

На правах рукописи

ЛЕВЧЕНКО Владимир Михайлович

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ФИБРОБЛАСТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: **Беляев Валерий Анатольевич**,
доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты: **Рябых Владимир Павлович**,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных», заведующий лабораторией клеточной и генной инженерии

Лысенко Юрий Андреевич,
кандидат биологических наук,
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина»,
доцент кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики

Ведущая организация: **ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»**

Защита диссертации состоится 6 июля 2017 г. в 13-00 ч. на заседании диссертационного совета Д 220.062.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» по адресу: 355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» <http://www.stgau.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г. и размещен на сайтах: ВАК Минобразования и науки РФ: <http://vak.ed.gov.ru> «___» _____ 2017 г.; ФГБОУ ВО «Ставропольский ГАУ»: <http://www.stgau.ru> «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Дьяченко Юлия Васильевна

Общая характеристика работы

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

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

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

Одним из важных направлений в развитии клеточных технологий является модификация существующих методик, используемых для восстановления структурной целостности и функциональной активности поврежденных тканей и органов. Использование традиционных методов лечения в терапии повреждений различной этиологии не всегда приводит к регенерации структурной целостности ткани (Н.М. Юдинцева, 2010; Е.Н. Любченко, 2003).

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

Создание живого эквивалента кожи позволяет использовать модельные системы *in vitro* для изучения морфофизиологических фундаментальных процессов, происходящих в коже, в частности межклеточных взаимодействий, а также для тестирования новых фармакологических соединений (Ю.К. Скрипкин, А.А. Кубанова, В.А. Самсонова, 1994; Л.А. Болдатова, 2009).

Степень разработанности

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

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

В зарубежной практике над проблемой клеточной терапии патологий различного происхождения работали Bruder S.P. (1998), Kassem M. (2004),

Dezawa M. (2005), Miyahara Y. (2006), Tang J. (2006), Zhang D. (2007), Aggarwal S. (2005), Di Nicola M. (2002), Beyth S. (2005); Quirici N. (2002).

В современной научной литературе встречается ограниченное количество информации относительно методик культивирования фибробластов сельскохозяйственных животных и их морфометрических показателей.

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

Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи исследования:

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

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

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

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

Материалы исследований используются в учебном процессе и научных исследованиях в ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный

университет им. Императора Петра I», ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет», ФГБОУ ВО «Самарская государственная сельскохозяйственная академия», ФГБНУ «Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт».

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

В работе использован комплексный методологический подход к исследованию морфологических показателей и функциональных особенностей дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, морфометрические методы исследования, а также статистические методы обработки результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

Личный вклад соискателя. Организация и проведение экспериментальной части работы, отбор и анализ проб для исследования, а также статистическая обработка результатов выполнялись лично автором в течение 3-х лет. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85%.

Соискатель выражает благодарность за консультацию и помощь в разработке методики культивирования фибробластов Криворучко А.Ю., руководителю научно-диагностического и лечебно-ветеринарного центра,

доктору биологических наук, профессору ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», за помощь в проведении исследований Куличенко А.А., доктору медицинских наук, профессору директору ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

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

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований, заключения, выводов, предложений производству, списка использованной литературы и приложений. Содержание работы изложено на 114 страницах машинописного текста, включая 19 таблиц и 22 рисунка. Библиографический список состоит из 170 источников, в том числе 61 иностранных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обзор литературы.

В обзоре литературы раскрываются некоторые морфофункциональные особенности и культуральные свойства дермальных фибробластов, области их применения, методы и способы культивирования, а также оценка жизнеспособности культуры клеток.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования

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

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

Основная часть эксперимента была выполнена на овцах северокавказской породы в возрасте 1,5-2 года со средней массой 50-55 кг, $n=10$, все животные содержались в одинаковых условиях вивария факультета ветеринарной медицины, крупном рогатом скоте, принадлежащем ООО СХП

«Новомарьевское», в возрасте 1 – 1,5 года со средней массой 350 - 450 кг, n=10, свиньях, принадлежащих ЛПХ Изобильненского, Труновского и Шпаковского районов, в возрасте 1 – 1,5 года со средней массой 150 – 200 кг, n=10.

