

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії і екології
Кафедра біології людини та імунології

ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ОРГАННИХ
КУЛЬТУР

Кваліфікаційна робота (проект)
на здобуття ступеня вищої освіти “магістр”

Виконала: здобувачка 2 курсу 212- М
групи

Спеціальності: 091 Біологія

Освітньо-професійної програми:
Біологія

Мельник Анастасія Григорівна

Керівники: доц.,к.б.н. Шкуропат
Анастасія Вікторівна

Рецензент: Шульга Л.Г., лікар
бактеріолог, ДУ "Херсонський
обласний лабораторний центр МОЗ
України"

Зміст

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Вивчення питання щодо використання органотипових культур у якості тест-об'єктів	6
1.1. Культури клітин як об'єкт досліджень	6
1.2. Особливості гістологічної будови тканин	9
1.2.1. Гістологічна будова печінки	9
1.2.2. Гістологічна будова скелетного м'язу	13
1.2.3. Гістологічна будова головного мозку	16
1.3. Використання органотипових культур клітин у дослідженнях	20
РОЗДІЛ 2. Методика дослідження органотипових культур	24
2.1. Введення у культуру	24
2.2. Дослідження біохімічних показників органних культур	26
РОЗДІЛ 3. Обговорення отриманих результатів	29
3.1. Зміни концентрації білка та активності трансфераз в залежності від типу культури	29
3.2. Обговорення отриманих результатів	35
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ВСТУП

Актуальність теми. У біомедицині та ветеринарії для вирішення кожної потреби розроблена велика кількість методів культивування та введення у культуру різноманітних тканин. Проте вдосконалення та подальша розробка нових методів культивування, нових клітинних ліній, створення мікрооточення та вдосконалення методів дослідження не втрачає своєї актуальності [11, 13].

Одним із актуальних питань біомедицині є розробка методів культивування тканин та органів для трансплантації, у якості модельних систем для вивчення патологій та розробки способів лікування.

Багато дослідників приділяють увагу створенню оптимальних умов для підтримки клітин у культурі, проте і досі залишаються не з'ясованими окремі складники та умови культивування для підтримки бажаних властивостей культури [5].

Одним із актуальних питань методу культури клітин та тканин залишається стимулювання проліферації та створення умов для диференціювання клітин з певним фенотипом. Адже регенерація тканин як *in vivo*, так *in vitro* є важливим питанням для розвитку методів аллогенної та аутогенної трансплантації органів.

Органотипові культури зберігають гістологічні зв'язки тканини та підтримують фенотип клітин, що входять у їх склад. Органотипові культури більше підходять під визначення «ідеальна клітинна модель», оскільки життєдіяльність клітин у таких культурах максимально наближена до такої у досліджуваного об'єкта. Тобто, результати дослідження, які будуть отримані на органній культурі, можна переносити на результати, які би могли бути отримані при використанні досліджуваного об'єкта [22].

Органотипові культури є гарними моделями для вивчення дії окремих речовин та тканини чи орган. Так, на органотипових культурах нервової тканини було вивчено вплив інсуліноподібного фактору росту, його здатність збільшення проліферації у культурах клітин. Т.О.Palmer (2000) на органотипових культурах гіпокампа дорослих щурів показав регуляцію міграції та проліферації нервових стовбурових клітин та необхідні гомокринні та паракринні фактори для підтримки їхнього стовбурового потенціалу та створення умов для диференціювання у клітини нейроглії та нейробласти [8].

Метою роботи є з'ясувати зміни біохімічних показників органотипових культур протягом культивування.

Об'єкт дослідження – органотипові культури печінки, мозку та м'язів білих безпорідних лабораторних мишей.

Предмет дослідження – біохімічні показники органотипових культур печінки, мозку та м'язів протягом періоду культивування.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати літературні джерела стосовно практичного значення застосування органотипових культур.
2. З'ясувати на основі вивчення літературних джерел особливості та відмінності культивування органотипових культур .
3. Провести введення у органотипові культури печінку, мозок та м'язи білих безпорідних мишей.
4. Вивчити зміни біохімічних показників органотипових культур печінки, м'язів та мозку протягом періоду культивування.

Методи дослідження: для досягнення мети дослідження ми використовували метод аналізу літературних джерел, систематизації наукових факторів, методи введення тканин у культуру та біохімічне визначення концентрації білка.

Зв'язок роботи з науковими темами кафедри. Робота виконана в рамках ініціативної теми кафедри біології людини та імунології «Дослідження впливу цитокінів в умовах *in vitro*» (№ державної реєстрації 0120U101313).

Практичне значення. Отримані результати можна використовувати при викладанні курсів "Методи культури клітин і тканин", "Тренди біології та їх прикладне значення", " Біотехнологія" тощо.

Наукова новизна отриманих результатів: вперше зроблено порівняння синтетичної функції та рівня клітинної деструкції протягом періоду культивування у органотипових культурах печінки, головного мозку та скелетних м'язів.

РОЗДІЛ 1

ВИВЧЕННЯ ПИТАННЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР У ЯКОСТІ ТЕСТ-ОБ'ЄКТІВ

1.1. Культури клітин як об'єкт досліджень

Сучасна ветеринарія та біомедицина використовує різноманітні типи культур клітин для розробки лікарських засобів, вивчення токсичних речовин, виготовлення вакцин, вивчення механізмів міграції клітин, утворення новоутворень, пристосувальних реакцій тканин тощо.

Для вирішення кожної біомедичної та ветеринарної потреби розроблена велика кількість методів культивування та введення у культуру різноманітних тканин. Проте не втрачає своєї актуальності вдосконалення та подальша розробка нових методів культивування, нових клітинних ліній, створення мікрооточення та вдосконалення методів дослідження [18, 24].

Розвиток вірусології сприяло одночасному розвитку методів культури клітин і тканин, оскільки для культивування вірусів необхідні живі клітини. Розробка вакцин, вивчення властивостей вірусів сприяло розвитку клітинних технологій, особливо органних та клітинних культур.

Дослідження органотипових культур спинного мозку дозволили авторам припустити, що клітинна смерть оточуючих нейронів при тривалому культивуванні перезапускає внутрішню клітинну програму та призводить до проліферації та утворення нейрогенних стовбурових клітин. Органотипові культури органів центральної нервової системи є джерелом для виробництва нейросфер з подальшим диференціюванням їх клітин у різноманітні нейрони [19].

Клітинні ліній чи штами клітин є незамінними у дослідженнях, в яких планується проведення підрахунку кількості клітин, вивчення параметрів кривої росту популяції клітин, створення біосистем для титрування вірусних частик, вивчення взаємодій вірусів та клітин. Проте, використання клітинних культур має ряд обмежень, оскільки втрата мікрооточення клітинами *in vitro*, яке притаманне їм *in vivo*, гістологічних зв'язків призводить до втрати типового для цих клітин фенотипу, що утруднює трактування результатів експерименту [3].

Первинні клітинні культури – це культури клітин відразу після виділення і до проведення першого пересіву. Саме за допомогою первинних культур клітин нирок мавпи була створена вакцина проти поліомієліту. Первинні культури клітин можна отримувати як з тканин ембріонів, так із тканин дорослих тварин. Є декілька способів введення у культуру. Найчастіше ембріональні та інші тканини подрібнюють механічним шляхом чи за допомогою ферментів. У таких культурах будуть міститися суміші всіх клітин, які входять до складу цієї тканини. Такі первинні культури клітин людини та тварин застосовуються для різноманітних досліджень у вірусології, оскільки численні дослідження свідчать про можливість переносу отриманих результатів на культурах на макроорганізм [27].

Інший спосіб введення тканин у первинну культуру пов'язаний із ферментативною дезагрегацією. У такому випадку шматочки тканини обробляють протеолітичними ферментами та хелатуючими агентами. У якості протеолітичних ферментів використовують трипсин, колагеназа, еластаза тощо. У якості хелатуючого агента – розчин Версену. Частіше використовують фермент трипсин, проте для різних тканин інтенсивність протікання протеолітичної реакції буде різною. Окрім того, трипсин порівняно із іншими ферментами чинить більш агресивний вплив на клітини. Менш агресивним ферментом буде колагеназа, після проведення дезагрегації за допомогою колагенази

життєздатність клітин вища, ніж після застосування трипсину, проте вона має високу собівартість. Для правильного протікання дезагрегації високої якості можна застосовувати суміші ферментів, правильний рН середовища, температуру і т.д. Після дезагрегації від шматочка тканини залишаються невеликі конгломерати або дискретні клітини [27].

Первинні культури відрізняються легкістю отримання та є джерелом для виділення чистих клітинних ліній, штамів клітин та напрацювання великої кількості відносно стабільного матеріалу для тривалих та масштабних виробництв. Це досягається шляхом процедури субкультивування. Під час субкультивування первинні культури пересівають, таким чином продовжуючи тривалість їхнього існування [9].

Проте під час субкультивування відбувається поступовий відбір клітин, що мають найбільшу здатність до виживання і гомогенізація самої первинної культури за типами клітин. З одного боку, це стає основою для відбору певного штаму чи клітинної лінії, клонування клітин. Це є передумовою для виведення окремих клітинних ліній та створення масштабного біотехнологічного виробництва. З другого боку, субкультивування призводить до втрати чутливості до вірусів. Це також пов'язано із втратою фенотипу та гетерогенності клітин [9].

Органотипові культури зберігають гістологічні зв'язки тканини та підтримують фенотип клітин, що входять у їх склад. Органотипові культури більше підходять під визначення «ідеальна клітинна модель», оскільки життєдіяльність клітин у таких культурах максимально наближена до такої у досліджуваного об'єкта. Тобто, результати дослідження, які будуть отримані на органній культурі, можна переносити на результати, які би могли бути отримані при використанні досліджуваного об'єкта [6-10].

Використання органотипових культур має і ряд своїх недоліків. До таких недоліків слід віднести низьку життєздатність клітин внаслідок утруднення дифузії поживних речовин у шматочок тканини, обмеження міграції клітин із експланту чи зрізу, важкість підрахунку числа клітин, які входять до складу органотипової культури. Залишається важкість проведення дуже специфічних досліджень, таких як, наприклад, підрахунку численності зараження клітини, врожайність вірусів у органотипових культурах [9].

1.2. Особливості гістологічної будови тканин

1.2.1. Гістологічна будова печінки. Печінка є найбільшою залозою шлунково-кишкового тракту. Вона в організмі виконує ряд життєвих функцій, таких як знешкодження різних речовин метаболізму, інактивація гормональних та регулюючих речовин, лікарських та токсичних речовин. Окрім цього печінка приймає участь у синтезі альбуміні крові, протромбіну, фібриногену тощо. У печінці відкладаються про запас такі речовини як глікоген, жиророзчинні речовини [20].

Печінка є паринхімним органом, що складається з двох частин: строма та паренхіми. Строма формує капсулу органа та віддає трабекули углиб органа, поділяючи печінку на часточки. Строма утворена волокнистою сполучною тканиною.

