

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

АЛІ САБІНА ГУЛЬЗАРІВНА

УДК 57.086.13:611.018.82.085.2”461”

ДИСЕРТАЦІЯ

**КУЛЬТИВУВАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИН ТА
МУЛЬТИКЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ
НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ**

03.00.19 – кріобіологія

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ (підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Божок Галина Анатоліївна, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Алі С. Г. Культивування та кріоконсервування клітин та мультиклітинних сфероїдів зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 «Кріобіологія» (091 – Біологія) Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена отриманню культури клітин зі спінальних гангліїв (ККСГ) неонатальних поросят у вигляді моношару або мультиклітинних сфероїдів (МС), вивченню її основних структурно-функціональних характеристик при культивуванні у 2D- та 3D-умовах та встановленню оптимального режиму її кріоконсервування.

У представленій роботі вперше було отримано ККСГ із неонатальних поросят. Виявилося, що додавання сироватки до середовища культивування є вирішальною умовою для отримання ККСГ у вигляді моношару або МС. При цьому, культивування клітин у середовищі з 10% фетальною телячою сироваткою (ФТС) призводить до формування клітинного моношару, а у середовищі із заміниками сироватки В27 або Нейромакс – до утворення МС. Ефективність сфероїдоутворення була невисокою (7–14 МС/ 10^6 посіяних клітин), але здібність клітин МС до міграції та проліферації була великою (спостерігалось формування конфлуентного моношару після пересіву МС упродовж 10 діб). При цьому Нейромакс забезпечував більш інтенсивне сфероїдоутворення, ніж В27.

Морфологічно первинна ККСГ при культивуванні у 2-D умовах (моношар) складалася з полігональних клітин з вираженими сплюсненими відростками (тип 1), веретеноподібних клітин з двома тонкими відростками (тип 2), великих фібробластоїдних клітин (тип 3) та тіл чутливих нейронів (ЧН). При цьому клітинні типи 1 та 2 переважали у первинній культурі (близько 40–50 %), а клітини типу 3 та тіла ЧН склали близько 3–5%.

Кількість пасажів впливала на морфологічний тип клітин ККСГ. При пересіві спостерігалася елімінація тіл ЧН та експансія фібробластоїдних клітин типу 3.

При культивуванні ККСГ у 3D-умовах (МС) встановлено послідовність етапів розвитку культури. Спочатку спостерігається формування клітинних агрегатів, після чого вони ущільнюються та набувають правильної сферичної форми. Утворення МС у ККСГ неонатальних поросят було спонтанним, оскільки не потребувало використання механічних/фізичних факторів (ротації, електромагнітного поля тощо) або спеціальної підложки/матриці. Перенесення сформованих на 8–10 добу МС до культурального середовища з 10% ФТС призводило до формування моношару з тих же типів клітин, які спостерігалися при 2D-культивуванні (клітини типів 1–3). Однак при порівнянні культур 2D- та 3D-форматів спостерігалися розбіжності у кількості клітин різних морфологічних типів: після пересіву МС клітини типу 3 домінували (близько 60 %), клітини 1-го типу складали близько 8%, типу 2– 31 %. Тривала підтримка МС у культурі (більше 20 діб) призводила до втрати їхніх функціональних властивостей та деградації. Перенесення таких МС до культурального середовища з 10% ФТС не призводило до активної міграції клітин та формування моношару.

Незалежно від способу отримання культури (у вигляді моношару або МС), клітини культури експресували маркер мантийних гліоцитів (МГ) глутамінсинтетазу (ГС), маркер нейробластів β -III-тубулін, але не експресували маркер шваннівських клітин S100. При цьому, експресія ГС спостерігалася у клітинах 2-го типу. Це в комплексі з морфологічними характеристиками дозволяє віднести даний тип клітин до МГ. У клітинах типу 1 відбувалася експресія β -III-тубуліну, що в комплексі з морфологічними характеристиками дозволяє віднести їх до нейронів. Клітини типу 3 експресували одночасно ГС та β -III-тубулін, що може свідчити про втрату спеціалізованих властивостей МГ та переходу клітин у менш диференційований, можливо, прогеніторний стан. Також можливо, що клітини типів 2 та 3 є спеціалізованими МГ з різними функціями.

ККСГ неонатальних поросят після пересіву приблизно на 80% складалася з МГ, які при підтримці у культуральному середовищі з 10% ФТС мали здібність до проліферації та утворення конфлюентного моношару впродовж всього періоду спостереження (10 діб).

На наступному етапі роботи було вивчено морфофункціональні особливості ККСГ неонатальних поросят після кріоконсервування у вигляді суспензії клітин або МС.

Встановлено, що ККСГ, яку було кріоконсервовано у вигляді суспензії, має досить високу стійкість до пошкоджень факторами кріоконсервування. При використанні кріозахисного середовища на основі ДМСО та трьохетапного режиму охолодження (І етап – зі швидкістю 0,5 °C/хв до –20°C; II етап – зі швидкістю 1 °C/хв до –80°C; III етап – занурення у рідкий азот) збереженість клітин перебувала у межах від 83 до 87%, а вихід клітин – від 63 до 78%. Варіації збереженості та виходу клітин залежали від концентрації ДМСО (5, 7,5 та 10%).

