

Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и роговицы глаза быка, на состояние ткани и клеток роговицы кролика при культивировании и хранении

М.С. Краснов¹В.П. Ямскова²

¹ ФГБУН «Институт элементоорганических соединений» им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук
ул. Вавилова, 28, Москва, 119991, Российская Федерация

² Институт проблем биорегуляции
Ленинский просп., 45, Москва, 119334, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2021;18(3):488–494

Цель: исследование состояния роговицы, а также ее эпителиальных и эндотелиальных клеток при сохранении *in vitro* в различных температурных условиях, при воздействии ряда факторов, в том числе биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и роговицы быка, а также эпидермального фактора роста. **Методы.** Гистологическими и иммуногистохимическими методами исследовали роговицы кроликов, хранившиеся при температуре +4 и –86 °С, а также культуры эндотелиальных и эпителиальных клеток, выделенных из роговицы после хранения при указанных температурах. **Результаты.** Хранение роговиц при +4 °С в течение 10 суток приводило к отеку и значительному снижению их прозрачности; оба биорегулятора частично предотвращали уменьшение прозрачности роговиц. Наблюдался лизис в эндотелиальном слое в сериях с добавлением эпидермального фактора роста и биорегулятора роговицы. Эндотелий сохранялся в роговицах при добавлении биорегулятора сыворотки крови. Все три фактора способствовали сохранности боуменовой мембраны. В роговицах, хранившихся при –86 °С, на 30-е сутки наблюдали сохраненный эндотелиальный слой, эпителий также сохранял свою многослойность во всех сериях с добавлением факторов, кроме контрольной. В контрольных образцах эпителиальный слой частично отслаивался, эндотелиальный слой практически полностью был лизирован. Оба биорегулятора стимулировали пролиферацию клеток, выделенных из нативной роговицы, и усиливали действие эпидермального фактора роста. Аналогичные результаты были получены на культурах клеток, выделенных из роговиц, хранившихся в течение 2 недель при –86 °С. В серии комбинированного применения эпидермального фактора роста и биорегуляторов на 30-е сутки эндотелиальный слой в основном был сохранен, десцеметова мембрана не нарушена. В контрольных образцах эпителий в основном был однослойным, частично отслаивался, а эндотелиальный слой был полностью лизирован. **Заключение.** Хранение роговицы при гипотермии (+4 °С) не обеспечивает жизнеспособности роговицы более чем на 10 суток. Хранение в условиях криоконсервации (–86 °С) обеспечивает жизнеспособность роговицы в течение 60 суток. Добавление в базовую среду консервации биорегуляторов и эпидермального фактора роста позволяет получить структурно сохранную и жизнеспособную роговицу, при этом сохранными и жизнеспособными остаются все клеточные слои роговицы, включая эндотелиальный слой.

Ключевые слова: роговица, культивирование клеток, криоконсервация, биорегуляторы, иммуногистохимия

Для цитирования: Краснов М.С., Ямскова В.П. Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и роговицы глаза быка, на состояние ткани и клеток роговицы кролика при культивировании и хранении. *Офтальмология*. 2021;18(3):488–494. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-3-488-494>

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

Конфликт интересов отсутствует

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность к.б.н., снс ИБР РАН Киселевой Е.В. за помощь в проведении и подготовке данного исследования.



The Effect of Bioregulators Isolated from Blood Serum and Cornea of the Bovin's Eye on the Condition of Tissue and Cells of the Rabbit Corneas during Cultivation and Storage

M.S. Hrasnov¹, V.P. Yamskova²

¹ A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences
Vavilova str., 28, Moscow, 119991, Russian Federation

² Institute of Bioregulation Problems
Leninsky ave., 45, Moscow, 119334, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2021;18(3):488–494