Паренхіма печінки утворена печінковими часточками. За класичними уявленнями, печінкова часточка - це шестигранна призма (рис. 1.1), у центрі якої проходить центральна вена. По кутах шестигранної призми розташовуються печінкові тримали - часточкова вена, яка є відгалуженням воротної вени, часточкова артерія та жовчний протік (рис. 1.2). Кров до печінкової часточки приходить по системі воротної вени та печінкової артерії. Через систему

синусоїдальних капілярів, які розташовуються поміж гепатоцитів, кров проходить до центральної вени. Паралельно току крові йде утворення жовчі [20].

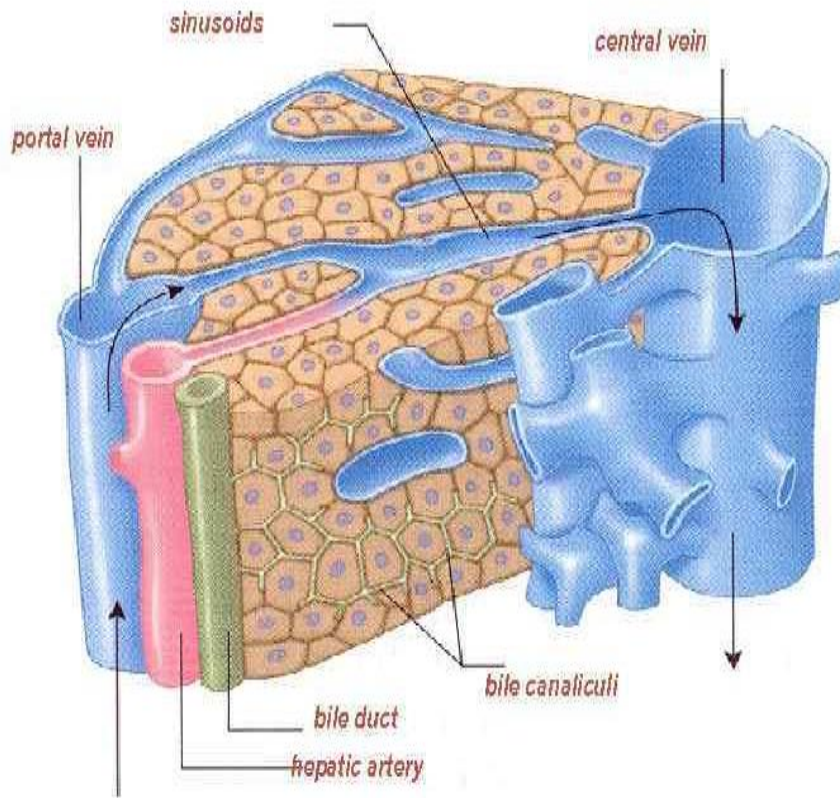


Рис. 1.1 – Будова печінкової часточки [20]

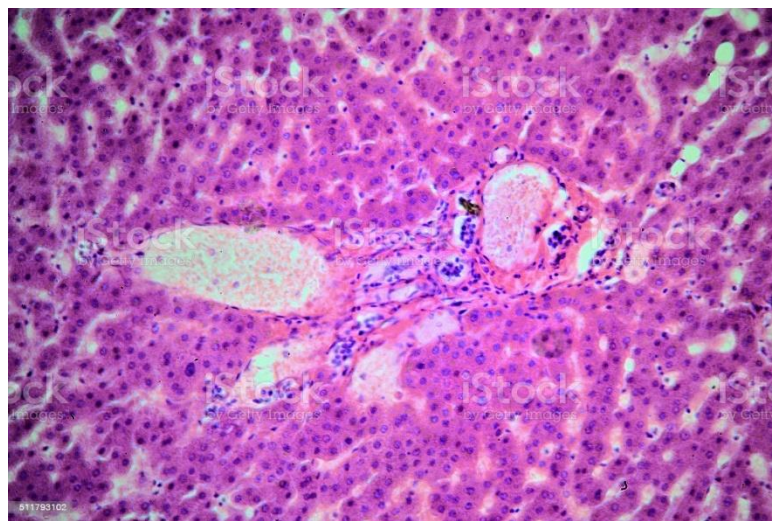


Рис. 1.2 – Тріади печінки [20]

Основні клітини печінки - гепатоцити. Вони формують балочки, між якими розташовані синусоїдальні та жовчні капіляри. Окрім гепатоцитів у паренхімі печінки зустрічаються зірчасті клітини, клітини Купфера, ямкові клітини (рис. 3.1).

Гепатоцитів мають кубічну чи призматичну форму. В цитоплазмі міститься одне чи два ядра з розвинутим еухроматином та одним ядерцем. В цитоплазмі розвинений синтетичний апарат. Гепатоцитів бувають світлі - спеціалізується на синтезі вуглеводів та ліпідів, та темні, що спеціалізуються на синтезі білків. Гепатоцитів мають два полюси - васкулярний та біліарний. Васкулярний полюс обернений у сторону судин та має безліч транспортних каналів. Біліарний полюс обернений у жовчний капіляр та приймає участь в утворенні жовчі [25, 28].

Гепатоцити приймають участь у збереженні та синтезі білків, метаболізмі вуглеводів та жирів, утворюють жовчні кислоти, приймають участь у детоксикації та жовчеутворенні.

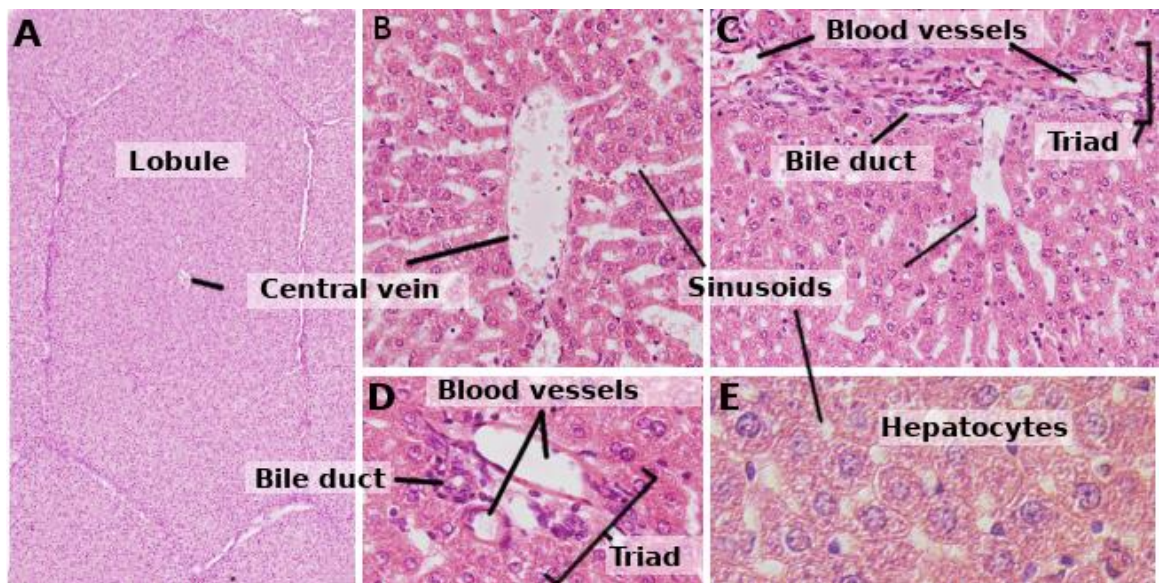


Рис. 3.1 – Гістологічна будова печінки [24]

Клітини Купфера (рис. 1.4) відносяться до макрофагічної системи організму. Вони є макрофагами печінки та виконують захисну функцію. Клітину Купфера фагоцитують еритроцити, здійснюють імунні функції у печінці, захищають від бактерій. Ці клітини розташовуються біля ендотеліоцитів синусоїдальних капілярів.

Ямкові клітини, або ріт-клітини, розташовуються біля ендотеліальних клітин. У цитоплазми цих клітин присутні секреторні гранули. Ці клітини також як і Клітини Купфера походять із стовбурової клітини крові і являють собою великі лімфоцити. Ці клітини є природними кілерними клітинами. Також мають секреторну активність. Під час ушкодження печінки ці клітини винищують гепатоцитів, але під час протікання відновних процесів у печінці вони виконують функцію підсилення проліферації.

Дослідженнями [21], було показано, що зниження активності АЛТ та АСТ з одночасним збільшенням рівня білка у тварин, що втратили частину печінки та проходили лікування мультипотентними мезенхімальними стовбуровими клітинами корелювало зі збільшенням кількості гепатоцитів за рахунок збільшення диференціювання їх із зірчастих клітин.

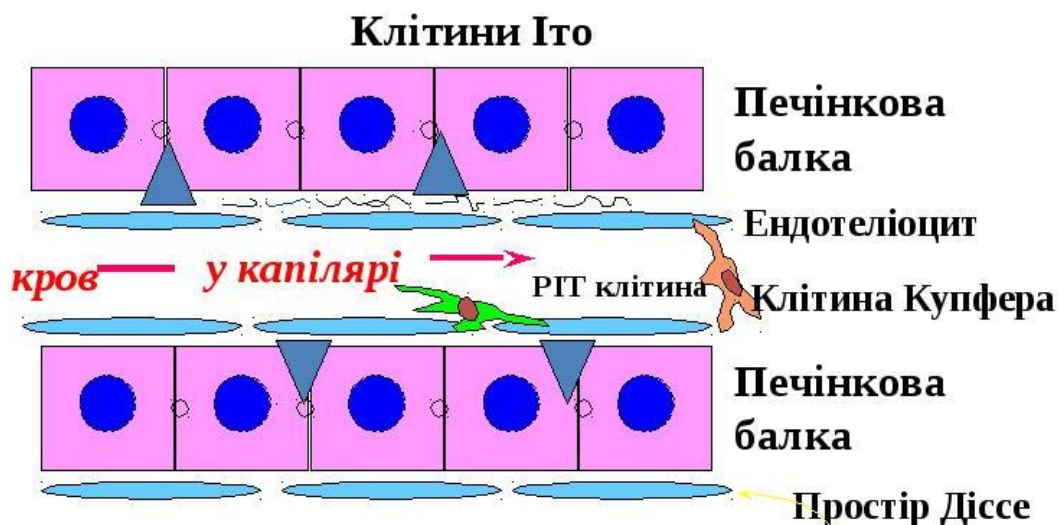


Рис. 1.4 – Схематичне зображення розташування різних клітин печінки [20]

Зірчасті клітини, або клітини Іто, ліпоцити, розташовуються в стінці синусоїдальних капілярів. Ці клітини мають відросчасту форму та жирові гранули у цитоплазмі, що містять вітамін А. Ці клітини походять із мезенхіми та мають спільне із фібробластими сполучної тканини походження. Вони можуть трансформуватися у міофіброласти. Зірчасті клітини підтримують ріст та проліферацію гепатоцитів. Жирове переродження печінки - цирроз - часто пов'язаний з порушення діяльності цих клітин.