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

Культивирование и изучение культуральных свойств фибробластов, полученных от опытной модели (морская свинка) и сельскохозяйственных животных, проводили по методике, предложенной В.А. Ткачук и др. (пат RU № 2320720 МПК С 12 N 5/08, А 61 L 27/38, опубл. 27.03.2010 г. Для сокращения времени культивирования до 3 – 4 суток, синхронности получения культур, свободных от грибковой и бактериальной контаминации, мы модифицировали методику культивирования дермальных фибробластов морской свинки и сельскохозяйственных животных.

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

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

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

Для оптимальной визуализации аутологичных дермальных фибробластов использовался метод сканирующего электронно-микроскопического исследования. Работу выполняли на растровом электронном микроскопе для биологических исследований EVO LS 10 (Carl Zeiss, Германия) в сканирующем режиме.

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

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

Определение скорости адгезии клеток проводили с помощью модифицированного метода Карекла (Karecla et al., 1994).

Методом масс-спектрометрии MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) (Г.И. Лямкин, А.Н. Куличенко, 2016).

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

Для оценки жизнеспособности культур клеток фибробластов использовались следующие методики: методика экспертных оценок Шиган (1986) и методика И.Г. Герасимова и А.Г. Попандопуло (2009 г.), которые основывались на положениях теории термодинамики неравновесных процессов и энтропийного эквивалента. (Пригожин, 1985).

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

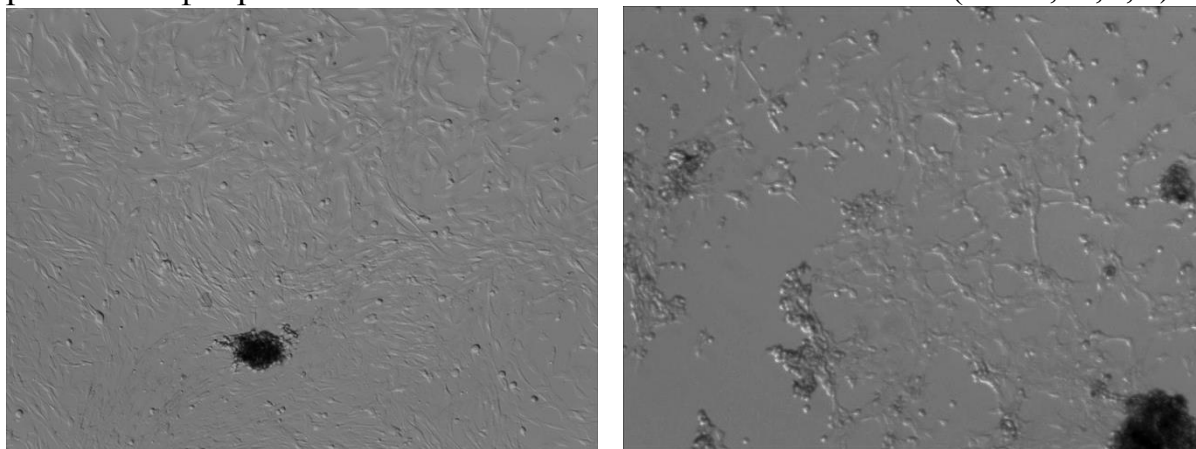
2.2. Результаты исследований

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

Разработанная нами модифицированная методика культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных создана на основе методики В.А. Ткачук, Е.В. Парфеновой (2010г.) и позволяет получать монослой аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных через 96 часов.

