысы и дермальные фибробласты крысы. Это, вероятно, опосредовано низким содержанием активирующих факторов в среде культивирования.

Кортексин проявляет одинаковый стимулирующий эффект на клетки обеих первичных культур.

## Заключение

1. Отработана методика получения культуры ДФК по ранее разработанным методикам других авторов.

Для получения клеток головного мозга крысы была проведена серия экспериментов, в результате которых был отработан способ выделения клеток, при котором самая высокая жизнеспособность при наиболее высоком выходе клеток достигалась при инкубации ткани головного мозга крысы в 0,1% раствором трипсина в течение 10 мин.

2. Культура ДФК имеет типичную веретенообразную форму практически на всем протяжении ее культивирования. Культура клеток головного мозга крысы имеет гетерогенную структуру. В ней встречаются клетки нескольких типов: веретенообразные, нейроподобные и глиеподобные.

Морфология клеток, инкубируемых в среде с препаратами, была аналогичной клеткам, культивируемым в положительном и отрицательном контролях. Отсутствовали цитоплазматические грануляции и васкуляризация, клетки содержали одно ядро.

3. Заполнение царапины в культурах происходит по-разному. Мелкие клетки культуры клеток головного мозга крысы перемещаются в царапину, увеличиваются в размерах и примыкают к монослою. Движение клеток дермальных фибробластов крысы сопровождается дезинтеграцией клеточного монослоя по краям «раны» и миграцией клеток в свободное пространство.

Применение препаратов UltraCell-Dog и Кортексина во всех разведениях оказывало стимулирующий эффект на степень застания царапины в первичных культурах клеток головного мозга и дермальных фибробластов крысы.

4. Регенеративная активность препарата UltraCell-Dog показала наибольший эффект на культуре ДФК, при том, что концентрация препарата не влияла на проявление стимулирующего эффекта ДФК. Стимулирующее действие UltraCell-Dog на КГМ крысы, а также Кортексина на КГМ крысы и

ДФК на зарастание просвета «раны» имеет одинаковую тенденцию: регенеративная активность тем выше, чем меньше разведение препарата. Кроме того, наименьшую эффективность проявляют препарат UltraCell-Dog на клетки головного мозга крысы, а также Кортексина на КГМ крысы и дермальные фибробласты крысы при разведении 1:10000.

### Список использованной литературы:

1. Аутологичные фибробласты кожи стимулируют восстановление дегенеративно-измененных ахилловых сухожилий / Волкова Н. А., Юхта М. С., Блонский Р. И., Коструб А. А., Гольцев А. Н. // Гены и Клетки. 2014. Т. 6, №1. С. 35-40.
2. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. - М.: «Медицина», 1972. 264 с.
3. Ашмарин И. П., Каразеева Е. П. Нерохимия. М.: Изд-во института Биомедицинской химии РАМН, 1996. 469 с.
4. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты / Издательство Н-Л, СПб, 2007. 640 с.
5. Биологически активный препарат «лимфокинин», обладающий иммуномодулирующими свойствами: патент 2048816, Российская Федерация № 93031657/14 / Быковская С. Н., Шадрин О. В., Дворянченко Д. Ю.; заявл. 06.07.1993; опубл. 27.11.1995; Доступ из библиотеки патентов на изобретения «Freepatent». Источник: <http://www.freepatent.ru/patents/2048816>.
6. Вайнсон А. А., Мещерикова В. В. Методика оценки специфической активности генноинженерного филграстима (Г-КСФ), интерферонов а, в и соматотропина на клетках *in vitro* // Российский биотерапевтический журнал : теоретический и научно-практический журнал. 2012. Т. 11, №3. С. 29-32.
7. Васильев А. В., Воротеляк Е. А., Терских В. В. Ниши стволовых клеток и регенеративная медицина // Российский физиологический журнал. 2016. № 103 (3). С. 241-261.
8. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивные функции крыс после ишемического инсульта / Соколова И. Б., Федотова О. Р., Зинькова Н. Н., Кругляков П. В., Полынцев Д. Г. // Клет. технол. в биологии и медицине. 2006. №4. С. 202-205.