Objective: to study the condition of the cornea, as well as its epithelial and endothelial cells, while maintaining *in vitro* at various temperature conditions, under the influence of a number of factors, including bioregulators isolated from blood serum and cornea of the bovine, and epidermal growth factor. **Methods.** The study was carried out on rabbit corneas stored at temperatures of +4, –86 °C, as well as the cultivation of endothelial and epithelial cells isolated from the cornea after storage at these temperatures, followed by histological and immunohistochemical studies. **Results.** Storage of the cornea at +4 °C for 10 days leads to corneal edema and significantly reduces their transparency, both bioregulators partially prevent a decrease in the transparency of the cornea, while the endothelial layer lyses in groups with the addition of epidermal growth factor and corneal bioregulator; but remains in the cornea with the addition of a serum bioregulator. All three factors contribute to the preservation of the Bowman membrane. In the corneas stored at –86 °C on the 30th day, a preserved endothelial layer was observed, and the epithelium retained its multilayering in all groups with the addition of factors other than the control group. In the control samples, the epithelial layer partially exfoliated, the endothelial layer was almost completely lysed. Both bioregulators stimulated the proliferation of cells isolated from the native cornea and enhanced the action of the epidermal growth factor. Similar results were obtained on cells isolated from stored corneas for 2 weeks at –86 °C. In the case of combined use of the epidermal growth factor and bioregulators on the 30th day, the endothelial layer was mainly preserved, the Descemet's membrane was not broken. In the control samples, the epithelium was mainly single-layered, partially exfoliated, and the endothelial layer was completely lysed. **Conclusion.** Storage of cornea during hypothermia (+4 °C) does not provide corneal viability for longer than 10 days. Storage under conditions of cryopreservation (–86 °C) ensures the viability of the cornea for 60 days. Adding bioregulators and an epidermal growth factor to the basic preservation medium allows one to obtain a structurally safe and viable cornea, while all cellular layers of the cornea, including the endothelial layer, are preserved and viable.

Keywords: cornea, cell cultivation, cryopreservation, bioregulators, immunohistochemistry

For citation: Hrasnov M.S., Yamskova V.P. The Effect of Bioregulators Isolated from Blood Serum and Cornea of the Bovin's Eye on the Condition of Tissue and Cells of the Rabbit Corneas during Cultivation and Storage. *Ophthalmology in Russia*. 2021;18(3):488–494. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-3-488-494>

Financial Disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

There is no conflict of interests

Acknowledgment: The authors are deeply grateful to PhD research officer of IDB RAS for assistance in conducting and preparing this study.

ВВЕДЕНИЕ

Благоприятный исход операции сквозной кератопластики (СКП), продолжающей занимать важное место в микрохирургии глаза, в значительной степени зависит от жизнеспособности донорского материала, основным источником которого остается трупная роговица человека. В настоящее время в практике офтальмохирургии консервированный донорский материал применяют для проведения как плановых, так и urgentных СКП у больных с различной патологией роговой оболочки глаза. В связи с этим разработка консервирующих сред для длительного поддержания жизнеспособности клеток трупной роговицы человека продолжает оставаться важнейшей проблемой в данной области офтальмологии.

Ранее было показано, что в различных тканях животных присутствует новая группа мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), которые в низких дозах стимулируют ре-

паративные и восстановительные процессы. Например, при применении МГТБ, выделенных из сыворотки крови и роговицы глаза быка, при травме роговицы глаза кролика, а также кожи у мышей *in vivo* наблюдали эпиморфную регенерацию тканей данных органов, а именно полное восстановление их гистоструктуры [1–4]. На основании полученных результатов было установлено, что МГТБ способны дополнительно активировать клеточные источники регенерации в этих тканях, в частности, было показано, что МГТБ, выделенный из роговицы (БРР — биорегулятор из роговицы), активирует клетки лимбальной области, тем самым вызывая их пролиферацию и миграцию, обеспечивая поддержание структуры и жизнеспособность роговицы в условиях *in vitro* [1]. Кроме того, было показано, что при добавлении в среду для консервации роговицы человека МГТБ, выделенных из сыворотки крови (БРС — биорегулятор из сыворотки крови), ее показатели не изменились в процессе хранения [5]. Исследование состава обоих

M.S. Hrasnov, V.P. Yamskova

Contact information: Hrasnov Mikhail S. embrmsk@mail.ru

489

The Effect of Bioregulators Isolated from Blood Serum and Cornea of the Bovin's Eye on the Condition...

биорегуляторов — БРР и БРС — показало, что они представляют собой ранее не изученные белково-пептидные комплексы, содержащие изоформы сывороточного альбумина — gi|367460260 и gi|1351907 соответственно, связанные с пептидами, представляющими собой продукты протеолиза известных адгезивных белков и ферментов [6].