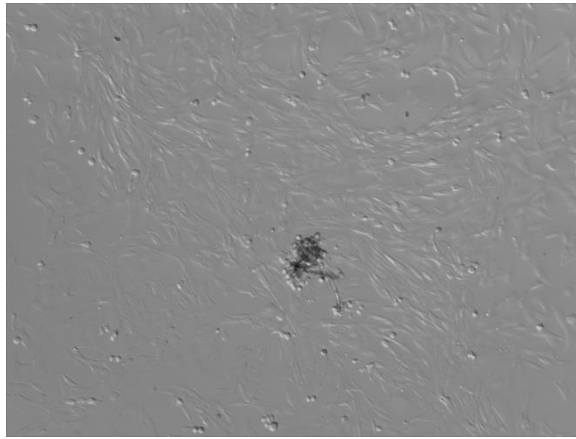
2.2.2. Морфологическая характеристика фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM

В ходе экспериментальной части исследования были получены культуры дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных (Рис.1, А,Б,В).



А)

Б)



В)

Рисунок 1 – Культуры аутологичных дермальных фибробластов овцы(А), крупного рогатого скота(Б) и свиней(В), культивируемые по усовершенствованной методике, через 96 часов. Ув.х100.

Инфографика, характеризующая увеличение длины клеток в процессе культивирования по усовершенствованной методике на среде DMEM (Рис. 2).

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

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

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

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

Показатели ширины фибробластов сельскохозяйственных животных достоверно различались, через 24 часа культивирования клетки крупного рогатого скота на 2% шире, чем у овец.

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

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

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

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

Проанализировав данные, представленные в таблице 2, можно сделать заключение, что в процессе культивирования показатели площади фибробластов, полученных от опытных животных, варьировались следующим образом, в первые сутки культивирования значения площади фибробластов овец достоверно на 6,5% больше площади фибробластов крупного рогатого скота и на 11,5% меньше площади фибробластов свиней, а площадь фибробластов крупного рогатого скота достоверно меньше на 17,1% площади клеток свиней.

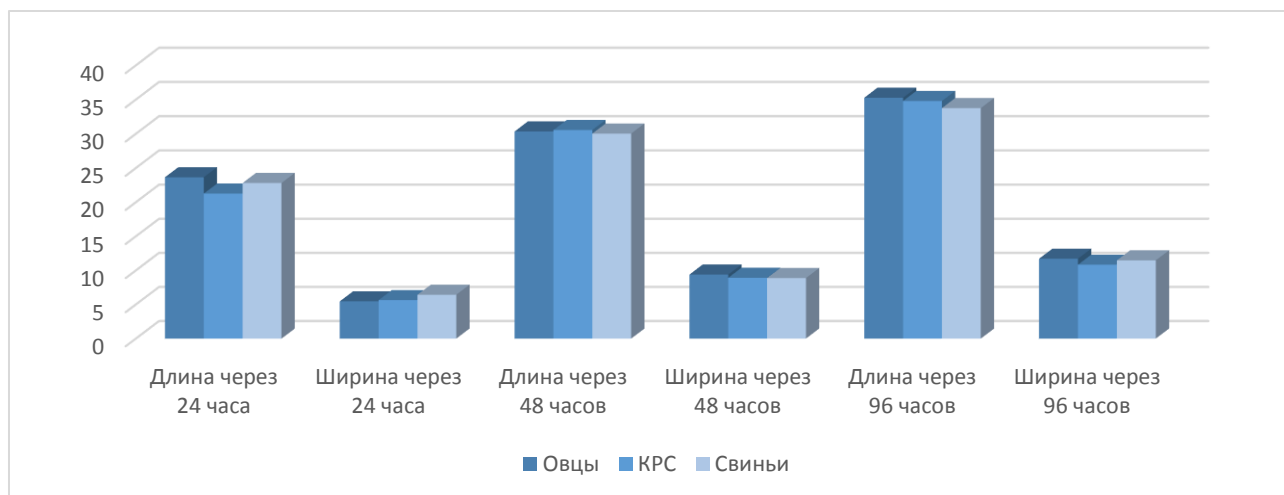


Рисунок 2 – Динамика изменения показателей длины и ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования 96 часов (1 пассаж).

Таблица 1 – Показатели длины и ширины клеток дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования, мкм (n=30).

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

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

Таблица 2 – Показатели площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования (мкм²,) n=30.

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

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

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

Таблица 3 – Показатель ЯЦО фибробластов сельскохозяйственных животных (n=30).