9. Возможная роль транстиретина в биологическом механизме пептидной нейропротекции / Вьюнова Т. В., Медведева Е. В., Андреева Л. А., Дергунова Л. В., Лимборская С. А., Мясоедов Н. Ф. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. Т. 34, № 3. С. 104-109.
10. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте / Соколова И. Б., Зинькова Н. Н., Билибина А. А., Кругляков П. В., Гилерович Е. Г., Полынцев Д. Г., Отеллин В. А. // Гены и Клетки. 2007. Т. 3, №4, С. 54-62.
11. Глаголева И. С., Плотникова Э. М. Возможность применения первичных культур клеток почек новорожденных крольчат в производстве вакцинных препаратов // Гены и Клетки. 2014. Т. 9, №3-2. С. 151-154.
12. Глушкова Т. Г., Титова И. В. Опыт моделирования спинальных травм и лечения их с помощью мезенхимальных стволовых клеток. // Вестник Новгородского Государственного университета. 2016. №6 (97). С. 136-138.
13. Гомазков О. А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга. М.: Издательство ИКАР. 2006. 332 с.
14. Данченко Е. О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. № 2. С. 22-31.
15. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи / Зорин В. Л., Зорина А. И., Петракова О. С., Черкасов В. Р. // Гены и Клетки. 2009. №4. С. 26-40.
16. Децина А. Н., Мартынец Л. Д. Выбор клеточной тест-системы для оценки сырья в производстве косметических и некоторых лекарственных средств // Цитология. 2001, Т.43, №9. С 855.
17. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроцитов эмбрионов человека / Зозуля Ю. А., Лисяный Н. И., Любич Л. Д., Грищенко В. И., Петренко А. Ю., Бабийчук Г. А. // Український нейрохірургічний журнал. 2003. № 2. С. 11-14.

18. Еропкин М. Ю., Еропкина Е. М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. - СПб.: Морсар АВ, 2003. 239 с.
19. Залуцкий И., Пашкевич С., Казбанов В. Биоэтика с позиций современных биомедицинских исследований // Наука и инновации. 2012. № 7. С. 22-24.
20. Зыкова Е. В., Зайцев Е. Г., Перфилова В. Н. Оптимизация протокола выделения первичных фибробластов из различных тканей крыс // Сборник научных трудов: Наука в современном мире: приоритеты развития. 2015. № 1. С. 3-5.
21. Иллариошкин С. Н. Влияние геномного редактирования клеток на результаты нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме // Современные технологии в медицине. 2017, Т.9, № 4, С. 7-14.
22. Интраназальные ингаляции биоактивных факторов, продуцируемых М2-макрофагами, в лечении больных с органическими поражениями головного мозга / Останин А. А., Давыдова М. Н., Старостина Н. М., Сахно Л. В., Шевела Е. Я., Черных Е. Р. // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 4, С. 577-588.
23. Исследование иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro* /Айзенштадт А. А., Смолянинов А. Б., Багаева В. В., Супильникова О. В., Смирнова С. А., Самойлович М. П., Климович В. Б. // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2013. Т. 8, №2. С. 659-660.
24. Калинина Н. И., Сысоева В. Ю. Рубина К. А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // Acta Naturae. 2011. Т.3, №4. С. 32-39
25. Канунникова, Н. П. Нейропротекторные свойства нейропептидов / Н. П. Канунникова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2017. - т. 15, № 5. - с. 492-498

26. Клеточная терапия болезни Паркинсона: достижения и перспективы / Юркевич М. Ю., Зафранская М. М., Пономарев В. В., Бойко А. В., Алейникова Н. Е. // Международный неврологический журнал. 2017. № 4 (90). С. 93-101.

27. Клеточная терапия при травмах спинного мозга. / Воронова А. Д., Степанова О. В., Чадин А. В., Решетов И. В., Чехонин В. П. // Вестник РАМН. 2016. №71(6). С. 420-426

28. Колокольцова Т. Д, Сабурин И. Н, Кубатиев А. А. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль. // Патогенез 2015. №13(2). С. 50-65.