1.2.2 Гістологічна будова скелетного м'язу. Скелетний м'яз зовні вкритий фасцією, що утворена щільною волокнистою сполучною тканиною. Під фасцією розташовуються пучки третього порядку, оточені епімізієм - щільною волокнистою сполучною тканиною. Пучки третього порядку складаються з пучків другого порядку, оточених перимізієм, пухкою сполучною тканиною. Пучки другого порядку складаються із пучків першого порядку, оточених ендомізієм, тонким шаром пухкої волокнистої тканини [26]. Пучки першого порядку представляють собою м'язові волокна (рис. 1.5).

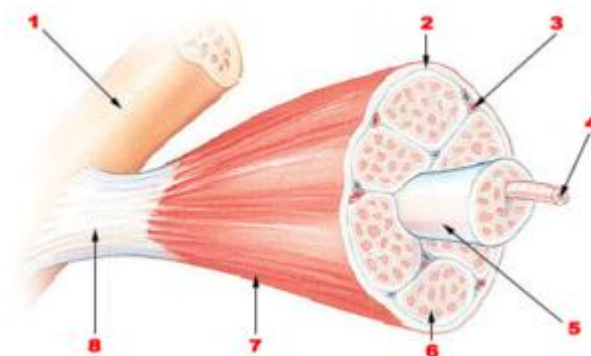


Рис. 1.5 – Гістологічна будова скелетного м'язу [26]

1 – кістка, 2 – епімізій, 3 – перимізій, 4 – м'язове волокно, 5 – пучок II порядку, 6 – ендомізій, 7 – фасція, 8 – сухожилок.

М'язове волокно – це симпласт та міосателітоцити, що мають спільну базальну мембрану (рис. 1.6). Симпласт являє собою гістологічну структуру, що утворюється внаслідок злиття міобластів під час ембріонального періоду. Довжина одного міосимпласту може сягати декількох сантиметрів, а товщина - всього лише до 150 мкм.

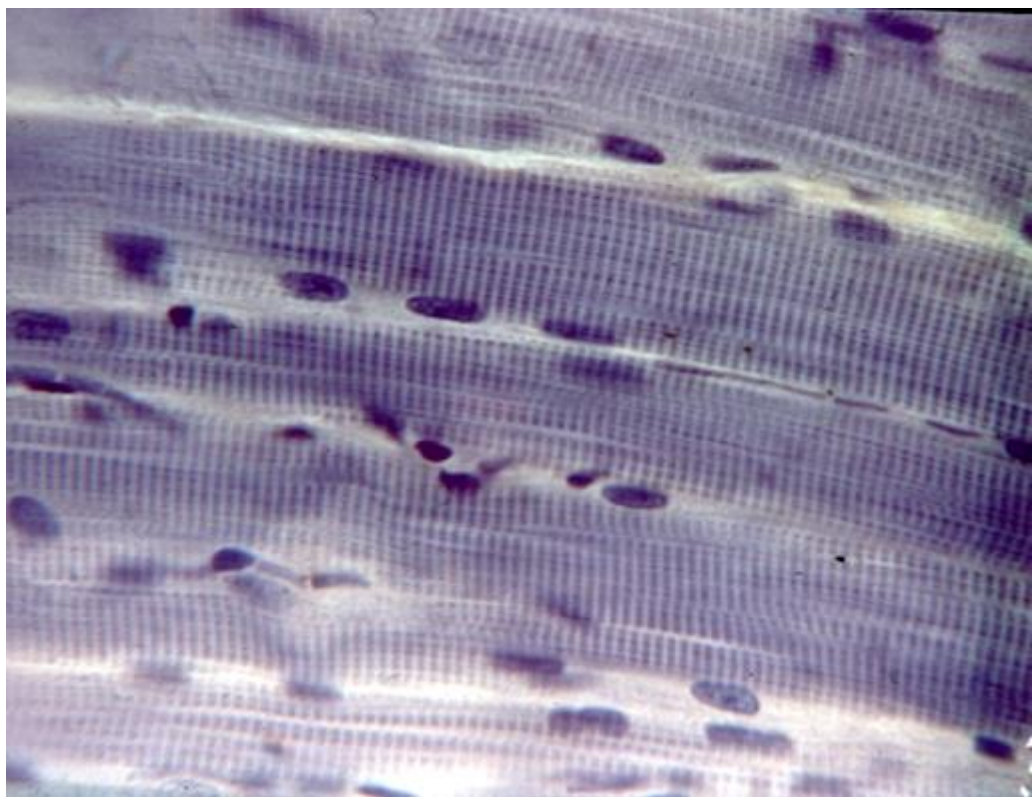


Рис. 1.6 – Мікрофотографія поперечнопосмугової м'язової тканини [20]

Міосимпласту містить численні ядра (до 200 у одному симпласті), що розташовуються під плазмолемою. Окрім типових органел міосимпласту містить спеціалізовані, необхідні для скорочення органели. Це саркоплазматична сітка, т-трубочки та міофібрили.

Саркоплазматична сітка представляє собою видозмінену ендоплазматичну сітку, яка акумулює в середині йони кальцію, що необхідні для м'язового скорочення. Саркоплазматична сітка оточує міофібрили.

Міофібрили представлені міофіламентами двох типів - тонкий та товстий. Тонкий міофіламент складається із білка актину та тропоміозину. Товстий міофіламент складається з білка міозину [2].

T-трубки разом з двома цистернами саркоплазматичної сітки утворюють тріади м'язових волокон. T-трубочки представляють собою вгинання плазматичної мембрани для швидшого проведення збудження (рис. 1.7).

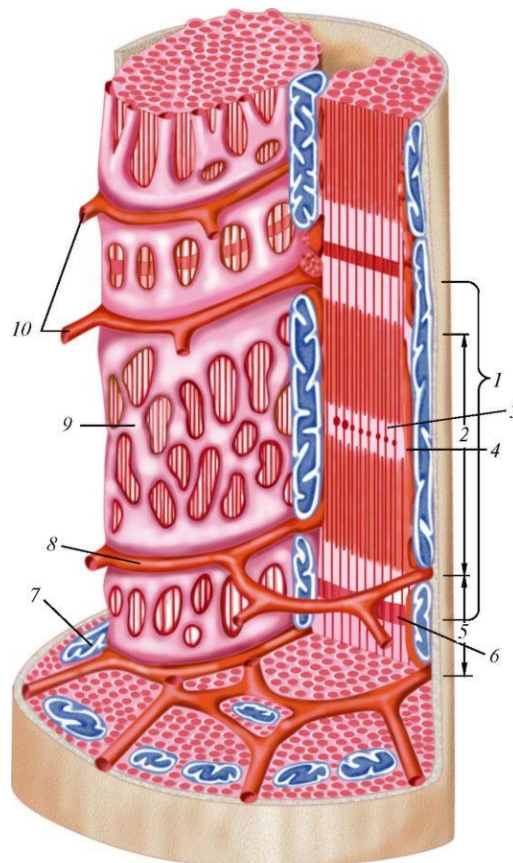


Рис. 1.7 – Ультраструктура м'язового волокна

1 – саркомер, 2 – анізотропний диск, 3 – H-зона анізотропного диску, 4 – мезофрагма, 5 – ізотропний диск, 6 – телофрагма, 7 – мітохондрії, 8 – T-трубочки, 9 – саркоплазматична сітка.

Міосателітоцити є міобластами. Вони є одноядерними клітинами з невеликим розміром. Розташовуються безпосередньо під базальною мембраною м'язового волокна. Міосателітоцити є джерелом відновлення м'язових волокон, тобто є стовбуровими клітинами м'язових волокон. Саме за їхній рахунок буде відбуватися відновлення м'язових тканини. Проте ці клітини розмножуються дуже повільно і м'язова тканина заміщується сполучною тканиною. Створення умов для швидкої проліферації міосателітоцити та повного відновлення м'язової тканин є актуальною медико-біологічною проблемою.

Сполучна тканина скелетних м'язів містить багато колагенових волокон та фіброblastів, що переходять у сухожилля, в якому фіброblastи заміщується тендиноцитами (рис. 1.8).

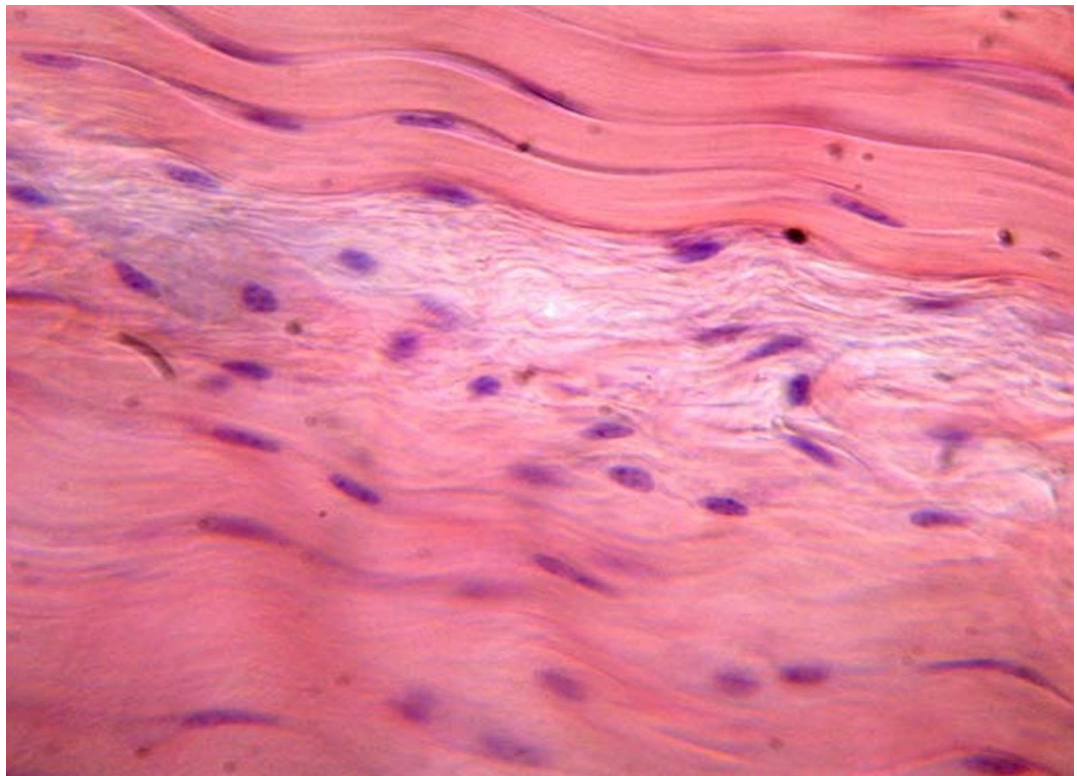


Рис. 1.8 – Гістологічна будова сухожилка

1.2.3. Гістологічна будова головного мозку. В основі органів центральної нервової системи, до якої відноситься головний мозок,

лежить нервова тканина. Нервова тканина складається з двох компонентів - нейронів та нейроглії. Нейрони виконують функцію генерації, проведення та передачі нервового збудження, що лежить в основі регуляції, координації процесів нервової системи, збереження, обробки та передачі інформації, тобто процесів пам'яті, уваги, поведінки.