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

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

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

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

Таблица 4 – Показатели оптической плотности ядра клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных (Ед. яркости) n =30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1.	96 часов	0,564±0,376 ^{*#}	0,495±0,492 [*]	0,515±0,413 ^{*#}

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

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

По истечении 96 часов культивирования 1 пассажа культуры подвергались пересеву по методике, описанной в разделе «Материалы и методы исследований», и культивировались дальше. Во время второго пассажа культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных были получены следующие морфометрические показатели длины клеток:

Таблица 5 – Показатели длины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (2 пассаж) (мкм), n=30.

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

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

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

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

Сравнивая показатели длины клеток через 24 и 48 часов культивирования (2 пассаж), установлены достоверные различия в показателях длины фибробластов сельскохозяйственных животных. Для фибробластов овец отмечено увеличение на 7%, для фибробластов крупного рогатого скота на 11,5%, для фибробластов свиней на 10,2%.

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

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

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

В ходе второго пассажа ширина аутологичных дермальных фибробластов менялась (Табл. 6).

Таблица 6 – Показатели ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (2 пассаж) (мкм), n=30.

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

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

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

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

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

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

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

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

Через 96 часов культивирования второго пассажа установлены достоверные различия между показателями ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота на 4,5%.

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

По завершении второго пассажа площадь аутологичных дермальных фибробластов составляла (Табл. 7):

Таблица 7 – Показатели площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования (мкм²), n=30.

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

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

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

Показатели ЯЦО и оптической плотности дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, полученные в ходе 1 и 2 пассажей, существенно не изменялись.

Отношение длины к ширине клеток 3:1, это же характерно для культур аутологичных дермальных фибробластов овец и крупного рогатого скота через 96 часов культивирования в среде DMEM.

По истечении 96 часов культивирования 2 пассажа культуры подвергались пересеву по методике, описанной в разделе «Материалы и методы исследований», и культивировались дальше. Во время третьего пассажа культур аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных были получены следующие морфометрические показатели длины клеток:

Таблица 8 – Показатели длины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (3 пассаж) (мкм) n=30.

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

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

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

Сравнивая показатели длины клеток через 24 и 48 часов культивирования (3 пассаж), установлены достоверные различия в показателях длины фибробластов сельскохозяйственных животных. Для фибробластов овец отмечено увеличение на 3,7%, для фибробластов крупного рогатого скота на 4,8%, для фибробластов свиней на 3,8%.

Через 48 часов культивирования третьего пассажа установлено, что длина фибробластов овец достоверно меньше длины клеток крупного рогатого скота на 2,5% и больше длины фибробластов свиней на 2,5% соответственно.

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

В ходе третьего пассажа ширина аутологичных дермальных фибробластов менялась (Табл. 9).

Таблица 9 – Показатели ширины клеток аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM (3 пассаж) (мкм), n=30.

№ п/п	Временной промежуток	Дермальные фибробласты овец	Дермальные фибробласты крупного рогатого скота	Дермальные фибробласты свиней
1	24 часа	16,205±0,574 [#]	16,874±0,532 ^{*#}	16,993±0,521 ^{*#}
2	48 часов	17,967±0,278 [#]	17,018±0,429 ^{*#}	17,202±0,617 ^{*#}
3	96 часов	19,841±0,372 [#]	18,114±0,573 [#]	18,021±0,331 ^{*#}

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

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

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

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

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

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

Через 96 часов культивирования третьего пассажа установлены достоверные различия между показателями ширины аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных. Ширина клеток овец достоверно больше ширины фибробластов крупного рогатого скота и свиней на 4,5% и на 8,7% соответственно.

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

тем, что клетки достигли своих максимальных размеров, переходят на следующий этап созревания.

По завершении третьего пассажа площадь аутологичных дермальных фибробластов составляла (Табл. 10):

Таблица 10 – Показатели площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования (мкм²) n=30

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

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

Различия показателей площади аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных по завершении 3 пассажа колебались в пределах 8-10%.