29. Кондиционная среда, обладающая лечебным эффектом: патент 2292212 Российская Федерация, № 2005116811/15 / Колесникова А. И., Саенко А. С., Бардычев М. С., Пасов В. В., Курпешева А. К., Крикунова Л. И.; заявл. 02.06.2005 ; опубл. 27.01.2007; Доступ из библиотеки патентов на изобретения «Freepatent». Источник: <http://www.freepatent.ru/patents/2292212>.

30. Коробейникова Е. П., Комарова Е. Ф. Лабораторные животные - биомодели и тест-системы в фундаментальных и доклинических экспериментах в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (НЛП/GLP) // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016. №1. С. 30-36.

31. Кухарчук А. Л., Радченко В. В., Сирман В. М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника: Черновцы: Золоті литаври, 2004. 504 с.

32. Левченко В. М., Гвоздецкий Н. А. Разработка современной методики культивирования аутологичных дермальных фибробластов // Известия оренбургского государственного аграрного университета, 2016. №2 (58). С. 88-90.

33. Ляшенко Т. Д., Сукач А. Н. Характеристика изолированных нервных клеток новорожденных крыс // Патологія, 2009. Т. 6, № 1. С. 55-58.

34. Ляшенко Т. Д., Шевченко М. В., Сукач А. Н. Сравнительная характеристика суспензии нервных клеток, полученных из мозга плодов и

новорожденных крыс // Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи: матеріали Науково-практична конференція з міжнародною участю. Київ. 2010. Т. 16, С. 115-116.

35. Маммедова Д. Т., Старикова Э. А., Фрейдлин И. С. Влияние супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* на миграционную активность и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток.: 2016. Т. 16, № 4. С. 158-159.

36. MAO-B и другие факторы в прогрессировании болезни Паркинсона: проблема нейропротекции / Сапронова М. Р., Трикман О. П., Шнайдер Н. А., Похабов Д. В. // Нервные болезни. №4. 2014. С. 2-7.

37. Методика создания монослоя клеток на базе органотипической культуры для тестирования физиологически активных веществ / Хавинсон В. Х., Линькова Н. С., Проняева В. Е., Чалисова Н. И., Концевая Е. А., Полякова В. О., Кветная Т. В., Кветной И. М., Яковлев Г. М. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 153, № 5. С. 759-763.

38. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / Савченкова И. П., Эрнст Л. К., Гулюкин М. П., Викторова Е. В. // М.: Спутник+. 2010. С. 23.

39. Мяделец О. Д., Лебедева Е. И., Мяделец Н. Я. Преподавание учения о стволовых клетках на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии: региональные стволовые клетки и регенерация тканей // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2018. Т. 17, № 1. С. 113-124.

40. Об обращении лекарственных средств: Федеральный закон № 61-ФЗ от 12.04.2010. Доступ из прав.-правовой системы «КонсультантПлюс». Источник: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_99350](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350).

41. Олефир Ю. В., Медуницын Н.В., Авдеева Ж.И., Солдатов А.А., Мовсисянц А. А., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные

вопросы разработки и перспективы использования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016;16(2):67-77.

42. Оптимизация условий для получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека / Зорин В. Л., Копнин П. Б., Зорина А. И., Еремин И. И., Лазарева Н. Л., Чаузова Т. С., Самчук Д. П., Петрикина А. П., Еремин П. С., Корсаков И. Н., Гринаковская О. С., Соловьева Е. В., Котенко К. В., Пулин А. А. // Гены и Клетки. 2014. Т. 9, № 2. С. 53-60.

43. Опыт применения аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в лечении пациентов с симптоматической эпилепсией / Хлебоказов Ф. П., Докукина Т. В., Игнатенко С. И., Космачева С. М., Гончарова Н. В., Потапнев М. П., Махров М. В., Королевич П. П., Мисюк Н. Н., Григорьева И. В., Марчук С. А. // Эпилепсия и параксизмальные состояния. 2014. Т.6., №1. С. 6-14.

44. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств / Алпатова Н.А., Гайдерова Л. А., Яковлев А. К., Мотузова Е. В., Лысикова С. Л., Солдатов А. А., Авдеева Ж. И. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2017; №17(1). С. 13-26.