Нейрони складається з тіла (перікаріону) та відростків (рис. 1.9). У тілі нейрона знаходяться його органели - ядро, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі та органели спеціального призначення - нейрофіламенти. Нейрофіламенти являють собою елементи цитоскелету, які заповнюють тіло нейрона та його відростки, створюючи жорсткий каркас для дуже довгих, розгалужених відростків [17].

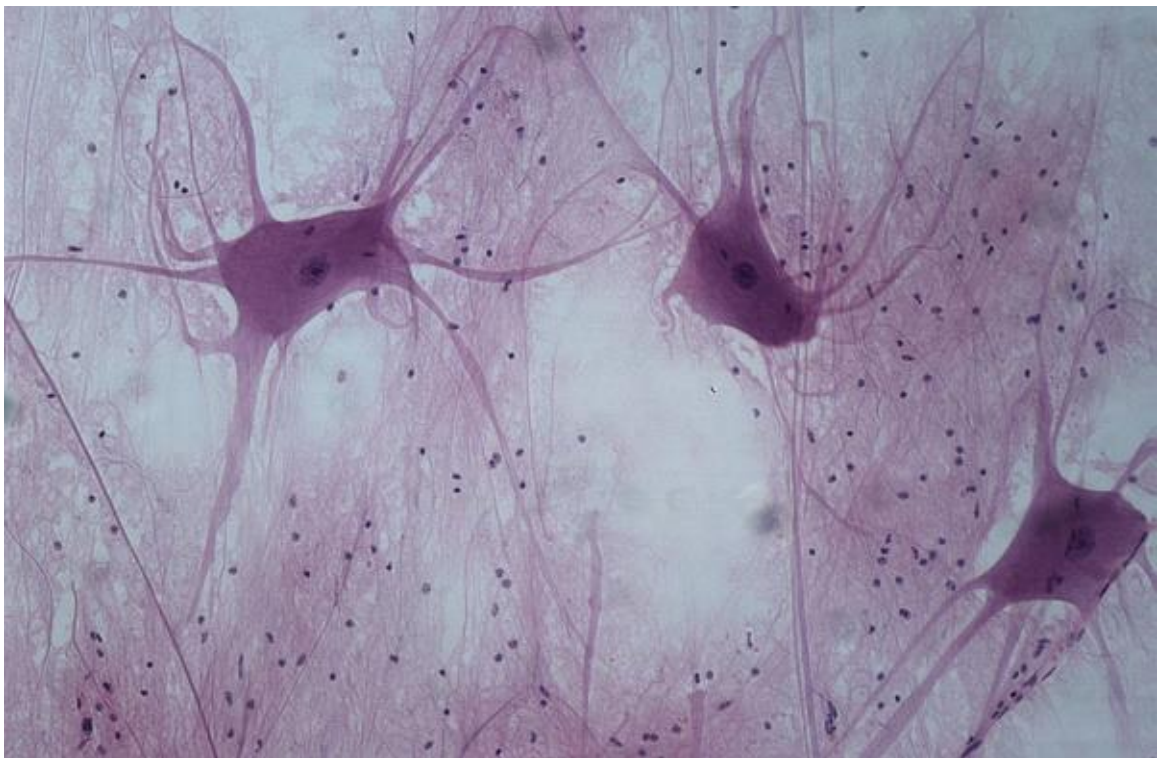


Рис. 1.9 – Гістологічна будова нервової тканини

Відростки бувають двох типів - аксон та дендрити. Аксон у нейрона завжди один. По ньому відбувається проведення нервового

імпульсу від тіла нейрона до цільового органу чи іншого нейрона. Аксон має однаковий діаметр по всій довжині. У середині містяться нейрофібрили, мітохондрії та пухирці з нейромедіатором. На кінці аксону формується аксонна терміналь - сильне прикінцеве розгалуження, на кінцях якого утворюється пресинаптична мембрана синапсу.

Другий відросток – дендрити. Він може бути один, два чи багато, в залежності від функції, що виконується нейроном. Дендрити взагалі може бути відсутній, тоді у нейрона тільки один відросток - аксон. Дендрити проводить нервовий імпульс до тіла нейрона. Дендрити сильно галуздяться та відбувається поступове зменшення їхнього діаметру. Дендрити є "рецепторами полем" нейрона. На них закінчуються аксони інших нейронів. Вони приймають участь у формуванні пресинаптичної мембрани. У дендритах знаходиться ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії. Їх кількість поступово зменшується зі зменшенням діаметру дендриту.

Нейроглія представлена чотирма типами клітин: олігодендроцити, астроцити, епендимоцити та мікроглія. Олігодендроцити виконують роль ізоляції та трофіки нервових волокон. За межами центральної нервової системи вони перетворюються на шваннівські клітини та огортають відростки нервових волокон по їх ходу. Олігодендроцити приймають участь в трофіці та відновленні нервових відростків, у процесах проведення нервового імпульсу у якості ізолюючих клітин для перешкоджання шунтуванню електричного струму під час проходження по нервовому волокну [12].

Астроцити представляють собою відросчасті клітини. Одним відростком вони контактують із базальною мембраною капіляра, а іншим - із нейроном. Всі поживні речовини, необхідні для життєдіяльності нейрона, та його метаболіти, надходять до нейрона через цитоплазми астроцита. Нейрони не контактує із капілярами та

кров'ю. Тобто астроцити створюють гематоенцефалічний бар'єр. Астроцити виділяють багато факторів, що впливають на ріст та розвиток нейронів, особливо, під час ембріонального періоду. У свою чергу, астроцити отримують від нейронів багато факторів росту, що впливає на їхній розвиток та ріст, а також процеси диференціювання із нейрональних стовбурових клітин (рис. 1.10).

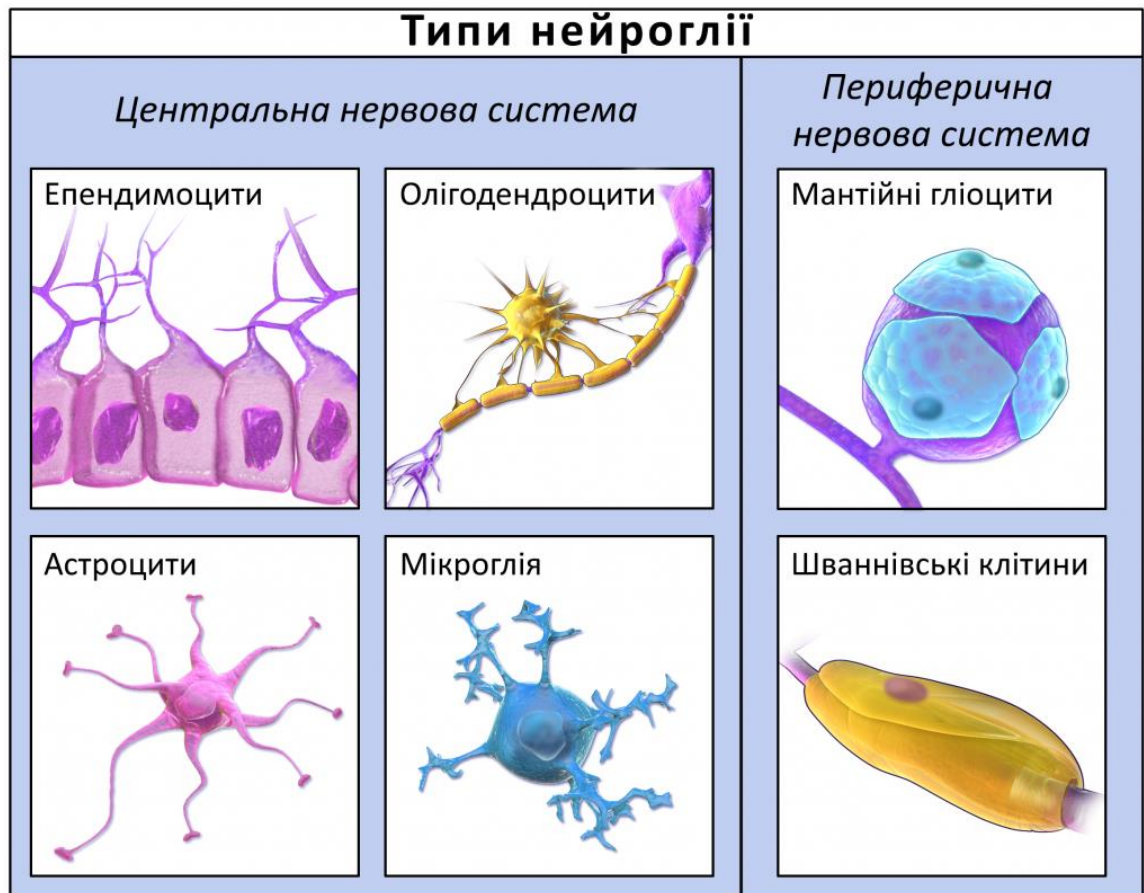


Рис. 1.10 – Типи нейроглії

Епендимоцити виставляють спинномозковий канал та шлуночки мозку. Вони відмежовують нервову тканину від ліквору. Епендимоцити приймають участь в утворенні ліквору, підтримки його кількості та хімічного складу. За морфологією вони нагадують епітеліальні клітини. Епендимоцити формують щільний ряд ряд клітин, не проникних для ліквору. Між клітинами наявні численні адгезивні контакти, що виконують ізолюючу функцію. Також епендимоцити

виробляють усі компоненти ліквору та забезпечують його сталість (рис. 1.11) [12-14].

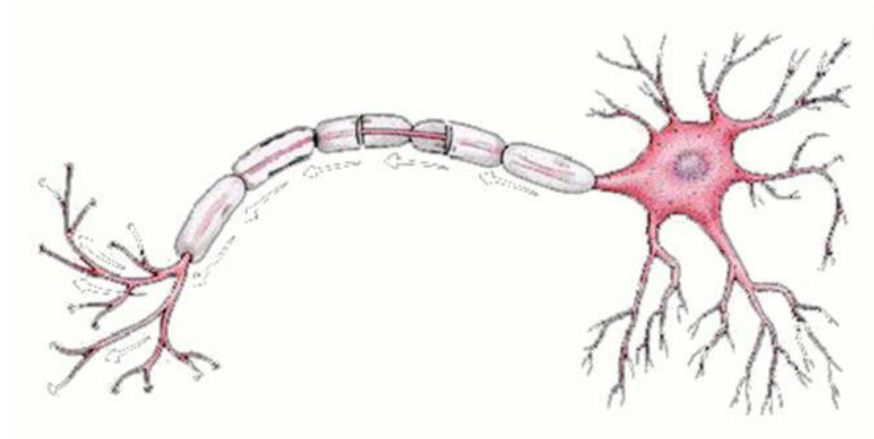


Рис. 1.11 – Шванівські клітини у мієлінізованому волокні

Мікроглія представляє собою макрофаги нервової системи (рис. 1.12). Це дрібні відросчасті клітини, що здатні до фагоцитозу. Вони можуть бути у двох станах - пасивному та активованому. Під час інфікування органів центральної нервової системи, масової загибелі нервових клітин, крововиливу у нервову тканину кількість мікрогліоцитів збільшується та вони стають активованими. Ці клітини походять від стовбурової гемопоетичної клітини.