В данной работе было исследовано состояние роговицы, ее эпителиальных и эндотелиальных клеток при сохранении роговицы *in vitro* в различных температурных условиях, при воздействии ряда факторов, в том числе БРР, БРС и эпидермального фактора роста (ЭФР). Исследование проводили на роговице кроликов и крыс, учитывая отсутствие видовой специфичности БРР, БРС и ЭФР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Закладка роговиц на длительное хранение происходила при отрицательных температурах по следующей методике. В стерильных условиях культурального бокса с помощью пинцета и ножниц из энуклеированных глаз кроликов выделяли роговицу с тонким (около 1 мм) ободком склеры и переносили в пустой стерильный стеклянный флакон на 50 мл, в котором проводили ее 10–20-кратную отмывку раствором Хэнкса с гентамицином (0,16 мг/мл). Затем роговицы кроликов помещали по одной в стерильные стеклянные флаконы с исследуемой средой для консервации, флаконы закрывали резиновыми пробками. В качестве криоконсерванта использовали глицерин (10 %). Флаконы помещали в морозильную камеру с температурой -85°C в пенопластовой коробке с плотной крышкой (толщина всех стенок коробки 1 см). Хранение осуществляли в той же коробке при той же температуре. Использование термоизолирующего контейнера с такими параметрами обеспечивало низкие темпы замораживания с уменьшением повреждающего эффекта в точке замерзания, что позволило замораживать ткань при постоянной температуре со скоростью около $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Для размораживания роговиц флаконы с роговицами вынимали из низкотемпературного холодильника и помещали на водяную баню при $+42^{\circ}\text{C}$ на 5 мин, затем флаконы переносили в термостат при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ до полного размораживания. Роговицы отмывали от криопротектора питательной средой ДМЕМ. Затем для оценки жизнеспособности роговиц выделяли эндотелиальные и эпителиальные клетки или фиксировали роговицы в формалине для гистологических исследований в растворе 10 % формалина и делали гистологические срезы по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Для выделения и культивирования эндотелиальных клеток роговицы кролика скальпелем разделяли роговицу на 4 сектора и инкубировали в 0,2 % растворе диспазы в среде Игла при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 40 мин. Затем суспензию эпителиальных клеток промывали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (БиоЛот), центрифугировали при 200 g в течение 5 мин.

Супернатант сливали, клеточный осадок ресуспендировали в среде культивирования и рассевали в культуральные флаконы, сорбированные коллагеном I типа, и культивировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 . Состав среды культивирования: ДМЕМ/F-12 (Панэко), 10 % ЭТС (БиоЛот, РФ), 10^{-6} М изопротеринола (Sigma), 5 мкг/мл инсулина (Sigma), 5 мкг/мл трансферрина (Sigma), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Панэко). Через 3 суток меняли среду на среду, содержащую исследуемые факторы. Среду меняли каждые 3 суток.

После выделения эндотелиальных клеток из роговиц выделяли эпителиальные клетки. Для этого кусочки роговиц дополнительно инкубировали в 2 % растворе диспазы (Sigma, США) в среде Игла в течение 90 мин. при 37°C , затем переносили в фосфатно-солевой буфер (рН 7,3), с помощью пинцета отделяли эпителиальный слой, который переносили в раствор 0,125 % трипсина и инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ 15 мин. После обработки трипсином для ингибирования фермента добавляли 5 мл среды ДМЕМ, содержащей 10 % ЭТС, взвесив кусочки роговиц пипетировали для наилучшей дезинтеграции клеток. Затем клетки осаждали центрифугированием (200 g, 10 мин). Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспендировали в среде культивирования: ДМЕМ/F-12 (Панэко), 10 % ЭТС (HyClone), 10^{-6} М изопротеринола (Sigma), 5 мкг/мл инсулина (Sigma), 5 мкг/мл трансферрина (Sigma), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Панэко). Клетки высевали плотностью 70–80 тыс/см² в лунки 24-луночного планшета, покрытые коллагеном, и культивировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 . Через 3 суток меняли среду на среду, содержащую исследуемые факторы. Среду меняли каждые 3 суток.

Для иммуноцитохимических исследований клетки фиксировали в 4 % параформальдегиде (ПФА) в течение 30 мин при комнатной температуре, затем после трехкратной промывки в фосфатном буфере (ФБ) клетки пермеабилizировали в 0,5 % растворе Triton X-100. Затем промывали ФБ и наносили сыворотку животных, из которых были получены вторые антитела, для уменьшения неспецифического связывания антител и инкубировали с первыми антителами в течение 18 ч при $+4^{\circ}\text{C}$. После промывки в ФБ наносили вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa (Molecular Probe), ядра окрашивали DAPI (Biotium). Препараты изучали с помощью флуоресцентной микроскопии (микроскоп Leica DM RXA2). В работе использовали следующие антитела: против Ki-67, цитокератина 14, цитокератина 19 (Abcam) и цитокератинов 3/12 (Lifespan Bioscience).