Після кріоконсервування зберігалася експресія клітинами імунофенотипових маркерів ГС та β -III-тубуліну, проте спостерігалось уповільнення швидкості формування моношару. Кріоконсервування мало кріоселективний вплив та призводило до зміни співвідношення морфологічних типів клітин у культурі. Клітини типу 3 виявилися найбільш стійкими до кріоконсервування.

Збереженість МГ, визначених імуноцитохімічно, після кріоконсервування залежала від використаної концентрації ДМСО. Після використання 5 та 10% ДМСО в культурах спостерігалось зменшення відносної кількості МГ на 33 та 25% відповідно у порівнянні з контролем. У зразках, кріоконсервованих з 7,5% ДМСО, кількість МГ становила 94,5% і значуще не відрізнялася від контролю. Таким чином, якщо при кріоконсервуванні ККСГ клітинною «субпопуляцією інтересу» є МГ, доцільно використовувати ДМСО у концентрації 7,5%.

Клітини першого пасажу ККСГ виявилися більш стійкими до кріоконсервування у порівнянні з первинною культурою. Найкращий результат (90,6% життєздатних клітин після відігрівання) був досягнутий при кріоконсервуванні клітин першого пасажу у середовищі на основі 7,5% ДМСО.

Кріоконсервування ККСГ неонатальних поросят у вигляді МС у середовищах, що містили ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, при застосуванні трьохетапного режиму охолодження дозволяло зберегти основні морфологічні, імунофенотипові та функціональні властивості МС. Однак кріоконсервування призводило до зниження здатності МС до адгезії, а їх клітин – до міграції (на 22–25% в порівнянні з контролем) та проліферації. Утворення моношару зменшувалося на 50–65% у порівнянні з контролем.

Домінуючий тип клітин, який спостерігався у ККСГ після кріоконсервування її у вигляді МС, залежав від концентрації ДМСО. Кріоконсервування в кріозахисному середовищі з 5 або 7,5% ДМСО дозволяло отримати культуру, збагачену клітинами типів 1 та 2, а використання 10%-й концентрації ДМСО сприяло збереженню клітин типу 3.

Таким чином, режим кріоконсервування, який включає використання середовища з ДМСО та трьохетапний режим охолодження, є прийнятним для кріоконсервування ККСГ як у вигляді суспензії клітин, так й МС. Цей режим забезпечує досить високий рівень збереженості клітин, наявність їх імунофенотипових та функціональних властивостей. Варіації концентрації ДМСО у складі захисного середовища мають кріоселективний вплив та призводять до збереження певного морфологічного типу клітини у ККСГ неонатальних поросят. Встановлений режим може бути рекомендований для використання з метою низькотемпературного зберігання ККСГ для подальшого культивування як у 2D- так і 3D-форматі.

Ключові слова: спінальні ганглії, культивування, кріоконсервування, мультиклітинні сфероїди, неонатальні поросята, диметилсульфоксид, мантийні гліюцити.

ANNOTATION

Ali S.G. Cultivation and cryopreservation of cells and multicellular spheroids from the dorsal root ganglia of neonatal piglets. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Philosophy Doctor) in specialty 03.00.19 «Cryobiology» (091 – Biology). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The dissertation is devoted to obtaining a culture of cells from dorsal root ganglia (CCDRG) of neonatal piglets in the form of a monolayer or multicellular spheroids (MS), studying its main structural and functional characteristics in 2D and 3D cultural conditions, and establishing the optimal regimen of its cryopreservation. In this work, for the first time, CCDRG was obtained from neonatal piglets.

It was established that the addition of serum to the culture medium is a decisive condition for the production of CCDRG in the form of a monolayer or MS. Thus, the cultivation of cells in a medium with 10% fetal calf serum (FCS) leads to the formation of a cell monolayer, while the cultivation with B27 or Neuromax supplements leads to the formation of MS. The efficiency of spheroid formation was low (7–14 MS per 10^6 seeded cells), but the ability of their cells to migrate and proliferate was high (the formation of a confluent monolayer was observed after MS reseeding for 10 days). At the same time, Neuromax provided more active spheroid formation than B27.

Morphologically, primary CCDRG when cultured in 2D-conditions (monolayer) consisted of polygonal cells with pronounced flattened processes

(type 1), spindle-shaped cells with two thin processes (type 2), large fibroblastoid cells (type 3), and bodies of sensory neurons (SN). Cell types 1 and 2 prevailed in the primary culture (about 40–50%), while the number of type 3 cells and SN bodies was about 3–5%. The number of passages affected the morphological composition of CCDRG. After reseeding, elimination of SN bodies and expansion of fibroblastoid cells of type 3 were observed.