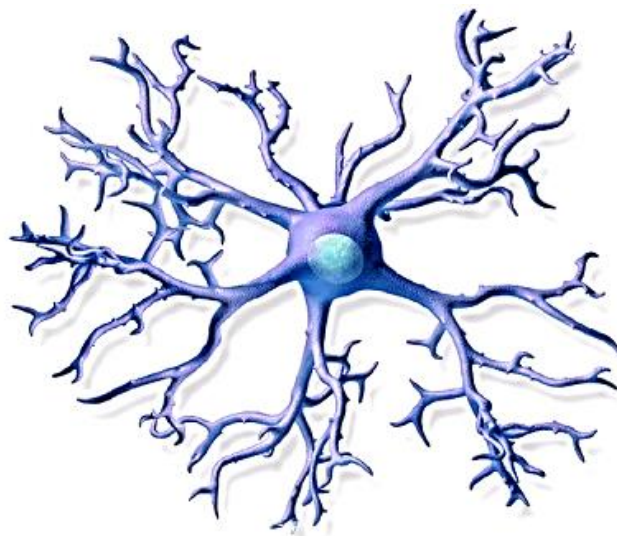


Рис. 1.12 – Клітина мікроглії

1.3. Використання органотипових культур клітин у дослідженнях Органотипові культури нервової системи.

Органотипові культури зрізів пренатального мозку, спинномозкових гангліїв, гангліїв симпатичної та парасимпатичної систем широко використовують для вивчення особливостей центральної та периферійної нервової системи. У таких культуральних системах відкривається можливість дослідження розвитку органів нервової системи, вивчення окремих патологій цих органів) [13].

Так, досліджуючи органотипові культури нервової тканини Никандров В.Н., виявив у нервовій тканині рецептори, що активізуються протеїнкіназами (PAR) такими як трипсин, тромбін, тобто ці речовини виявили властивості місцевих гормонів з ауто- та апокринним шляхом регуляції [13].

Було показано, що такі ферменти як стрептокіназа та плазміноген мають вплив на активізацію розщеплення супероксидних радикалів, впливають на чутливість нейронів та синаптогенез. При стимуляції органотипових культур спинного мозку плазміногеном та стрептокіназою було показано збільшення кількості клітин, що морфологічно були відмінними від астроцитів та мали виражений тигроїд при забарвленні за методом Ніссля.

Іншою групою вчених на органотипових культурах ембріональної нервової тканини було продемонстровано стійкість нейронів до нормобаричної гіпоксії під час впливу інтенсивного електромагнітного шуму.

На органотипових культурах нервової тканини було вивчено вплив інсуліноподібного фактору росту, його здатність збільшення проліферації у культурах клітин. Т.О.Palmer (2000) на органотипових культурах гіпокампа дорослих щурів показав регуляцію міграції та проліферації нервових стовбурових клітин та необхідні гомокринні та паракринні фактори для підтримки їхнього стовбурового потенціалу та

створення умов для диференціювання у клітини нейроглії та нейробласти.

Р.С.Ногг (2004) вивчав на органотипових культурах головного мозку щурів рівень електричного потенціалу спокою клітин-попередників нейробластів та фактори, які будуть впливати на деполяризацію та гіперполяризацію цих клітин [23].

Органотипові культури печінки.

Культивування гепатоцитів є актуальною проблемою, оскільки це може стати підґрунтям для розробки методів аутотрансплантації. Проте їх культивування викликає певні складнощі. Самі методи введення гепатоцитів у культуру пов'язані із великою загибеллю цих клітин. Під час культивування відбувається втрата фенотипу та заміна поверхневого антигенного апарату, що створює додаткові складнощі під час культивування.

Дослідженнями було показано, що додаючи окремі добавки до поживного середовища можна суттєво збільшити виживаємість клітин. Так, наприклад, внесення екстрактів тканин печінки, що знаходиться в стадії регенерації, суттєво збільшила виживаємість та проліферацію клітин.

Отже, використання органотипових культур різних органів є надійним джерелом отримання експериментальних даних стосовно досліджень розвитку тканин та органів в умовах норми та патології. У вивчаємих нами тканин по-різному відбувається регенерація, а отже і введення у культуру клітин буде відбуватися також по-різному.

Так, тканини печінки дуже гарно регенерують та за фізіологічних умов можливе повне відновлення печінки. У тканині печінки є стовбурові клітини та малодиференційовані гепатоцити, що забезпечать нпроліферацію та відлновлення у випадку втрати великої

кількості клітин. Отже, у культурі клітин також повинен спостерігатися гарний ріст при створення оптимальних умов для проліферації та диференціювання гепатоцитів.

Нервова тканина має виражену внутрішньоклітинну проліферацію та низький рівень відновлення нейронів. Раніше вважалося, що нейрони не здатні до регенерації взагалі, проте дослідження останніх років показали, що у ділянці гіпокампа, нюхової цибулини зберігаються нейрогенні стовбурові клітини, що, за певних умов, здатні диференціюватися у нейрони та клітини нейроглії. Проте, диференціювання нейрогенних стовбурових клітин у нейрони – це складний багатофакторний процес. Але сама можливість утворення нових нейронів відкриває багато можливостей у лікуванні різноманітних нейродегенеративних захворювань.

Скелетна м'язова тканина також відноситься до тканин, що мають слабкий регенераторний потенціал. У м'язовій тканині є стовбурові клітини, які відносять до міобластів – міосателітоцити, проте ці клітини проліферують та диференціюються дуже повільно, тому при великій втраті м'язової тканини у м'язі повноцінне відновлення неможливе. Проте, створення оптимальних умов для швидкої проліферації міосателітоцитів дасть можливість створення алгоритмів лікування для повноцінного відновлення втрат м'язової тканини [13].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР

2.1. Введення у культуру

Для досягнення мети роботи та з'ясування зміни біохімічних показників органотипових культур печінки, м'язів та головного мозку ми проводили культивування органотипових культур протягом 14 діб.

Для введення у органотипову культуру відбирали самців білих безпорідних лабораторних мишей. Після евтаназії у ламінарній шафі проводили забір органів (печінки, м'язів та головного мозку). Органи відмивали від крові за допомогою фізіологічного розчину, відділяли сполучну тканину, жирову тканину та візуально помітні пошкодження тканини. Після цього органи нарізали на зрізи товщиною не більше 1 мм та поміщували у поживне середовище у сцинтиляторі флакони.

У якості середовища для культивування використовувалося поживне середовище DMEM із додаванням 15% телячої сироватки та антибіотика гентаміцин у концентрації 40 мкл/мл.

DMEM є середовищем Ігла, яке модифіковане за способом Дульбекко. Використовують у якості базового поживного середовища. Більша частина клітин ссавців мають гарні показники росту при культивуванні у поживному середовищі DMEM. Особливо успішно культивуються у цьому поживному середовищі нейрони, гліоцитів, фібробластів та гладеньки м'язові клітин.

Телячу сироватку отримують з плодів або ембріонів корів. Вона є необхідним компонентом більшості культуральних середовищ. У сироватці містяться білки, склад яких досі до кінця не вивчений. Ті складники білкової фракції сироватки, які вивчені, не мають такого позитивного впливу на ріст культур клітин, який має застосування сироватки. Додавання телячої сироватки необхідно також необхідно

для забезпечення культур клітин необхідними факторами росту. Додавання телячої сироватки дозволяє підвищити виживаємість клітин у культурі, зменшити пошкодження клітин при різноманітних маніпуляціях з клітинами в лабораторії.

Антибіотики у середовище для культивування додають для припинення росту грибів та бактерій. Культивування клітин потрібно виконувати в умовах повної асептики. Через складність запобігання контамінації культур клітин в поживне середовище додають антибіотики у невеликих концентраціях необхідних для припинення росту бактеріальної клітини, проте, вплив на процеси життєдіяльності клітин у культурі повинен бути мінімальним. Гентаміцин є антибіотиком широкого спектру дії, ефективний як проти грампозитивних, так і проти грамнегативних бактерій. Механізм дії гентаміцину полягає у блокуванні утворення рибосомальних субодиниць 30S. Оскільки рибосоми прокаріотів та еукаріотів розрізняються, то вплив на клітин еукаріотів гентаміцином мінімальний.

Культивували органотипові культури впродовж 14 діб. Дослідження біохімічних показників робили на 7 та 14 добу (рис. 2.1, рис. 2.2).