Состав консерванта для хранения роговицы:

- 1) контроль — среда ДМЕМ, 10 % глицерин, 1 % бычий сывороточный альбумин (БСА);
- 2) опыт 1 — среда ДМЕМ, 10 % глицерин, 1 % бычий сывороточный альбумин (БСА), 10 нг/мл ЭФР;
- 3) опыт 2 — среда ДМЕМ, 10 % глицерин, 1 % бычий сывороточный альбумин (БСА), 10 нг/мл ЭФР, БРР или БРС.

БРР и БРС были выделены согласно методике, указанной в известных источниках [1, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологический анализ роговиц, хранившихся при +4 °С, показал, что эндотелиальный слой лизируется в группах с добавлением ЭФР или БРР, но имеется сохранение эндотелиального слоя в роговицах с добавлением БРС. Все три фактора способствуют сохранности боуменовской мембраны, однако наблюдалось отслоение наружных эпителиальных слоев клеток и лизис некоторых кератиноцитов (рис. 1).

Исследование состояния роговиц кроликов, хранившихся при –86 °С в среде ДМЕМ с 10 % глицерина, 1 % БСА и добавками в течение 60 суток, показало следующее.

На 30-е сутки роговицы имели сохранный эндотелиальный слой во всех группах, кроме контрольной группы, то есть без добавления факторов; наиболее сохранный эндотелий наблюдали в группе с добавлением БРС, в группе с ЭФР эндотелиальный слой был также сохранен, а в группе с добавлением БРР отмечали единичные

эндотелиальные клетки (рис. 2). Роговичный эпителий сохранял свою многослойность во всех группах, кроме контрольной (рис. 2). Единичные клетки с лизирующей цитоплазмой наблюдали только в случае содержания в консервирующей среде ЭФР. В контрольных образцах (базовая среда) эпителиальный слой частично отслаивался, эндотелиальный слой практически полностью был лизирован.

Выделение и культивирование клеток из роговицы позволяет оценить жизнеспособность клеток различных слоев роговицы и самой роговицы в целом при использовании различных способов консервации.

На начальном этапе исследовали влияние БРР, БРС и комбинации этих факторов с ЭФР на состояние эндотелиальных и эпителиальных клеток, выделенных из нативной роговицы, при их культивировании *in vitro*. Оценивали количество пролиферирующих клеток на 7-е сутки культивирования (по экспрессии маркера пролиферации Ki-67). Было показано, что оба биорегулятора стимулируют пролиферацию клеток, выделенных из нативной роговицы, и усиливают действие

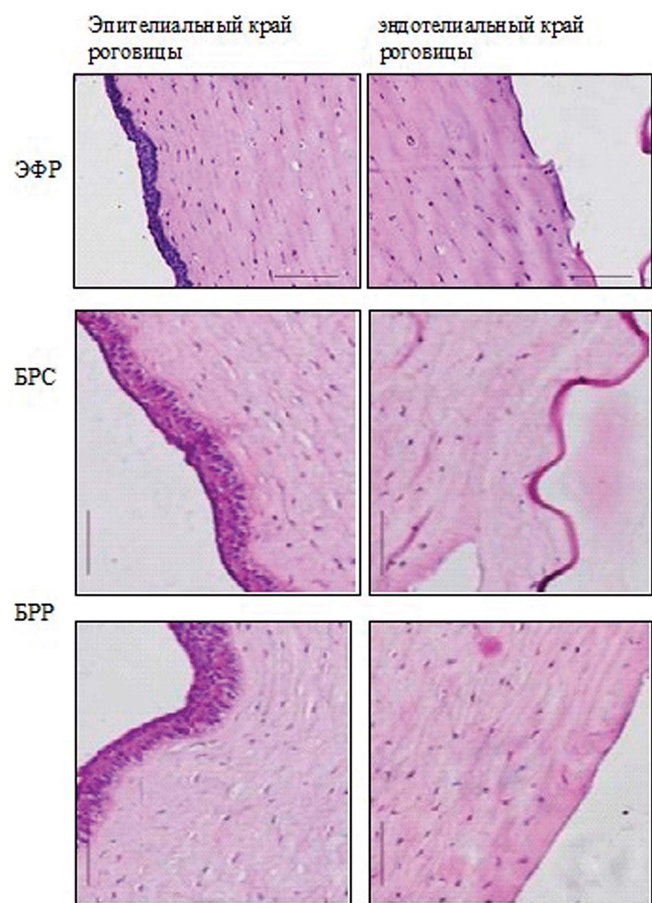


Рис. 1. Гистологический анализ роговиц, хранившихся при +4 °С в среде ДМЕМ с 10 % глицерина, 1 % БСА и добавками (ЭФР, БРР, БРС) в течение 14 суток. Полутонкий срез. Гематоксилин-эозин