When cultivating CCDRG in 3-D conditions (MS), a sequence of stages of culture development was established. Initially, the formation of cell aggregates is observed, after which they are compacted and acquire the proper spherical shape. The formation of MS in CCDRG of neonatal piglets was spontaneous, as it did not require the use of mechanical/physical factors (rotation, electromagnetic field, etc.) or a special substrate/matrix. Transfer of MS formed on day 8-10 to a medium with 10% FCS led to the formation of a monolayer of the same cell types that were observed at 2D culture conditions (cells of the 1st, 2nd and 3rd types). However, when comparing 2D- and 3D-culture formats, there were differences in the number of cells of different morphological types: after MS reseeding, cells of type 3 dominated (about 60%), cells of type 1 were about 8%, cells of type 2 – 31 %. Prolonged maintaining of MS in culture (more than 20 days) led to the loss of their functional properties and degradation. Transfer of such MS to the medium with 10% FCS did not lead to active cell migration and monolayer formation.

Regardless of the method of obtaining the culture (as a monolayer or MS), the cells of culture expressed a marker of satellite glial cells (SGC) glutamine synthetase (GS), a neuroblast marker β -III-tubulin, but did not express a marker of Schwann cells S100. Herewith, GS expression was observed in the cells of type 2. This, combined with morphological characteristics, makes it possible to classify these cells as SGC. Expression of β -III-tubulin was observed in type 1 cells, which, in combination with morphological characteristics, makes it possible to classify them as neurons. Type 3 cells simultaneously expressed GS and β -III-tubulin, which may indicate the loss of the specialized properties of SGC and the transition

of cells to a less differentiated, possibly progenitor state. It is also possible that type 2 and type 3 cells are specialized SGC with different functions.

After resseeding, the CCDRG of neonatal piglets consisted of approximately 80% SGC, which, when supported in a medium with 10% FCS, had the ability to proliferate and form a confluent monolayer during the entire observation period (10 days).

At the next stage of the work, the morphological and functional features of the CCDRG of neonatal piglets after cryopreservation in the form of a cell suspension or MS were studied.

It was found that CCDRG, which was cryopreserved in the form of a cell suspension, had a sufficiently high resistance to the damaging factors of cryopreservation. When using a DMSO-based cryoprotective medium and a three-stages cooling regimen (Stage I – at a rate of 0.5 °C/min to –20°C; Stage II – at a rate of 1°C/min to –80°C; Stage III – immersion into liquid nitrogen), the number of preserved cells ranged from 83 to 87%, and cell yield – from 63 to 78%. Variations in the preservation and cell yield depended on the concentration of DMSO (5, 7.5, and 10%).

After cryopreservation, the expression of immunophenotypic markers was retained in the cells, but a slowdown in the rate of monolayer formation was observed. Cryopreservation had a cryoselective effect and led to a change in the ratio of morphological types of cells in culture. Type 3 cells were found to be the most resistant to cryopreservation.

The preservation of SGC after cryopreservation, which was determined by immunocytochemistry, depended on the DMSO concentration. After using 5 and 10% DMSO in cultures, a decrease in the relative amount of SGC was observed by 33 and 25%, respectively, compared with intact controls. In samples, which were cryopreserved with 7.5% DMSO, the amount of SGC was 94.5% and did not differ significantly from the intact control. Thus, if SGC is a “subpopulation of interest” during cryopreservation of CCDRG, it is advisable to use DMSO at a concentration of 7.5%.

The cells of the 1st passage of the CCDRG turned out to be more resistant to cryopreservation in comparison with the primary culture. The best result (90.6% of viable cells after thawing) was achieved with cryopreservation of cells of the 1st passage in a medium based on 7.5% DMSO.

Cryopreservation of CCDRG of neonatal piglets in the form of MS in media containing DMSO at concentrations of 5, 7.5, and 10%, using a three-stages cooling regimen, made it possible to preserve the main morphological, immunophenotypic and functional properties of MS. However, cryopreservation led to a decrease ability of MS to adhesion, and their cells – to migration (by 22–25% compared to intact control) and proliferation. Monolayer formation decreased by 50–65% compared with intact control.

The dominant cell type that was observed in CCDRG after its cryopreservation in the form of MS depended on the concentration of DMSO. Cryopreservation in a cryoprotective medium with 5 or 7.5% DMSO made it possible to obtain a culture enriched with type 1 and type 2 cells, and the use of a 10% concentration of DMSO promoted the preservation of type 3 cells.

Thus, the cryopreservation regimen, which includes a protective medium with DMSO and a three-stages cooling mode, is acceptable for cryopreservation of CCDRG both in the form of a cell suspension and MS. This regimen provides a sufficiently high level of cell preservation and keeps their immunophenotypic and functional properties. Variations in the concentration of DMSO in the protective medium composition have a cryoselective effect and lead to the preservation of a certain morphological type of cells in the CCDRG of neonatal piglets. The established regimen can be recommended for use for low-temperature storage of CCDRG for further cultivation both in 2D- and 3D-conditions.

Key words: dorsal root ganglia, cultivation, cryopreservation, multicellular spheroids, neonatal piglets, dimethyl sulfoxide, satellite glial cells.