45. Охотин В. Е., Ревущин А. В., Павлова Г. В. Стволовые клетки нейронального происхождения в мозге млекопитающих. // Научное издание Тихоокеан. мед. ж. 2012. № 2. С. 60-65.

46. Оценка эффективности пептидных препаратов в качестве средств коррекции нарушений функций центральной нервной системы, вызванных высокими дозами этанола / Гребенюк А. Н., Рейнюк В. Л., Халютин Д. А. Давыдова Е. В., Ховпачёв А. А. // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2014. №3 (47). С. 145-149.

47. Пашкевич С., Шанько Ю. Стволовые клетки и нейронные сети мозга // Наука и инновации: нейронаука. 2018. №6 (184). С. 15-17

48. Принципы оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов / Алпатова Н. А., Авдеева Ж.

И., Солдатов А. А., Бондарев В. П., Медуницын Н. В. // Цитокины и воспаление. 2015. №14(3). С. 6-12.

49. Проблемы нейропластичности и нейропротекции. / Цинзерлинг В. А., Сапаргалиева А. Д., Вайншенкер Ю. И., Медведев, С. В. // Вестник санкт-петербургского университета. Серия 11: медицина. 2013. № 4. С. 3-12

50. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования / Семенова В. М., Лисяный Н. И., Стайно Л. П., Бельская Л. Н., Егорова Д. М. // Український нейрохірургічний журнал. 2014. № 3. С. 24-29.

51. Регенеративный потенциал головного мозга: популяционный состав и формирование регуляторного микроокружения в нейрогенных нишах. / Комлева Ю. К., Кувачева Н. В., Малиновская Н. А., Горина Я. В., Лопатина О. Л., Тепляшина Е. А., Пожиленкова Е. А., Замай А. С., Моргун А. В. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2014. Т. 8, №4. С. 44-52

52. Роль нейропептидов в механизмах адаптации к экстремальным состояниям / Альперович Д. В., Лысенко А. В., Мационис А. Э., Менджеричкий А. М. Ростов-на-Дону: Изд-во РГПУ, 1999. 296 с.

53. Скуратов А. Г., Петренев Д. Р., Кондрачук А. Н. Гепатоцитарная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток // Проблемы здоровья и экологии. 2013. № 1 (35). С. 29-35.

54. Сравнение мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и региональных стволовых клеток сердца и фибробластов кожи человека. / Павлова С. В., Сергеевичев Д. С., Чепелева Е. В., Козырева В. С., Малахова А. А., Захарова И. С., Григорьева Е. В., Покушалов Е. А., Закиян С. М. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015; №19(4-2). С.12-19.

55. Средство для изменения скорости роста или репродукции клеток, способ его получения, способ стимуляции заживления ран или лечения ожогов, способ коррекции косметического дефекта, способ ингибирования

старения кожи и способ стимуляции роста волос, патент 2280459, Российская Федерация № 2001133453/13 / Нотон Г. К., Хорвитз Д. Л., Эпплгейт М. А., Зелтинджер Дж., Мэнсбридж Дж. Н., Керн А., Лэндин Л.К., Рэтклифф Э., Пинни Р.Э.; заявл. 20.01.2005; опубл. 27.07.2006; Доступ из библиотеки патентов на изобретения «ПатентСервис». Источник: <http://allpatents.ru/patent/2280459.html>.

56. Средство для лечения ожогов и ран на основе цитокинов и факторов роста, секретируемых мезенхимными клетками человека, способ получения средства и способ лечения ожогов и ран: патент 2574017С1 Российская Федерация № 2014139540 / Стамбольский Д.В., Ткачук В.А., Семина Е.В., Тарасова Е.В., Рубина К.А., Кочегура Т.Н., Сысоева В.Ю., Ефименко А.Ю., Акопян Ж.А.; заявл. 17.03.2003; опубл. 10.03.2004; Доступ из библиотеки патентов на изобретения «Freepatent». Источник: <http://www.freepatent.ru/patents/2225209>.