Fig. 1. Histological analysis of corneas stored at +4 °C in DMEM with 10 % glycerol, 1 % BSA and additives (EGF, BRR, BRS) for 14 days. Semi-thin section. Hematoxylin-eosin

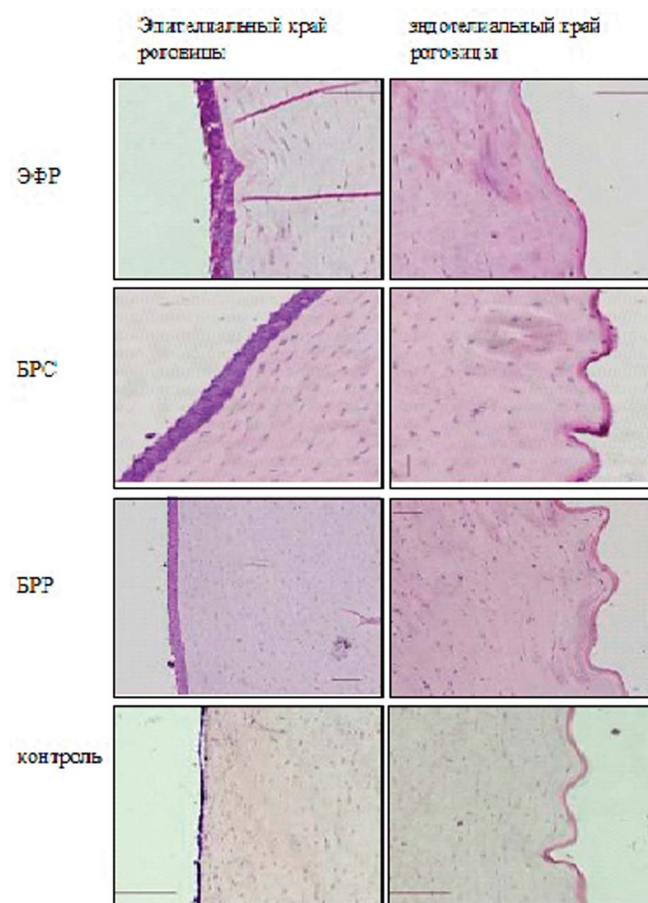


Рис. 2. Гистологический анализ роговиц, хранившихся при –86 °С в среде ДМЕМ с 10 % глицерина, 1 % БСА и добавками в течение 30 суток. Полутонкий срез. Гематоксилин-эозин

Fig. 2. Histological analysis of corneas stored at –86 °C in DMEM with 10 % glycerol, 1 % BSA and additives for 30 days. Semi-thin section. Hematoxylin-eosin

Таблица 1. Влияние биологических добавок на пролиферативную активность эпителиальных и эндотелиальных клеток нативной роговицы кролика (% пролиферирующих клеток)**Table 1.** The effect of biological additives on the proliferative activity of the native rabbit cornea epithelial and endothelial cells (% of proliferating cells)