Список публікацій здобувача

Статті у фахових журналах України

1. **Али СГ**, Сидоренко ОС, Божок ГА. Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Серія «Біологія». 2018; (30):49–59.
2. **Али СГ**, Божок ГА. Кріоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из первичной культуры клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(4):354–364. (Scopus)
3. **Али СГ**, Коваленко ИФ, Божок ГА. Некоторые фенотипические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 3(152):46–50.
4. **Алі СГ**, Моїсєєва НМ, Божок ГА. Кріоконсервування культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(2):158–168. (Scopus)

Статті у фахових зарубіжних журналах

5. **Ali S**, Bozhok G. Effect of Cryopreservation on Different Passages of Porcine Dorsal Root Ganglion Cell Culture. Recent Advances in Biology and Medicine. 2019. pgs 5.

2. Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези наукових доповідей конференцій

6. **Али СГ**, Лаврик АА, Божок ГА. Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 40-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 23–24.05.2016 м. Харків, 2016. С. 29.

7. **Али СГ.** Влияние условий культивирования на некоторые морфофункциональные характеристики первичных культур клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Научные исследования и разработки 2018 года: материалы Международной научно–практической конференции, г. Москва, Россия, 15–31.10.2018 г. Москва, 2018. с. 303–7.
8. **Али СГ, Божок ГА.** Экспрессия нейрональных маркеров в культуре клеток, полученной из нативных и криоконсервированных мультиклеточных сфероидов из спинальных ганглиев неонатальных поросят. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 43-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 27–29.05.2019 г. Харків, 2019. с. 27.
9. **Алі СГ.** Вплив кріоконсервування на здатність до адгезії мультиклітинних сфероїдів, отриманих зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. Молодь і поступ в біології: матеріали XV-ї Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, м. Львів, Україна, 9–11.04.2019 м. Львів, 2019. с. 86.
10. **Алі СГ, Божок ГА.** Експресія нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18–21.2019 Yaremche, 2019. p. 163.
11. **Али СГ, Божок ГА.** Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток, полученной из спинальных ганглиев неонатальных поросят. 4-й Национальный конгресс по регенеративной медицине: Всероссийская науч.-практ. конф. с международным участием, г. Москва, Россия, 20-23.11. 2019 г. Гены и Клетки. Приложение. 2019 (14):21. (Scopus).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	17
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Нервовий гребінь і його нейральні похідні	24
1.2. Структурно-функціональні особливості спінальних гангліїв	26
1.3. Морфологічні та фенотипові властивості мантийних гліоцитів	29
1.4. Характеристика різних підходів до культивування клітин чутливих гангліїв	31
1.5. Закономірності формування мультиклітинних сфероїдів	37
1.6. Кріоконсервування культур нейральних клітин	42
1.6.1. Кріоконсервування культур нейтральних клітин у вигляді клітинної суспензії	43
1.6.2. Кріоконсервування культур нейральних клітин у вигляді сфероїдів	45
РОЗДІЛ II. Матеріали і методи дослідження	48
2.1. Схема експерименту і експериментальні тварини	48
2.2. Отримання суспензії клітин	48
2.3. Визначення збереженості та виходу клітин	50
2.4. Моношарове (2D) та об'ємне (3D) культивування	50
2.5. Пересів клітин та МС	51
2.6. Забарвлення гематоксиліном і еозином	51
2.7. Імуноцитохімічні дослідження	52
2.8. Світлова та флуоресцентна мікроскопія	53
2.9. Кріоконсервування культури клітин зі СГ неонатальних поросят у вигляді суспензії та МС	54
2.9.1. Кріоконсервування культури у вигляді суспензії клітин	54
2.9.2. Кріоконсервування культури у вигляді МС	55

2.10. Деконсервування культури клітин зі СГ неонатальних поросят	55
2.11. Рекультивування клітин та МС після кріоконсервування	55
2.12. Визначення здатності МС до адгезії і здатності клітин МС до міграції	57
2.13. Швидкість формування моношару	57
2.14. Визначення морфологічного складу культури клітин СГ неонатальних поросят	58
2.15. Статистична обробка результатів	58
2.16. Реактиви	58

РОЗДІЛ III. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ І ІМУНОФЕНОТИПОВІ ВЛАСТИВОСТІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ У ВИГЛЯДІ МОНОШАРУ АБО МУЛЬТИКЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ

3.1. Морфофункціональні та імунофенотипові властивості моношарової культури із клітин СГ неонатальних поросят	60
3.2. Вплив складу культурального середовища на морфофункціональні й імунофенотипові властивості МС із клітин СГ неонатальних поросят	74

РОЗДІЛ IV. ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ У КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩАХ ІЗ РІЗНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ ДМСО НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА ІМУНОФЕНОТИПОВІ ВЛАСТИВОСТІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ

4.1. Кріоконсервування культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді клітинної суспензії	92
4.2. Кріоконсервування моношарової культури на різних	100

пасажжах

4.3. Кріоконсервування культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді мультиклітинних сфероїдів	103
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	114
ВИСНОВКИ	122
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	124
ДОДАТОК А	154
ДОДАТОК Б	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГС – глутамінсинтетаза

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ККСГ – культура клітин спінальних гангліїв