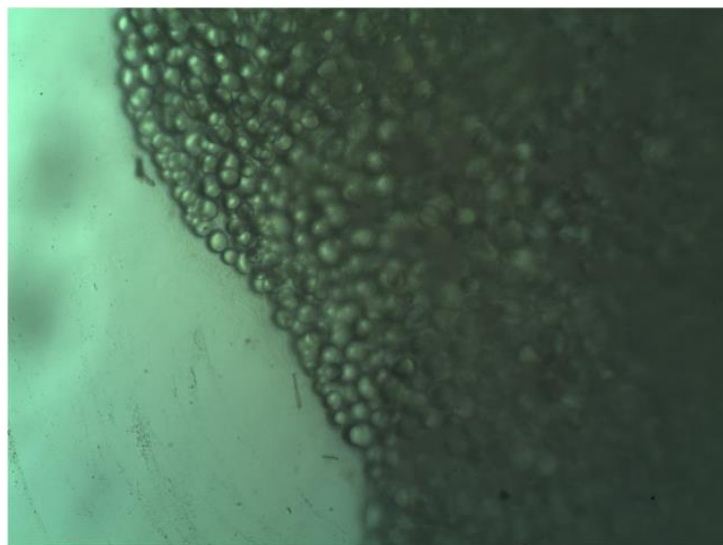


Рис. 2.1. – Органотипові культури печінки на 14 добу
культивування

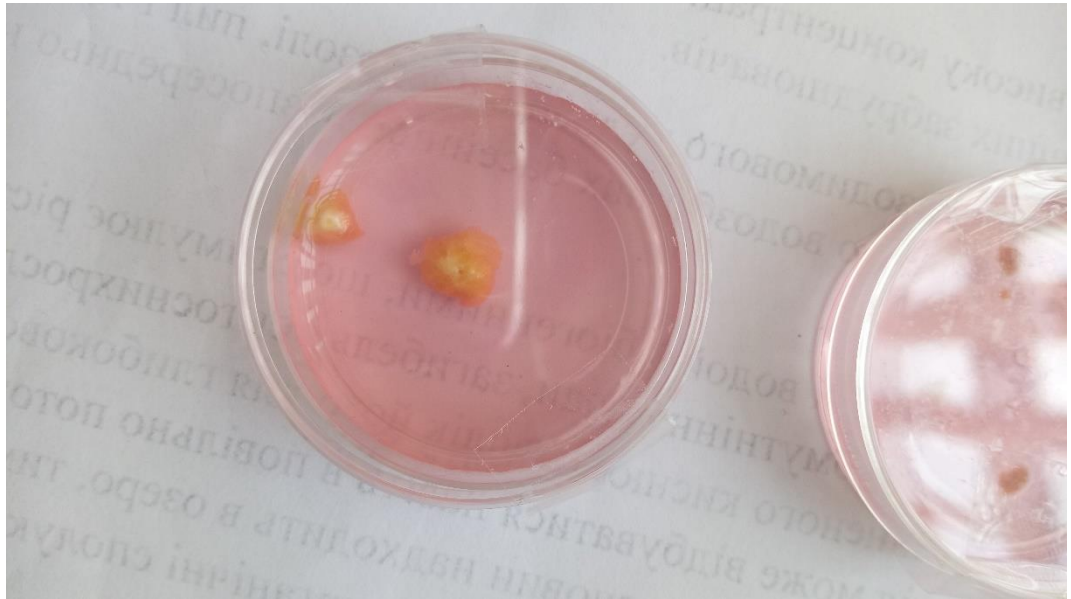


Рис. 2.2 – Органотипові культури нервової системи

2.2. Дослідження біохімічних показників органних культур

Для дослідження зміни біохімічних параметрів протягом періоду культивування робили дослідження гомогенату та культуральної рідини. У якості біохімічних маркерів використовували концентрацію АЛТ, АСТ та білку.

Приготування гомогенату органних культур. Флакони вскривали, виймали органотипові культури, відважували 0,125 г тканини та поміщували у фарфорові ступки. та додавали 0,5 мл фізіологічного розчину. Фарфоровим пестиком інтенсивно розтирають тканину до утворення гомогенату. Потім центрифугують при 3000 об/хв 10 хвилин. Для дослідження використовують надосадову рідину.

АЛТ - аланінамінотрансфераза - є внутрішньоклітинним ферментом, що каталізує переніс аміно групи з амінокислоти аланіна на альфа-кетоамінокислоти оксоглутарат з утворенням нової амінокислоти глутамата та пірувата. Піруват ферментом лактатдегідрогеназою окислюється до утворення лактата та

еквівалентних кількостей НАД⁺. Принцип визначення активності фермента заснований на визначенні кількості лактата та окиснення еквівалентної кількості НАДН до НАД⁺. Концентрація визначається шляхом вимірювання рівня зниження оптичної щільності при 340 нм на спектрофотометрі.

АСТ - аспаратамінотрансфераза - це фермент, який виявляє найбільшу активність у клітинах серця та печінки, проте наявний у всіх клітинах. АСТ каталізує реакція переносу аміно групи з аспартату на альфа-оксоглутарат з утворенням глутамату та оксалоацетат. Принцип визначення заснований на ферментативному розкладанні пірувату до лактату з утворенням окисненої форми НАД⁺. Вимірюється оптична щільність на спектрофотометрі при довжині світлової хвилі 380 нм.

Оскільки і АЛТ, і АСТ є внутрішньоклітинними ферментами, їх вихід у культуральне середовище буде пов'язано із руйнуванням клітинної стінки та виходом ферменту у позаклітинний простір. Тобто, зростання активності ферментів вказує на клітинну деструкцію.

Для визначення активності АЛТ та АСТ проводять додавання реагентів по схемі (табл.2.1). Вимірювання проводять на спектрофотометрі проти холостої проби. Для визначення активності фермента вимірне значення коефіцієнта екстинції переводять у одиниці активності за калібрувальною кривою.

Таблиця 2.1

Схема постановки ферментативної реакції для визначення активності АЛТ та АСТ

Реагенти	дослідна проба, мл	холоста проба, мл
субстратний буфер (різний для АЛТ та АСТ)	0,1	,01
інкубувати 3 хвилини при 37 С ⁰		

стоп-реагент	-	0,1
культуральне середовище	0,02	0,02
інкубувати 60 хвилин при температурі 37 C ⁰		
стоп-реагент	0,1	-
інкубувати 20 хвилин при кімнатній температурі		
розчин гідроксиду натрія	1,0	1,0

Визначення концентрації білка у гомогенаті потрібно для з'ясування синтетичної активності клітин у культурі. Визначення концентрації білку у гомогенаті культури робили колориметричним способом. Реакція заснована на тому, що білки у лужному середовищі з йонами міді утворюють комплексні сполуки фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення прямопропорційна вмісту білка. До гомогенату доливають біуретовий реактив за схемою (табл. 2.2) та інтенсивно збовтують пробірку, уникаючи утворення піни. Потім інкубують при кімнатній температурі впродовж 30 хвилин. Вимірювання інтенсивності забарвлення проводять на спектрофотометрі при довжині хвилі 540-580 нм.

Таблиця 2.2

Схема постановки біуретової реакції для визначення білка

Реагенти	дослідна проба, мл	контрольна проба, мл
біуретовий реагент	2	2
гомогенат культури клітин	0,04	-
фізіологічний розчин	-	0,04

Для обчислення концентрації білка робили наступний розрахунок за формулою (2.1):

$$(2.1) \quad C = \frac{E_o}{E_k} \times 60,$$

де C - концентрація білка.

E_o - оптична щільність дослідної проби,

E_k - оптична щільність контрольної проби

60 – концентрація загального білка у калібрувальному розчині, г/л

Після розрахунків був проведений первинний математичний аналіз, в результаті якого обчислили середнє значення та середньоквадратичне відхилення. Статистичний аналіз проводили за допомогою пакетів математичного аналізу Excel/

РОЗДІЛ 3

ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Зміни концентрації білка та активності трансфераз в залежності від типу культури.

Для вивчення зміни біохімічних показників протягом періоду культивування органотипових культур печінки, мозку та м'язів досліджували зміни концентрації білка та амінотрансфераз на 7 та 14 добу.

Концентрація білка (табл. 3.1, рис. 3.1) на 7 добу культивування була найбільшою для органотипових культур головного мозку ($5,62 \pm 0,11$ г/л), найменшою - у органотипових культур скелетних м'язів ($4,17 \pm 0,08$ г/л). На 14 добу культивування спостерігалася зниження концентрації білка в усіх досліджуваних культурах приблизно вдвічі порівняно із аналогічними показниками на 7 добу культивування. При цьому найбільшими показники концентрації білку продемонстрували органотипові культури печінки ($2,29 \pm 0,05$ г/л), а найменшими - у органотипових культурах м'язів ($2,08 \pm 0,06$ г/л).

Таблиця 3.1

Зміна концентрації білку у органотипових культур протягом
періоду культивування, г/л

	органотипова культура печінки	органотипова культура мозку	органотипова культура м'язів
7 доба	$5,21 \pm 0,07$	$5,62 \pm 0,11$	$4,17 \pm 0,08$
14 доба	$2,29 \pm 0,05$	$2,19 \pm 0,03$	$2,08 \pm 0,06$

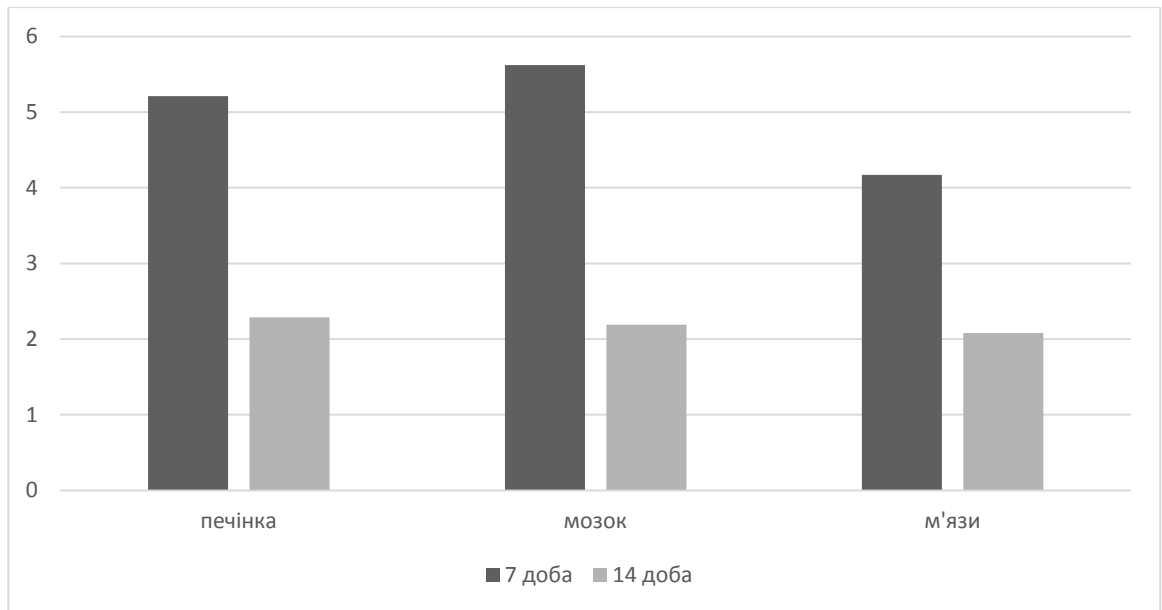


Рис. 3.1 – показники концентрації білка органотипових культур протягом періоду культивування (г/л)

Показники активності аланінамінотрансфераза на 7 добу були найвищими у органотипових культур скелетних м'язів ($1,89 \pm 0,02$ мкмоль/(год \times мл)). Найменші показники активності АЛТ спостерігалися в органотипових культурах печінки - $0,79 \pm 0,01$ мкмоль/(год \times мл). На 14 добу рівень активності ферменту падав в усіх досліджених органотипових культурах і був приблизно однаковий у всіх органотипових культурах (табл. 3.2, рис. 3.2).