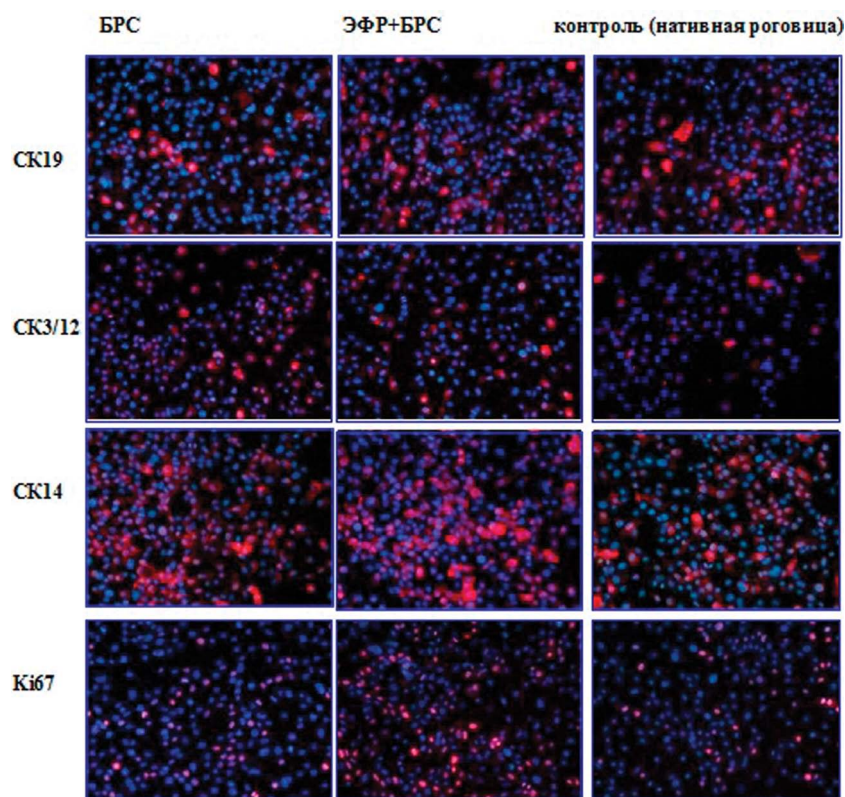
Тип клеток / Type of cells	Контроль / Control	ЭФР / Epidermal growth factor	БРС / Serum bioregulators	БРР / Corneal bioregulators	ЭФР + БРС / Epidermal growth factor + serum bioregulators	ЭФР + БРР / Epidermal growth factor + corneal bioregulators
Эпителиальные клетки / Epithelial cells	15,0 ± 3,5	32,3 ± 2,0	28,0 ± 5,0	25,0 ± 6,0	37,0 ± 3,5	39,0 ± 2,7
Эндотелиальные клетки / Endothelial cells	9,0 ± 3,7	25,0 ± 4,0	19,5 ± 3,0	20,0 ± 3,0	30,0 ± 2,1	32,0 ± 2,5

ЭФР (табл. 1). Аналогичные результаты были получены на клетках, выделенных из хранившихся роговиц в течение 2 недель при -86°C .

Сохранность эндотелиального слоя при длительном хранении роговицы влияет на ее гидратацию, сохранение прозрачности и может служить прогностическим признаком для оценки приживления трансплантата. Показано, что хранение роговиц при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 суток приводит к отеку и значительно снижает прозрачность, МГТБ частично предотвращают снижение прозрачности роговиц.

Иммуногистохимический анализ культур эпителиальных клеток, выделенных из хранившихся роговиц в течение 30 суток при -86°C , проводили только с БРС

и с ЭФР совместно с БРС, поскольку данный биорегулятор показал наибольшую эффективность относительно сохранности эпителиальных и эндотелиальных клеток роговицы. Как видно из рисунка 3, при добавлении в среду культивирования факторов ЭФР и БРС, а также только БРС имеет место идентичная экспрессия маркеров эпителия роговицы (цитокератинов 3/12, 14, 19) по сравнению с клетками, выделенными из нативной роговицы. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 указывает на сохранение пролиферативной активности клеток роговиц, хранившихся в низкотемпературных условиях. На рисунке 4 представлены культуры эндотелиальных клеток из роговиц, хранившихся 30 суток при -86°C . Клетки из контрольных групп (роговицы, хранившиеся

**Рис. 3.** Иммуногистохимический анализ культур кератиноцитов, выделенных из хранившихся при -86°C в течение 30 суток роговиц, по сравнению с культурой кератиноцитов, выделенных из нативной роговицы**Fig. 3.** Immunohistochemical analysis of cultures of keratinocytes isolated from corneas stored at -86°C for 30 days compared with a culture of keratinocytes isolated from the native cornea

к пластику на вторые сутки, однако затем часть клеток всплывала, и к 10-м суткам слияния колоний и образования монослоя не наблюдали. В опытных образцах (БРС, ЭФР, БРС + ЭФР) во всех случаях на 10-е сутки образовывался монослой эндотелиальных клеток. Это указывает на поддержание жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы при криоконсервации в течение 30 суток в присутствии биорегуляторов и ЭФР (рис. 4).

На 60-е сутки в среде, содержащей ЭФР, БРР и БРС, роговица имела сохранный многослойный роговичный эпителий, единичные клетки наружных слоев подверглись частичному лизису. Базальный слой кератиноцитов и боуменова мембрана были сохранены (рис. 5). Частичный лизис клеток в эпителиальном слое наблюдали при добавлении одного из исследуемых факторов в среду консервации (только ЭФР, или БРР, или БРС). В случае комбинированного применения ЭФР и БРР или ЭФР и БРС эндотелиальный слой в основном был сохранен, десцеметова оболочка не нарушена (рис. 5, стрелки). В контрольных образцах (базовая среда) эпителий в основном был однослойным, частично отслаивался, а эндотелиальный слой был полностью лизирован.