57. Современная стратегия регенеративной терапии и безопасность применения аллогенных стволовых клеток пуповинной крови при нейродегенеративных заболеваниях / Смолянинов А. Б., Хурцилава О. Г., Тыренко В. В., Новицкий А. В., Иволгин Д. А. // Гены и Клетки. 2011 Т.6, №4, С. 14-20.

58. Сопоставление морфологических и функциональных свойств клональных линий монослойной гепатомы Зайдела с признаками стволовых и прогениторных клеток / Терюкова Н. П., Сахенберг Е. И., Иванов В. А., Снопов С. А. // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2016. Т. 32. С. 3-13.

59. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы при ксенотрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека / Масгутова Г. А., Масгутов Р. Ф., Салафутдинов И. И., Шульман А. А., Журавлева М. Н., Галлямов А. Р., Богов (млад.) А. А., Богов А. А., Ризванов А. А. // Гены и Клетки. 2015. Т. 10, №1. С. 98-102.

60. Сукач А. Н., Грищенко В. И. Клеточная терапия нейродегенеративных болезней: источники клеток и стратегия их применения // Успехи современной биологии: Науч.-практ. журн. 2007. Т.127, №1. С. 25-33.

61. Сукач А. Н., Петренко А. Ю. Особенности поведения эмбриональных нервных клеток человека в условиях культивирования *in vitro* // Проблемы криобиологии. 2005. Т. 15, № 3. С. 385-388.

62. Татарина О. С., Осипова Е. Ю., Румянцев С. А. Биологические свойства и возможности клинического использования мезенхимальных стволовых клеток // Онкогематология. 2009. Т.4, №4. С. 33-44.

63. Ткачук В. А. Физиологические механизмы обновления клеток и регенерации тканей. // Технологии живых систем, Радиотехника. 2017. Т. 14, №4. С. 4-11.

64. Трансплантация нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в стриатум крыс с токсической моделью болезни Гентингтона / Ставровская А. В., Ямщикова Н. Г., Ольшанский А. С., Коновалова Е. В., Иллариошкин С. Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2016. Т. 10, № 4. С. 39-44.

65. Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов ОФС.1.7.2.0011.15. / Государственная фармакопея Российской Федерации Издание 8-е. Т. 2. Доступ из прав.-правовой системы «КонсультантПлюс». Источник: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=MED&n=67948#044929828081100887>.

66. Шабанов П. Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры // Психофармакол. биол. наркол. 2008. Т. 8, № 3-4. С. 2399-2425.

67. Шабанов П. Д. Фармакология пептидных препаратов // Медицинский академический журнал. 2008. Т. 8, № 4. С. 3-24.

68. Шафигуллина А. К., Гумерова А. А., Киясов А. П. Звездчатые клетки печени – региональные стволовые клетки или фактор микроокружения? // Гены и Клетки. 2015. Т. 10, №4. С. 23-28.

69. Шахпазян Н. К., Астрелина Т. А., Яковлева М. В. Мезенхимальные стволовые клетки различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества безопасности для клинического применения // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. № 7 (1). С. 23-33.

70. Шевченко М. В., Сукач А. Н. Влияние гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре : научное издание // Проблемы криобиологии, 2012. Т. 22, № 4. С. 423-432.

71. Шевченко М.В., Сукач А.Н. Чувствительность фетальных и неонатальных нервных клеток крыс к гипотермическому хранению // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 3. С. 343.

72. Чувствительность нейронов к низкоинтенсивному электромагнитному излучению при токсическом действии гидразинов / Кокая А. А, Ведунова М. В., Митрошина Е. В., Козяков В. П. // Вестн. Росс. воен-мед. акад. 2013. №. 2 (42). С. 109-115.

73. Эпигенетические механизмы пептидной регуляции и нейропротекторный белок FKBP1b. Кузник Б. И., Давыдов С. О., Поправка Е. С., Линькова Н. С., Козина Л. С., Хавинсон В. Х. // Молекулярная биология. Молекулярная биология. № 53. С. 339-348.

74. Altman J., Das G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. // J. Comp. Neurol. 1965. Vol. 124. P. 319-335.

75. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy / James E. N. Jonkman, Judith A. Cathcart, Feng Xu, Miria E. Bartolini, Jennifer E. Amon, Katarzyna M. Stevens & Pina Colarusso // Cell Adhesion & Migration. 2014. №8 (5), 440-451.

76. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke / Ohab J. J., Fleming S., Blesch A., Carmichael S.T. // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 13007-13016.
77. Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor / Schmidt N.O., Przylecki W., Yang W, Ziu M., Teng Y., Kim S. U., Black P. M., Aboody K. S., Carroll R. S. // *Neoplasia.* 2005. Vol. 7. P. 623-629.
78. Curtis M. A., Kam M., Faull R. L. M. Neurogenesis in humans // *Eur. J. Neuroscience.* 2011. Vol. 33. P. 1170-1174.
79. Clarification of the nomenclature for MSC: the international Society for Cellular Therapy position statement / E M Horwitz ; K Le Blanc ; M Dominici; I Mueller; I Slaper-Cortenbach; F C Marini; R J Deans; D S Krause; A Keating // *Cytotherapy.* 2005. Vol. 7. P. 393-395.
80. Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. P. 11619-11624.
81. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial / Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C. et al. // *Mol. Med.* 2002. Vol. 8. P. 495-505.
82. Fussenegger, M., and Bailey, J.E. Control of mammalian cell proliferation as an important strategy in cell culture technology, cancer therapy and tissue engineering. In / *Cell Engineering.* Vol. 1. 1999. 219 c.
83. Harris D. T. Non-haematological uses of cord blood stem cells // *Br. J. Haematol.* 2009. Vol. 147. P. 177-184.
84. Hamerlik, P. Autocrine VEGF\VEGFR2 Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cells viability and tumor growth / Hamerlik P., Lathia J. D., Rasmussen R. [et al.] // *J. Exp. Med.* 2012. Vol. 209. P. 507-520.
85. La Crosse A. L., Olive M. F. Neuropeptide systems and schizophrenia // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2013. Vol. 12, № 5. P. 619-632.

86. Magavi S., Friedmann D., Banks G. Coincident Generation of Pyramidal Neurons and Protoplasmic Astrocytes in Neocortical Columns // *J. of Neurosci.* 2012. Vol. 32(14). P. 4762-4772.
87. Mesenchymal Stem Cell-conditioned Medium Promote the Recovery of Skin Burn Wound / Irma Padeta, Widagdo Sri Nugroho, Dwi Liliek Kusindarta, Yuda Heru Fibrianto and Teguh Budipitojo // *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2017. №12. P 132-141.
88. Migration of mesenchymal stem cells towards glioblastoma cells depends on hepatocyte growth factor and is enhanced by aminolaevulinic acid-mediated photodynamic treatment / Vogel S., Peters C., Etminan N. [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 431. P. 428-432.
89. Ming G. L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system // *Annual Review of Neuroscience.* 2005. Vol. 28. P. 223-250.
90. Kam M., Curtis M. A., McGlashan et al. The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain // *J. Chem. Neuroanat.* 2008. Vol. 37. P. 196-205.
91. Kernie S. G., Parent J. M. Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury // *Neurobiol. Dis.* 2010. Vol. 37(2). P. 267-274.
92. Palmer T. D., Willhoite A. R., Gage F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. // *J. Comp. Neurol.* 2000. Vol. 425. P. 479-494.
93. Reynolds B. A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. // *Science.* 1992. Vol. 255. P. 1707-1710.
94. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats / Wang L., Zhang Z., Wang Y. et al. // *Stroke.* 2004. Vol. 35. P. 1732-1737
95. Vitorino P, Meyer T. Modular control of endothelial sheet migration / *Genes & development.* 2008. №22. P. 3268-3281.

96. Wondergem R., Ecay T.W., Mahieu F. HGF/SF and menthol increase human glioblastoma cell calcium and migration // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol.372. P. 210-215.

97. Woodbury D., Reynolds A., Black I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. // *J. Neurosci. Res.* 2002. P. 908-917.

98. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues // *Reprod Med Biol.* 2017 Vol. 16. P. 99 117.