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

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

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

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

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

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

Количество проколлагена, продуцируемого дермальными фибробластами свиней, на 23% больше, чем у крупного рогатого скота, достоверных различий по количеству продуцируемого проколлагена между фибробластами свиней и

овец не выявлено. Ко второму пассажу в клетках развивается эндоплазматическая сеть, начинается синтез белков, в связи с этим увеличивается количество проколлагена, синтезируемого фибробластами. Количество синтезируемого проколлагена в фибробластах свиней на 15% больше, чем у фибробластов овец, и на 28% больше, чем у фибробластов крупного рогатого скота. Максимальный пик количества синтезируемого проколлагена у фибробластов свиней, отмечается на 3-й пассаж, и его количество на 10% больше, чем у фибробластов овец, и на 19% больше, чем у фибробластов крупного рогатого скота. Максимальные пики количества проколлагена в фибробластах овец нами отмечались на 4-й пассаж, а у крупного рогатого скота на 5-й пассаж. Факт максимального пика количества проколлагена в фибробластах свиней к 3 пассажиру мы связываем с эволюционно-генотипической скороспелостью свиней.

2.2.4. Оценка жизнеспособности культур клеток аутологичных дермальных фибробластов при их культивировании в среде ДМЕМ по усовершенствованной методике

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

Оценка жизнеспособности проводилась на основании системы экспертных оценок (Шиган, 1986).

В результате экспертной оценки культурам была дана балльная характеристика (5 баллов – отличное, 4 балла – удовлетворительное, 3 – неудовлетворительное качество культуры).

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

Для расчета ЭЭ следует использовать не коррелирующие между собой показатели в количестве 3-4. В связи с этим для расчета ЭЭ целесообразно использовать такие параметры, как S , поскольку это интегральный показатель P и S , разницу дескрипторов ($F_3 - F_1$) и нормированный дескриптор Фурье (далее FF), на основании которых составляется корреляционная матрица (3x3).

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

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

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

Для фибробластов такие параметры, как S и C, коррелируют между собой так же, как и центральные моменты F_1 и F_3 и разница дескрипторов F_1-F_3 между собой ($r > 0.75$, $P < 0.1$), тем не менее корреляция между P и другими параметрами минимальна ($r < 0.3$, $P > 0.5$). Скорее всего, это связано с отсутствием округлых клеток, для которых характерна корреляция параметров S и C, что сходно с мнением И.Г. Герасимова.

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

На примере культур клеток фибробластов и оценки их жизнеспособности показано преимущество применения ЭЭ, что делает полученные результаты более доступными и экономически выгодными, по сравнению с известными методами и приемами.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

В результате проведенных исследований модифицирована современная методика культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных, позволяющая сокращать время культивирования по сравнению с методиками аналогами в 2 раза. Впервые показано динамичное изменение морфометрических параметров аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании на среде DMEM по модифицированной методике.

Описана вариативность морфометрических показателей аутологичных дермальных фибробластов крупного рогатого скота, овец и свиней. Оценен пролиферативный потенциал дермальных фибробластов по параметрам ЯЦО и оптической плотности ядра.

В результате масс-спектрометрических исследований получены данные по функциональной активности дермальных фибробластов. Это подтвердило наши предположения по более активным процессам синтеза белков в клетках, находящихся в культурах начиная с 3 пассажа.

Проведенная оценка жизнеспособности клеток по энтропийному эквиваленту позволяет нам судить о высокой жизнеспособности культур клеток аутологичных дермальных фибробластов, культивируемых по модифицированной методике, и дает нам возможность выбирать культуры с высокой жизнеспособностью для ведения перевиваемых клеточных линий, без использования общепринятых методов оценки жизнеспособности.

Проведенные исследования позволяют более глубоко понять морфологию фибробластов, выявлять закономерности динамической вариативности клеток в процессе культивирования, судить об их функциональной и пролиферативной активности. Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы и представить рекомендации по их практическому использованию.