КПНГ – клітини–похідні нервового гребеня

МКА – молекули клітинної адгезії

МС – мультиклітинні сфероїди

МГ – мантийні гліоцити

НБК – нейробластоподібні клітини

НГ – нервовий гребінь

НС – нейросфери

НСК – нейральні стовбурові клітини

ПКМ – позаклітинний матрикс

ПНС – периферична нервова система

ПФА – параформальдегід

СГ – спінальні ганглії

ФТС – фетальна теляча сироватка

ХрА – хромогранін А

ЦНС – центральна нервова система

ЧН – чутливі нейрони

ШК – Шваннівські клітини

B27 – домішка у поживне середовище для культивування

β -III-туб (англ. *β III-tubulin*) – бета-III-тубулін

BDNF (англ. *brain-derived neurotrophic factor*) – нейротрофічний фактор мозку

bFGF (англ. *basic fibroblast growth factor*) – основний ростовий фактор фібробластів

BMPs (англ. *bone morphogenetic protein*) – кістковий морфогенетичний білок

DBH (англ. *dopamine beta-hydroxylase*) – дофамін- β -гідроксилаза

DMEM/F12 (англ. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) – поживне середовище Ігла у модифікації Дюльбекко з додаванням поживної суміші Ham's F-12

EGF (англ. *epidermal growth factor*) – епідермальний фактор росту

CNPase (англ. *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*) – фосфодіестерази 2,3-циклічних нуклеотидів;

GFAP (англ. *glial fibrillary acidic protein*) – гліальний фибрилярний кислий білок

hiPSC-NS / PCs (англ. *human induced pluripotent stem cell-derived neural stem / progenitor cells*) – індуковані людські плюрипотентні стовбурові клітини-NGF (англ. *nerve growth factor*) – фактор росту нервів

NT-3 (англ. *neurotrophin-3*) – нейротрофін-3

PBS (англ. *phosphate buffered saline*) – фосфатно-сольовий буфер

PI (англ. *propidium iodid*) – йодид пропідію

SCP (англ. *Schwann cell precursors*) – попередники Шваннівських клітин нервові стовбурові / прогеніторні клітини

CGRP (англ. *calcitonin gene-related peptide*) – кальцитонін-ген-зв'язуючий пептид

CDH19 (англ. *cadherin-19*) – кадгерин-19

M-CSF (англ. *monocyte colony stimulating factor*) – колонієстимулюючий фактор макрофагів

IGF-1 (англ. *insulin-like growth factor 1*) – інсуліноподібний фактор росту 1

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Культури, отримані з клітин спінальних гангліїв (СГ), є цінним модельним об'єктом для вивчення як фундаментальних питань нейробиології (механізмів сенсорного сприйняття, аксонального транспорту, передачі нервового імпульсу, регенерації нервів), так і практичних завдань медицини. Вони можуть бути використані в якості тест-систем для вивчення патогенних механізмів захворювань периферичної нервової системи (ПНС), пошуку потенційних нових способів нейропротекції, визначення ефективності та цитотоксичності нових лікарських засобів [1], а також в якості цінного джерела стовбурових/прогеніторних клітин і нейротрофічних чинників для лікування нейродегенеративних захворювань [2–4].

На особливу увагу заслуговують мантийні гліоцити (МГ) як гліальні представники ПНС. Дослідження останніх років свідчать про важливу роль МГ у створенні мікрооточення для нейронів, синаптичної передачі нервового імпульсу, рециркуляції нейромедіатора глутамата, відповіді на запалення або пошкодження периферичного нерва, розвитку патологічного хронічного болю [5–8]. У культурі *in vitro* встановлено, що МГ мають характеристики нейральних стовбурових клітин [9–11].

Варіювання умов культивування є інструментом для отримання культури клітин із заданими властивостями [12]. Одним із сучасних перспективних підходів є об'ємне (3D) культивування [13]. При такому способі культивування на відміну від моношарового (2D) клітини зберігають тканиноспецифічні властивості, притаманну для них просторову орієнтацію й експресію генів, знаходяться в належній регуляторно-трофічній взаємодії з клітинним мікрооточенням і позаклітинним матриксом, проявляють властивості більш ранніх прогеніторів [14–16].

Відповідно до сучасних тенденцій щодо розумного скорочування експериментів на тваринах [17, 18] актуальним завданням є створення запасів

біологічного матеріалу у вигляді клітинних культур для біомедичних та фармакологічних досліджень. При цьому важливими аспектами є не тільки кінцеві властивості культур, але й вибір виду тварин, з тканин і органів якого її отримують, а також розробка оптимальних способів довгострокового зберігання культури.

Кріоконсервування є найкращим вирішенням проблеми створення запасів біологічного матеріалу, оскільки дозволяє не тільки зберігати зразки протягом тривалого часу, але й сертифікувати їх, транспортувати й використовувати за необхідністю. У практиці культивування кріоконсервування має велике значення, оскільки дозволяє створювати запаси цінних зразків культур; запобігає втраті зразків через збої в роботі обладнання, забруднення мікроорганізмами; економить час, енергію та матеріали, необхідні для постійного пересіву культур; страхує від фенотипового дрейфу у культурі та від старіння культури.