Таблиця 3.2

Зміна активності АЛТ у органотипових культур протягом періоду культивування, мкмоль/(год \times мл)

	органотипова культура печінки	органотипова культура мозку	органотипова культура м'язів
7 доба	$0,79 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,02$	$1,89 \pm 0,02$
14 доба	$0,53 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$

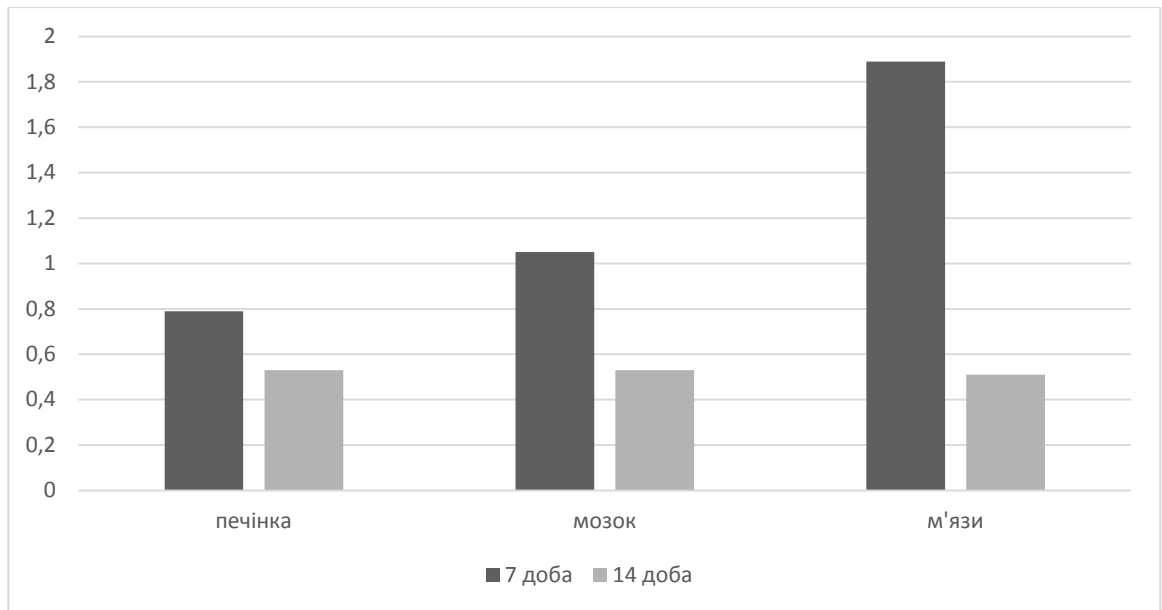


Рис. 3.2 – показники активності АЛТ органотипових культур протягом періоду культивування (мкмоль/(год×мл))

Показники активності АСТ на 7 добу культивування були найбільшими у органотипових культурах головного мозку - $3,9 \pm 0,04$ мкмоль/(год×мл), у органотипових культур печінки та скелетних м'язів показники активності АСТ були приблизно однакові - $0,129 \pm 0,01$ мкмоль/(год×мл) для органотипових культур печінки та $0,127 \pm 0,01$ мкмоль/(год×мл) для органотипових культур скелетних м'язів. На 14 добу культивування найбільші показники активності АСТ так і залишилися у органотипових культур головного мозку - $1,59 \pm 0,02$ мкмоль/(год×мл). Найменшу активність фермент виявляв у органотипових культурах скелетних м'язів - $0,13 \pm 0,01$ мкмоль/(год×мл). У досліджуваних органотипових культурах головного мозку суттєве зменшення показників активності АСТ. У органотипових культурах скелетних м'язів показники активності ферменту практично не зазнали змін - $0,13 \pm 0,01$ мкмоль/(год×мл) під час другого виведення (рис. 3.3, табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Зміна активності АСТ у органотипових культур протягом періоду культивування, мкмоль/(год×мл)

	органотипова культура печінки	органотипова культура мозку	органотипова культура м'язів
7 доба	0,129 ± 0,01	3,9 ± 0,04	0,127 ± 0,01
14 доба	0,55 ± 0,01	1,59 ± 0,02	0,13 ± 0,01

У органотипових культурах печінки активність АСТ на 14 добу дослідження, навпаки, зросла і стала дорівнювати $0,55 \pm 0,01$ мкмоль/(год×мл). Проте, найбільшими показники активності АСТ на 14 добу культивування так і залишилися у органотипових культур головного мозку.

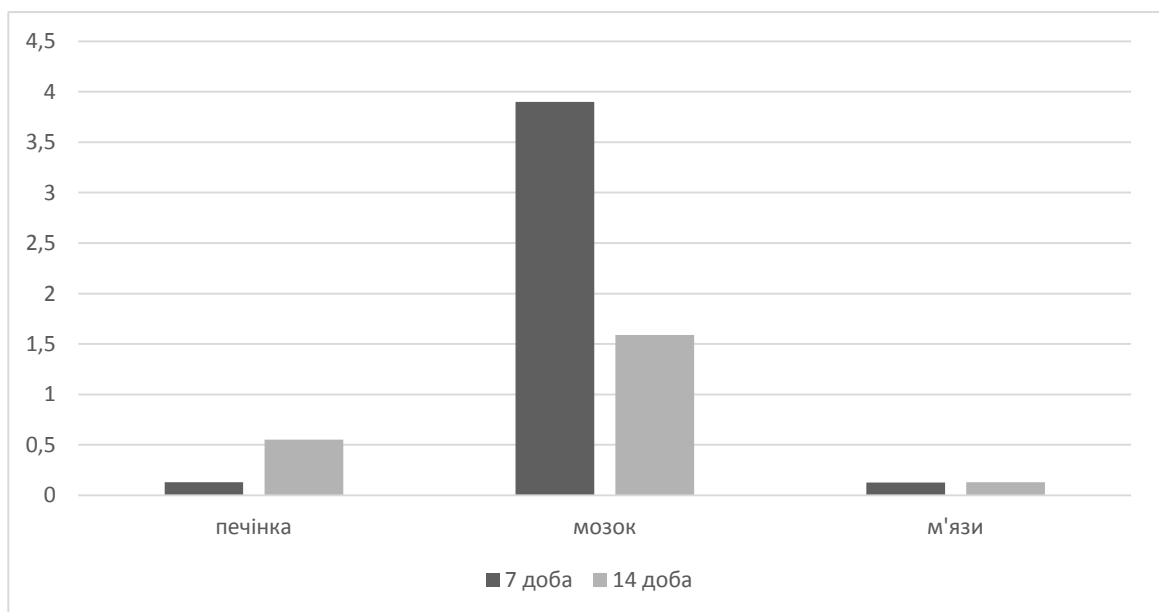


Рис. 3.3 – показники активності АСТ органотипових культур протягом періоду культивування (мкмоль/(год×мл))

Співвідношення між показниками АЛТ та АСТ відображує ступінь цитотоксичності впливу на культуру. У органотипових культурах

печінки активність АЛТ на 7 добу культивування переважала активність АСТ, тоді як на 14 добу культивування рівень активності АСТ збільшився, а АЛТ зменшився, що призвело до приблизно однакової активності обох ферментів.

У органотипових культурах головного мозку активність ферменту АЛТ була меншою за активність ферменту АСТ протягом всього періоду культивування. Хоча на 14 добу спостерігалось зменшення активності як АЛТ, так і АСТ, переважання активності АСТ так і зберіглося на 14 добу.

Органотипові культури скелетних м'язів продемонстрували збільшення активності АЛТ протягом всього періоду культивування, при чому співвідношення активності ферментів на 7 добу культивування було суттєво зсунуте у бік АЛТ і зниження активності цього ферменту на 14 добу культивування призвів до зменшення різниці активності, проте все одно переважала активність АЛТ над активністю АСТ.

Отже, нами з'ясовано, що протягом культивування органотипових культур показники концентрації білку зазнали суттєвого зниження у всіх органотипових культурах. Найбільша концентрація білку спостерігалася на 7 добу у органотипових культурах головного мозку, найнижчою - у органотипових культурах скелетних м'язів.

Показники активності АЛТ також зазнали зменшення протягом періоду культивування. Найбільш вираженим падінням активності ферменту спостерігалися у органотипових культурах скелетних м'язів. На 7 добу найбільшою активність АЛТ також була у органотипових культур скелетних м'язів, найменшою - у органотипових культурах печінки.

Показники активності АСТ у кожному виді органотипових культур зазнали різних змін: органотипові культури печінки продемонстрували збільшення активності ферменту протягом періоду

культивування, органотипові культури головного мозку, навпаки, продемонстрували зниження активності АСТ протягом періоду культивування. Показники активності АСТ органотипових культур скелетних м'язів залишалися практично без змін протягом всього періоду культивування.

Щодо співвідношення активності обидвох ферментів, то у органотипових культурах печінки спостерігалось переважання АЛТ на 7 добу культивування, у органотипових культурах головного мозку спостерігалось переважання АСТ протягом всього періоду культивування, а у органотипових культурах скелетних м'язів, навпаки, переважала за активністю АЛТ.

3.2. Обговорення отриманих результатів

Визначення концентрації білка безпосередньо пов'язана з оцінкою синтетичної активності клітини. Білки у клітині входять до складу біологічних мембран, утворюють рецептори, міжклітинні контакти, формують елементи цитоскелету, є ферментами чи регуляторними молекулами, переносниками тих чи інших молекул. Тобто, вони є основним будівельним матеріалом клітин. Окрім того, білки створюють осмотичний тиск міжтканинної та міжклітинної рідини, таким чином регулюють пружність тканин.

Різні тканини будуть різнитися за вмістом білка. Клітини печінки будуть містити багато ферментів, та багато синтезувати білків на експорт. Клітини м'язової тканини багаті на білки цитоскелету, такі як актин та міозин. Окрім того, у м'язовій тканини міститься багато білку колагену. Головний мозок у великій кількості містить білки цитоскелету - нейрофібрили. Окрім того, у нейронах та нейроглії буде багато ферментів внаслідок того, що ці клітини мають сильну метаболічну активність.

Клітини постійно оновлюють свої білки і у тих тканинах, які містять багато структурних білків чи ферментів синтетична функція виражена та залежить від надходження поживних речовин ззовні та від сприятливого чи несприятливого оточення для клітини.

Нами з'ясовано, що протягом культивування органотивих культур показники концентрації білку зазнали суттєвого зниження у всіх органотипових культурах. Найбільша концентрація білку спостерігалася на 7 добу у органотипових культурах головного мозку, найнижчою - у органотипових культурах скелетних м'язів. Очевидно, такі результати пов'язані з тим, що метаболічно активні тканини, такі як печінка та нервова тканина мали більш виражену синтетичну функцію, ніж посмугована-м'язова тканина. Внаслідок того, що під час культивування відбувається виснаження поживного середовища, то і синтетична активність тканин суттєво знижується наприкінці культивування.

Проте, результати дослідження синтетичної активності органотипових культур свідчить, що, за умови підтримки надходження поживних речовин, *in vitro* можна забезпечити такий самий рівень синтетичної активності, що притаманний вихідній тканині.

Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) безпосередньо пов'язана із цитолізом у органних культурах клітин. Ці ферменти виявляються у тканині печінки, серця, скелетних м'язах, нирках, головному мозку, еритроцитах тощо [29-31].