ВЫВОДЫ

1. Двукратное промывание биоптатов кожи в растворах фосфатного буфера с добавлением антибиотиков, уменьшение концентрации трипсина в растворе до 0,25%, двукратная инактивация трипсина раствором Версена, позволяют получать культуры клеток аутологичных дермальных фибробластов овец, крупного рогатого скота и свиней, соответствующие основным требованиям ОФС.1.7.2.0011.15.
2. Внесенные изменения в методику культивирования аутологичных дермальных фибробластов не повлияли на их морфологические и

- функциональные свойства и позволили добиться в культурах площади монослоя 88,7%.
3. Выявлена динамика изменения морфометрических показателей аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных в процессе культивирования, составляющая после первого пассажа для показателя длины в среднем 34,8%; ширины 48,3%, площади 76,6%; после второго пассажа для показателя длины в среднем составляла 14,4%, ширины 33,7%, площади 73,3%; после третьего пассажа средняя динамика изменения длины составляла 7,7%, ширины 17,3%, площади 43,5%.
 4. Установлено наличие подобности фибробластов крупного рогатого скота, овец и свиней по размерам и формам клеток, количеству отростков, размерам ядер.
 5. Установлено, что юные аутологичные дермальные фибробласты сельскохозяйственных животных – грушевидной формы, с 1–2 отростками, со средними размерами 19 – 23 мкм; незрелые фибробласты – веретеновидной формы, с 2 – 3 отростками, размером 30 – 40 мкм; зрелые, активно функционирующие аутологичные дермальные фибробласты – веретеновидной формы с 3 и более отростками, размер клеток составляет 45 – 50 мкм.
 6. Выявлена максимальная скорость адгезии клеток, составляющая для фибробластов овец 86,2%, для фибробластов крупного рогатого скота 85,9% и для фибробластов свиней 85,3% на временном промежутке 60 минут.
 7. Установлено, что наибольшей функциональной активностью обладают аутологичные дермальные фибробласты свиней с 3 пассажа, овец с 4, а крупного рогатого скота с 5 пассажа, о чем свидетельствует концентрация проколлагена свыше 70%.
 8. Установлено, что внесенные изменения в методику культивирования дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных позволяет получать культуры отличного качества со значениями энтропийного эквивалента 1,6 – 1,8 усл.ед и хорошего качества со значениями энтропийного эквивалента 2,2 – 2,4 усл. ед., что так же подтверждается экспертной оценкой по методу Шигана.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Положительные результаты, полученные при испытании разработанной методики культивирования аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных, позволяют рекомендовать её к широкому использованию на биофабриках, при использовании заместительной клеточной терапии в ветеринарной хирургической практике.
2. Полученные данные могут использоваться при составлении учебных и справочных пособий, проведении научных исследований, чтении лекций и

проведению практических занятий по морфологии, цитологии и гистологии, биологии развития в учебных заведениях биологического профиля.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ:

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

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

3. Левченко В.М. Морфологическая характеристика аутологичных дермальных фибробластов разных видов сельскохозяйственных животных // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ). [Электронный ресурс]. Краснодар: КубГАУ, 2016. №07(121). Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2016/07/pdf/55.pdf>, 0,750 у.п.л. IDA: 1211607055. <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-121-055>.

Публикации в других изданиях

4. Левченко В.М. Морфологическая характеристика аутологичных дермальных фибробластов сельскохозяйственных животных при их культивировании в среде DMEM по усовершенствованной методике // Вестник Курганской ГСХА. 2016. №3 (19). С.37-39.

5. Левченко В.М., Ключникова В.Н. Разработка современной методики культивирования фибробластов для генной инженерии // Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса: сб. науч. тр. по материалам Междунар. научн. -практ. конф. (г. Ставрополь, 18-19 сентября 2015г.) / ВНИИОК. Ставрополь. 2015. С. 450 – 453.

Подп. в печать 27.04.2017 г. Бумага офсетная. Формат 60/84 1/16.
Зак. № 58. Печ. лист 1,0. Тираж 100 экз.

Цех оперативной полиграфии ФГБНУ ВНИИОК
г. Ставрополь, пер. Зоотехнический 15.