Для більшості культур клітин протокол кріоконсервування включає поетапне заморожування зразка при повільних швидкостях охолодження з використанням 10% розчину ДМСО [19–21]. Однак дослідження, спрямовані на вдосконалення протоколів кріоконсервування з урахуванням індивідуальних особливостей культури клітин, оптимізацію складу кріозахисного середовища, швидкості охолодження і відтавання, залишаються актуальними.

На теперішній час існує декілька робіт, в яких було проведено кріоконсервування нейронів, отриманих зі спінальних гангліїв тварин [22, 23]. Однак досі не існує досліджень, в яких би було проаналізовано чутливість гліальних клітин СГ до факторів кріоконсервування.

При інтерпретації експериментальних даних і спробі їх перенесення в область практичної медицини або фармакології потрібно враховувати значні еволюційні відмінності, які існують між лабораторними гризунами й людиною. Найбільш сприятливим модельним об'єктом є свиня домашня (*Sus scrofa domesticus*). Порівняльні дослідження показують, що схожість генома

між людиною й свинею незрівнянно вища, ніж між людиною й мишею [24]. Крім того, наразі існує широкий спектр лінійних і трансгенних порід свиней, що робить зручнішим їх застосування в якості біомедичних моделей [25].

У практиці клітинного культивування культури клітин були отримані з чутливих гангліїв курячого ембріона [26], лабораторних гризунів [9, 27, 28], собаки [29, 30], бика [31] і мавпи [32]. У той же час, культури клітин СГ свиней майже не вивчені, що підкреслює актуальність досліджень, які проводяться в даному напрямку.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідної теми «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (шифр – 2.2.6.104, № державної реєстрації 0116U003494).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – отримання культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді моношарової культури і мультиклітинних сфероїдів (МС), вивчення їх морфофункціональних і імунофенотипових характеристик, а також оцінка впливу кріоконсервування в середовищах із різною концентрацією ДМСО на основні властивості культур.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити такі **завдання**.

1. Дослідити вплив складу культурального середовища, термінів культивування і субкультивування на утворення моношарової культури і МС з клітин СГ неонатальних поросят.

2. Оцінити морфофункціональні й імунофенотипові властивості моношарової культури і МС із клітин СГ неонатальних поросят.

3. Вивчити вплив кріоконсервування в кріозахисних середовищах із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні та імунофенотипові властивості МС з клітин СГ неонатальних поросят.

4. Вивчити вплив кріоконсервування в кріозахисних середовищах із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні і імунофенотипові властивості первинної культури з клітин СГ неонатальних поросят.

5. Дослідити вплив кріоконсервування в кріозахисних середовищах із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні властивості культури першого пасажу.

Об’єкт дослідження – формування моношарової культури і МС з клітин СГ неонатальних поросят у різних умовах культивування *in vitro* до та після кріоконсервування із різними концентраціями кріопротектора ДМСО.

Предмет дослідження – моношарова культура і МС з клітин СГ неонатальних поросят у різних умовах культивування *in vitro* до та після кріоконсервування з різними концентраціями кріопротектора ДМСО.

Методи дослідження. У роботі були використані методи ферментативного виділення клітин зі спінальних гангліїв, моношарове (2D) і об’ємне (3D) культивування, кріоконсервування, імуноцитохімічний метод, світлова та флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше було визначено ряд необхідних та достатніх умов культивування клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят.

Вперше було охарактеризовано основні морфологічні, імунофенотипові, проліферативні та міграторні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв (ККСГ) неонатальних поросят. Встановлені дані щодо принципів 2D та 3D-структурної організації культури, її клітинного складу та проліферативного потенціалу дозволяє рекомендувати ККСГ як цінний об’єкт для вивчення механізмів формування, розвитку та регуляції, які відбуваються у периферичній нервовій системі у неонатальний період.

Вперше було проведено кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді суспензії клітин та МС,

визначено стійкість клітин до кріоконсервування та його вплив на основні структурно-функціональні властивості ККСГ.

Вперше було встановлено концентрації кріопротектору ДМСО, які є оптимальними для отримання істотної кількості життєздатних клітин, зокрема мантийних гліоцитів, та сприяють збереженню співвідношення основних морфологічних типів клітин у культурі.

Вперше було встановлено залежність між кількістю пасажів ККСГ та стійкістю клітин до кріоконсервування. Встановлено, що кількість пасажів впливає не тільки на морфологічну різноманітність клітинних типів у ККСГ, але й підвищує її кріостійкість.

Практичне значення отриманих результатів.

Уперше було отримано культуру клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді моношарової культури або МС та встановлено режим її довгострокового збереження шляхом низькотемпературного консервування, що має практичну цінність для використання в галузях біології, медицини, біотехнології, ветеринарії, фармації. У результаті виконання роботи було розроблено методичні підходи та відпрацьовано цикл «культивування-кріоконсервування-субкультивування» для ККСГ, що дозволяє впровадити отриману культуру в практику для вивчення впливу фізико-хімічних факторів, лікарських речовин, стійкості до вірусів, створення тканинно-інженерних конструкцій, отримання нейротрофічних факторів та кондиціонованого середовища.