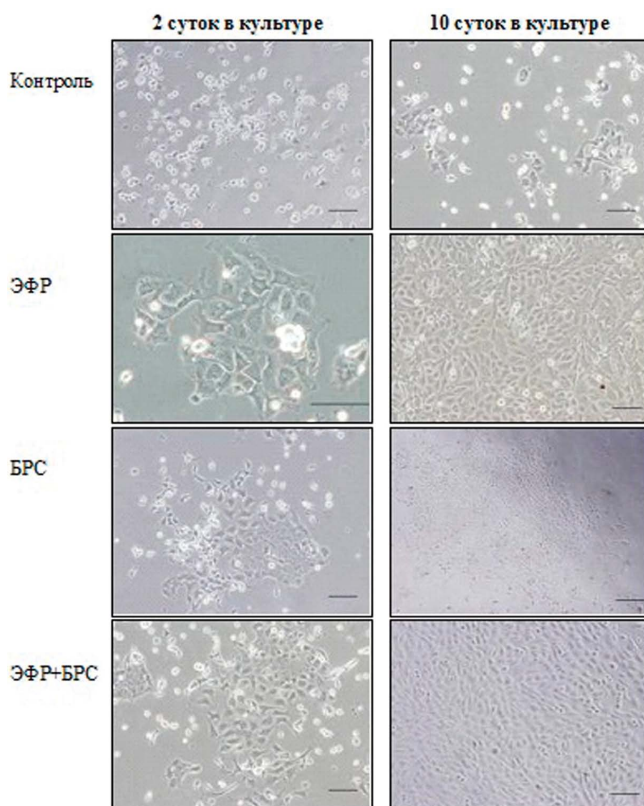


Рис. 4. Культуры эндотелиальных клеток, выделенных их роговиц, хранившихся при -86°C в течение 30 суток

Fig. 4. Culture of endothelial cells isolated from their corneas, stored at -86°C for 30 days

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, хранение роговиц при гипотермии ($+4^{\circ}\text{C}$) не обеспечивает жизнеспособности роговицы более чем на 10 суток. Хранение в условиях криоконсервации (-86°C) обеспечивает жизнеспособность роговицы как минимум в течение 60 суток. Биологические добавки

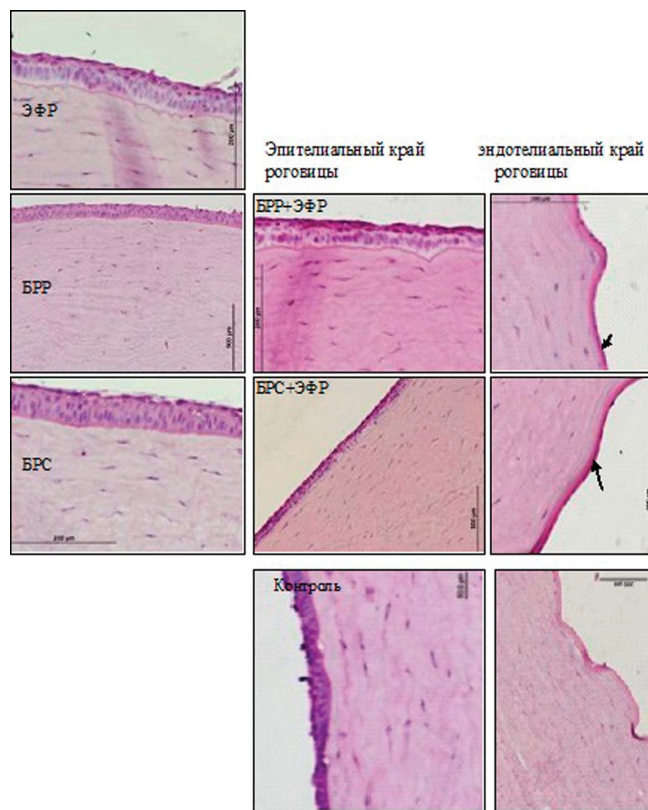


Рис. 5. Структура роговиц, хранившихся при -86°C в среде ДМЕМ с 10 % глицерином, 1 % БСА и добавками в течение 60 суток. Полутонкий срез. Гематоксилин-эозин