АЛТ та АСТ є внутрішньоклітинними ферментами, їх вихід за межі цитоплазми пов'язаний із збільшенням проникності мембрани клітини внаслідок ушкодження чи некрозу клітин. АЛТ є цитоплазматичним ферментом, АСТ - мітохондріальним. При чому збільшення активності АЛТ у позаклітинному просторі більше пов'язана із некротичними змінами тканин та руйнуванням плазмолемми

клітини, тоді як наростання активності АСТ у позаклітинному просторі більше пов'язано із цитотоксичними процесами та виходом ферментів із мітохондрій [15-16].

Показники активності АЛТ також зазнали зменшення протягом періоду культивування. Найбільш вираженим падіння активності ферменту спостерігалися у органотипових культурах скелетних м'язів. На 7 добу найбільшою активність АЛТ також була у органотипових культур скелетних м'язів, найменшою - у органотипових культурах печінки.

Показники активності АСТ у кожному виді органотипових культур зазнали різних змін: органотипові культури печінки продемонстрували збільшення активності ферменту протягом періоду культивування, органотипові культури головного мозку, навпаки, продемонстрували зниження активності АСТ протягом періоду культивування. Показники активності АСТ органотипових культур скелетних м'язів залишалися практично без змін протягом всього періоду культивування.

Співвідношення активності ферментів у органотипових культурах печінки спостерігалось переважання АЛТ на 7 добу культивування, у органотипових культурах головного мозку спостерігалось переважання АСТ протягом всього періоду культивування, а у органотипових культурах скелетних м'язів, навпаки, переважувала за активністю АЛТ.

Такий розподіл переважання активності трансаміназ може відображувати вразливість клітин різних культур. Тобто у органотипових культурах печінки та скелетних м'язів спостерігалось наростання протягом культивування рівня АЛТ швидше, ніж АСТ, а отже спостерігалось наростання проникності цитоплазми клітин, але без зростання рівня некрозу.

У клітинах органотипових культур головного мозку, навпаки, переважав рівень АСТ, оскільки активність цього ферменту може наростати при руйнуванні мітохондрій, то, очевидно, протягом періоду культивування клітини головного мозку гинули більше за інші види органотипових культур, тоді як у інших культурах спостерігалось падіння рівня життєдіяльності клітин. Можливо, такий розподіл активності трансаміназ пов'язаний із тим, що у тканинах печінки та м'язах більше стовбурих елементів та швидше протікають процеси регенерації, тоді як клітини нервової тканини регенерують дуже повільно і тільки у певних ділянках головного мозку.

ВИСНОВКИ

Нами було проведено дослідження динаміки показників синтетичної активності та клітинної деструкції у органотипових культурах печінки, головного мозку та скелетних м'язів протягом періоду культивування впродовж 14 діб.

1. З'ясовано, що протягом культивування органотипових культур показники концентрації білку зазнали суттєвого зниження у всіх органотипових культурах. Найбільша концентрація білку спостерігалася на 7 добу у органотипових культурах головного мозку, найнижчою - у органотипових культурах скелетних м'язів.
2. Встановлено, що показники активності АЛТ зазнали зменшення протягом періоду культивування. Найбільш вираженим падінням активності ферменту спостерігалися у органотипових культурах скелетних м'язів. На 7 добу найбільшою активністю АЛТ також була у органотипових культур скелетних м'язів, найменшою - у органотипових культурах печінки.
3. Виявлено, що показники активності АСТ у кожному виді органотипових культур зазнали різних змін: органотипові культури печінки продемонстрували збільшення активності ферменту протягом періоду культивування, органотипові культури головного мозку, навпаки, продемонстрували зниження активності АСТ протягом періоду культивування. Показники активності АСТ органотипових культур скелетних м'язів залишалися практично без змін протягом всього періоду культивування.
4. Встановлено, що співвідношення активності ферментів у органотипових культурах печінки спостерігалася переважання

АЛТ на 7 добу культивування, у органотипових культурах головного мозку спостерігалось переважання АСТ протягом всього періоду культивування, а у органотипових культурах скелетних м'язів, навпаки, переваскажала за активністю АЛТ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. Skeletal muscle satellite cell cultures. *Methods in cell biology*, 1997. 52, 155-176.
2. Freshney, I. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology*, 2001. 9-26.
3. Kartsogiannis, V., Ng, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*, 2004. 228(1-2), 79-102.
4. Madri, J. A., Williams, S. K. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *The Journal of cell biology*, 1983. 97(1), 153-165.
5. McCabe, P. F., Leaver, C. J. Programmed cell death in cell cultures. *Programmed cell death in higher plants*, 2000. 115-124.
6. McCARTHY, K. D., & De Vellis, J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *Journal of Cell Biology*, 1980. 85(3), 890-902.
7. Mishell, R. I., Dutton, R. W. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *The Journal of experimental medicine*, 1967. 126(3), 423.
8. Pallett LJ, Davies J, Colbeck EJ, Robertson F, Hansi N, Easom NJW, et al. IL-2 high tissue-resident T cells in the human liver: Sentinels for hepatotropic infection. *J Exp Med*. 2017; 214(6): 1567-80.
9. Shvets VA, Shkuropat AV. Effect of interleukin-2 on antioxidant system and lipid peroxidation during physical activity // *Cherkasy University Bulletin: Biological Sciences Series*. – Cherkasy, 2021. - №2. C.107-115.
10. V. SHVETS, A. SHKUROPAT, Y. PROSIANNIKOVA, I. GOLOVCHENKO. Effect of Interleukin-2 on the humoral link of

- immunity during physical activity // Journal of Physical Education and Sport ® (JPES), Vol 20 (Supplement issue 6), Art 427 pp 3153 – 3159, 2020 online ISSN: 2247 - 806X; p-ISSN: 2247 – 8051; ISSN - L = 2247 – 8051
11. Viegas-Crespo A. M. Hepatic elemental contents and antioxidant enzyme activities in Algerian mice (*Mus spretus*) inhabiting a mine area in central Portugal / A.M. Viegas-Crespo. - The Science of the Total Environment, 2003. - Q.101–109.
 12. Wang Y, Zhang A, Ye Z, Xie H, Zheng S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion. Transplantation Proceedings. 2009; 41(10): 4352-6.
 13. Александрова О.П. Изучение развития и экспериментальных патологий нейронов в органотипических ролевых культурах структур мозга и сетчатки млекопитающих / Автореф.на зд.ст. канд.біол.наук. Москва, 2009, 21 с.
 14. Глаголева И.С. Возможности применения первичных культур клеток почек новорожденных крольчат в производстве вакцинных препаратов / Глаголева И.С., Плотникова Э.М. // Гены и клетки. – Т. 9 (3). – 2014.
 15. Головченко І. В., Шкуропат А. В. ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ ЕЛЕКТРОЛІТІВ У КРОВІ ЖІНОК 18-21 РОКІВ В УМОВАХ ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ ВИДІВ ФІТНЕСУ // Природничий альманах (біологічні науки). – 2020. – №. 28. – С. 33-43.
 16. Дитченко Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. – 2007.
 17. Дьяконов, Д. П., Ситьков, В. И., Гальнбек, Т. В., Куликова, И. Л., Заерко, В. И., Куш, А. А., Савченкова, И. П. Животная клетка в культуре. 2000.

18. Колокольцова, Т. Д., Сабурин, И. Н., Рыбаков, А. С. Культура клеток как уникальная модель для исследования в современной биологии и медицине. Патогенез, 2013. 11(2), 17-25.
19. Ленева, И. А., Федякина, И. Т., Еропкин, М. Ю., Гудова, Н. В., Романовская, А. А., Даниленко, Д. М., Шестопапов, А. М. Изучение противовирусной активности отечественных противогриппозных химиопрепаратов в культуре клеток и на модели животных. Вопросы вирусологии, 55(3), 2010. 19-27.
20. Лепехова, С. А., Апарцин, К. А., Зарицкая, Л. В., Постовая, О. Н., Батунова, Е. В., Прокопьев, М. В., Коваль, Е. В. Влияние ксенотрансплантации культуры клеток печени на изменения неспецифической резистентности организма при остром токсическом повреждении печени. Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2009. 90(7).
21. Логинова, С. Я., Борисевич, С. В., Максимов, В. А., Бондарев, В. П., Котовская, С. К., Русинов, В. Л., Чарушин, В. Н. Изучение противовирусной активности Триазавирина в отношении возбудителя гриппа А (H5N1) в культуре клеток. Антибиотики и химиотерапия, 2007. 52(11-12), 18-20.
22. Логинова, С. Я., Борисевич, С. В., Русинов, В. Л., Уломский, У. Н., Чарушин, В. Н., Чупахин, О. Н. Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток. Антибиотики и химиотерапия, 2014. 59(1-2).
23. Михайличенко, В. Ю., Столяров, С. С. Эффект трансплантации культуры клеток поджелудочной железы при аллоксановом сахарном диабете у крыс в эксперименте. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2015. (9-4), 670-672.

24. Наволокин, Н. А., Полуконова, А. В., Бибикова, О. А., Полуконова, Н. В., Маслякова, Г. Н., Бучарская, А. Б. Цитоморфологические изменения в культуре клеток почки эмбриона свиньи при воздействии экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). *Фундаментальные исследования*, 2014. 7(10).
25. Петров, Ю. П., Цупкина, Н. В. Особенности роста культуры клеток линии СНО. *Цитология*, 2012. 54(10), 754-760.
26. Петручук, Е. М., Шалунова, Н. В., Олефир, Ю. В., Борисевич, И. В., Перекрест, В. В., Шевцов, В. А., Хантимирова, Л. М. Культуры клеток в заместительной терапии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2017. 17(4 (64)).
27. Романова, М. А., Додонова, А. Ш. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. *Молодой ученый*, (18), 2016. С. 110-114.
28. Семейкин, А. В., Федотчева, Т. А., Левина, И. С., Куликова, Л. Е., Заварзин, И. В., Тихонов, Д. А., Шимановский, Н. Л. Синтез и цитостатическая активность ряда прегна-D³-пентаранов на культуре клеток HeLa. *Химико-фармацевтический журнал*, 2014. 48(6), 9-13.
29. Сидоренко, О. С., Божок, Г. А., Легач, Е. И., Гурина, Т. М. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. *Проблемы криобиологии*. 2011. 47 (9), 325-347.
30. Славянская, Т. А., Авдонкина, Н. А., & Сальникова, С. В. Оптимизация условий получения жизнеспособной первичной культуры клеток уротелиальной карциномы. *Аллергология и иммунология*, 2016. 17(3), 176-179.

- 31.Третьякова, И. В., Калмыкова, М. С., Ярыгина, Е. И. Культура клеток-универсальная модель для культивирования вирусов. Ветеринария, зоотехния и биотехнология, 2019. (4), 30-36.
- 32.Филатова, Е. Н., Уткин, О. В. Культуры клеток в моделировании инфекционных процессов. Успехи современной биологии, 2014. 134(1), 19-25.
- 33.Хисматуллина, Н. А., Гулюкин, А. М., Шуралев, Э. А., Хаертынов, К. С., Чернов, А. Н., Филимонова, М. Н., Иванов, А. В. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1). Гены и клетки, 2014. 9(3).