Вперше було вивчено здатність ККСГ неонатальних поросят до проліферації та диференціювання у 2D та 3D умовах, що є важливим для оцінки терапевтичної цінності подібних культур у практиці лікування нейродегенеративних хвороб.

Уперше встановлено, що режим кріоконсервування, який включає три етапи (І етап – зі швидкістю $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -20°C ; II етап – зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C ; III етап – занурення у рідкий азот) та використання кріозахисного середовища на основі 7,5% ДМСО, є прийнятним для кріоконсервування

мантійних гліоцитів. Цей результат може бути використано у практиці кріоконсервування гліальних клітин периферичної нервової системи, отриманих з інших джерел.

Отримані нові дані про процеси розвитку моношарової культури та МС зі спінальних гангліїв, а також їх чутливості до дії низьких температур, можуть бути використані для курсів лекцій і практичних занять студентів вищих навчальних закладів біологічного та медичного профілів.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, проаналізовано джерела літератури за темою дисертаційної роботи, написані всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримані експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистична обробка й зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором були інтерпретовані результати й зроблені остаточні висновки. Здобувачем спільно з к.б.н. Коваленко І. Ф. проведені дослідження з використанням методу флуоресцентної мікроскопії.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [33–43] – у плануванні експериментів, отриманні первинної культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят;
- у роботах [33, 38, 39] – в отриманні первинної культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят і вивченні впливу складу культурального середовища на її морфологічні та проліферативні характеристики;
- у роботах [34, 39, 41] – у вивченні впливу складу кріопротекторного середовища й трьохетапного режиму заморожування на морфофункціональні характеристики мультиклітинних сфероїдів, отриманих у первинній культурі клітин спінальних гангліїв новонароджених поросят;
- у роботах [35, 42, 43] – в оцінці впливу кріоконсервування в присутності різних концентрацій кріопротектору ДМСО на морфофункціональні

властивості культури клітин зі спінальних гангліїв, збагаченої мантійними гліоцитами;

– у роботах [34–36, 40, 42] – у вивченні за допомогою імуноцитохімічного методу експресії β -III-тубуліну, глутамінсинтетази, білка S100 і хромограніна А в культурі клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят.

– у роботах [37] впливу кріоконсервування в присутності різних концентрацій кріопротектора ДМСО на життєздатність і морфологічний склад культури клітин СГ неонатальних поросят різних пасажів.

– у роботах [34, 35, 37, 40, 41, 43] – в кріоконсервуванні клітин СГ у вигляді суспензії і МС.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи були представлені на 40-й і 43-й щорічних конференціях молодих вчених «Холод в біології та медицині» (Харків, 2016 року; 2019); XV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Наукові дослідження і розробки 2018 року» (Москва, 2018); 6-му Українському конгресі з клітинної біології з міжнародною участю (Яремча, 2019); 4-му національному конгресі з регенеративної медицини (РФ, Москва, 2019).

Публікації. За темою дисертації 11 робіт, з них 4 статті в спеціалізованих виданнях України (2 – входять у міжнародну наукометричну базу Scopus), 1 стаття в зарубіжному журналі, 6 публікацій у збірниках тез конференцій.

Об'єм та структура дисертації. Дисертація викладена на 156 сторінках друкованого тексту (з яких 108 сторінок основної частини) містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, 2 розділи результатів власних досліджень, обговорення результатів, висновки, список літератури. Список літератури, розміщений на 30 сторінках, включає 262 джерел, у тому числі 245 зарубіжних. Робота проілюстрована 19 рисунками, 29 мікрофотографіями і 1 таблицею.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Нервовий гребінь і його нейральні похідні

Нервовий гребінь (НГ) є транзитornoю ембріональною структурою, клітини якої мають розвинену здатність до міграції. З клітин НГ розвиваються ганглії периферичної нервової системи, які містять нейрони, мантийні гліюцити та шваннівські клітини, а також пігментні клітини шкіри, хрящі лицьового черепа, частини мозкових оболонок, хромафінні клітини наднирників, одонтобласти, клітини гладких м'язів серцево-судинної системи [44–46].

Клітини НГ мають здатність до самовідновлення та подібно до ембріональних клітин володіють певним потенціалом розвитку. Цікаво, що клітини - похідні нервового гребеня (КПНГ) присутні не тільки в нервовому гребені ембріона, але також у різних тканинах, що походять з НГ, організмі плода і навіть дорослому організмі [10, 44, 46–50]. Ці постміграторні субпопуляції КПНГ нагадують свої ембріональні аналоги за здатністю до самовідновлення і диференціювання в різні типи клітин [44].

З клітин НГ розвиваються нейрони гангліїв периферичної нервової системи, гліальні клітини (Шваннівські, МГ), меланоцити, а також ендокринні клітини – хромафінні клітини наднирників і С-клітини щитовидної залози [51]. Всі перераховані типи клітин відносяться до нейральних похідних НГ. Хондроцити, остецити, адипоцити, міофібробласти, клітини сполучної тканини також розвиваються з клітин НГ та являють собою його мезектодермальні похідні [51].