Fig. 5. The structure of the corneas stored at -86°C in DMEM with 10 % glycerol, 1 % BSA and additives for 60 days. Semi-thin section. Hematoxylin-eosin

(ЭФР, БРС и БРС) в базовую среду консервации позволяют получить структурно сохранную и жизнеспособную роговицу и все ее слои, включая эндотелиальный.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Краснов М.С. — научное редактирование, написание текста, подготовка иллюстраций;
Ямска В.П. — научное и техническое редактирование, написание текста.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямска В.П. Роль регуляторного белка, выделенного из роговицы глаза быка, в активации клеточных источников регенерации роговицы in vitro. *Известия АН Сер. Биология*. 2008;6:736–745. [Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Yamskov I.A., Yamskova V.P. Role of a Regulatory Protein from the Bovine Cornea in Activation of Cell Sources of Corneal Regeneration in vitro. *Proceedings of the RAS. ser. Biology = Izvestiya RAN. Ser. Biologicheskaja*. 2008;35(6):635–642 (In Russ).]
2. Константиновский А.А., Краснов М.С., Ямска В.П., Рыбакова Е.Ю., Ямска И.А. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка, на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов in vivo. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012;2:177–182. [Konstantinovskiy A.A., Krasnov M.S., Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Yamskov I.A. Study of Wound-Healing Activity of Bioregulators Isolated from Eye Tissues and Bovine Serum in the Model of Experimental Corneal Injury in Rabbits In Vivo. *Bulletin Experimental Biology and Medicine = Byulleten' ehksperimental'noy biologii i mediciny*. 2012;153(2):212–216 (In Russ).]
3. Стречий Г.М., Краснов М.С., Рыбакова Е.Ю., Авдеенко О.Е., Тихонов В.Е., Шайхалиев А.И., Ямска В.П., Ямсков И.А. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2011;4:211–214. [Stretskiy G.M., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Avdeenko O.E., Tikhonov V.E., Shaikhaliev A.I., Yamskova V.P., Yamskov I.A. Effect of a Composition Containing Chitosan Gel and a Bioregulator from Blood Serum on Healing of Purulent Wounds in Mice. *Cell Technologies in Biology and Medicine = Kletochnye tehnologii v biologii i mediciny*. 2012;4:524–527 (In Russ).]
4. Ямска В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012;136. [Yamskova V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. New experimental and theoretical aspects in bioregulation. The mechanism of action of membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing. 2012;136 (In Russ).]
5. Каспаров А.А., Розина В.Н., Ямска В.П. Питательная среда с Адгелом для консервации роговицы донора. *Онтогенез*. 2000;31(4):273–274. [Kasparov A.A., Rozinova V.N., Yamskova V.P. Nutrient medium with Adgelon for preservation of the cornea of the donor. *Ontogenesis = Ontogenez*. 2000;31(4):273–274 (In Russ).]
6. Ильина А.П., Сидорский Е.В., Елистратов П.А., Чекова В.М., Ямска В.П., Ямсков И.А. Анализ изоформ альбумина сыворотки, входящих в состав мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из различных тканей млекопитающих. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019;55(4):350–355 [Il'ina A.P., Sidorskiy E.V., Elistratov P.A., Chekova V.M., Yamskova V.P., Yamskov I.A. Analysis of Serum Albumin Isoforms Belonging to Membranotropic Homeostatic Tissue-Specific Bioregulators Isolated

from Different Mammalian Tissues. Applied Biochemistry and Microbiology = *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*. 2019;55(4):355–359 (In Russ.)).

7. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatikh I.V., Yamskov I.A. Analysis of regulatory proteins from bovine blood se-

rum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties In the book “Biochemical Physics Frontal Research”, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY: Nova Science Publishers Inc. 2007;127. P. 61–70.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБУ «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова» Российской академии наук
Краснов Михаил Сергеевич
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ул. Вавилова, 28, Москва, 119991, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-5057-7295>

Институт проблем биорегуляции
Ямскова Виктория Петровна
доктор биологических наук, профессор
Ленинский просп., 45, Москва, 119334, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences
Krasnov Mikhail S.
PhD in Biology, senior research officer
Vavilova str., 28, Moscow, 119991, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-5057-7295>

Institute of bioregulation problems
Yamskova Viktoria P.
Dr. in Phys. and Math., Professor, head of the Department of science
Leninsky ave., 45, Moscow, 119334, Russian Federation