Експериментальні дані свідчать про те, що перед початком міграції з НГ деякі клітини є комітованими, але переважна більшість клітин диференціюється в результаті сигналів мікрооточення [52, 53]. Таким чином, КПНГ є гетерогенним пулом, який складається з клітин різного ступеню мультипотентності та пластичності, що було підтверджено низкою експериментів як *in vivo* [54, 55], так й *in vitro* [56–58].

Нервовий гребінь був уперше ідентифікований і описаний швейцарським ембріологом Вільгельмом Хісом у 1868 році як група клітин, локалізованих між нервовою трубкою і епідермісом у ембріонів хребетних тварин [44]. Клітини НГ виникають в ектодермі на краях нервової трубки й після етапу епітеліо-мезенхімального переходу й обширної міграції локалізуються у різних частинах тіла, сприяючи утворенню різних тканин та органів [44, 59]. Похідні НГ утворюються з чотирьох основних сегментів нейраксісу: черепного, кардіального, вагусного та тулубового НГ. Клітини НГ черепа, який виникає від проміжного мозку до третього соміта, утворюють черепно-лицьові структури: кістки й хрящі обличчя й шиї, сухожилля, м'язи й сполучні тканини вуха, очі, зуби й кровоносні судини. Вони також надають розвиток пігментним клітинам і більшій частині мозкової периферичної нервової системи, модулюють зростання і формування патерну мозку. Клітини НГ від оптичного зародку до 7-го соміта (кардіальний, вагусний рівень) дають початок вегетативним гангліям внутрішніх органів, зокрема кишківника, серця, легенів, деяким сполучнотканинним утворенням серця.

З тулубового відділу НГ утворюються чутливі спинномозкові ганглії і симпатичні пара- і превертебральні ганглії, мозкова речовина надниркових залоз [44, 58, 59]. Ці КПНГ мігрують за двома основними шляхами [60, 61]. Клітини, що мігрують за дорсальним шляхом, заселяють шкіру, де вони дають початок меланоцитам. Клітини, що мігрують за латеральним шляхом, генерують сенсорні і симпатичні ганглії та хромафінні клітини наднирників [44, 62, 63].

Міграція клітин НГ починається з повної або часткової епітеліо-мезенхімальної трансформації клітин, яка дозволяє їм відділятися від нейроепітелію і ектодерми [59, 64, 65]

Основними сигналами, які запускають процеси міграції, вважаються початок ремоделювання позаклітинного матриксу (ПКМ), зниження рівню експресії та подальше зникнення з поверхні мігруючих клітин певних

молекул клітинної адгезії (МКА, таких як N- і E-кадгеринів) [59]. Міграція клітин НГ залежить від наявності певного ПКМ, що в основному містить фібронектин, ламінін і деякі колагени, які й визначають шляхи міграції [66]. Подальше структурування клітин НГ в окремі потоки та їх точне націлювання на конкретні тканини контролюються низкою сигналів мікрооточення [60, 61, 67–71].

НГ дає початок утворенню периферичної нервової системи (ПНС). ПНС є комплексом анатомічних утворень, які здійснюють зв'язок центральної нервової системи (ЦНС) зі шкірним покривом, опорно-руховим апаратом, внутрішніми органами. ПНС утворена гангліями (черепними, спінальними і вегетативними), нервами (31 пара спинномозкових і 12 пар черепних) і нервовими закінченнями, які й забезпечують зв'язок ЦНС з усіма рецепторами і ефекторами організму [62].

Аферентна частина ПНС представлена уніполярними чутливими нейронами (ЧН), які розташовані в спінальних гангліях (СГ). Від соми ЧН відходить один довгий аксон, який роздвоюється на периферичну гілку, що формує сенсорні закінчення в шкірі, м'язах, внутрішніх органах, та центральну, яка простягається у спинний мозок [1, 72]. Еферентна гілка ПНС включає рухові і вегетативні нейрони, які беруть початок в спинному мозку або вегетативних гангліях і формують нервові закінчення в скелетних м'язах або внутрішніх органах відповідно [1].

1.2. Структурно-функціональні особливості спінальних гангліїв

Спінальні ганглії містять тіла ЧН, які передають сенсорну інформацію з периферії в ЦНС. Морфологічно в СГ розрізняють два типи ЧН: великі світлі та малі темні [72]. Малі нейрони мають немієлізовані аксони і відносяться до термо-, механо- і ноцицепції, тоді як великі нейрони являють собою низькопорогові механорецептори з мієлінізованими аксонами з високою швидкістю проведення імпульсів [72].

СГ є потенційним джерелом нейральних стовбурових клітин, оскільки було показано, що вони містять КПНГ, які здатні диференціюватися в

нейрони і різні субпопуляції гліальних клітин [2, 10, 73, 74]. Істотна відмінність загальної кількості нейронів в СГ між неонатальними і дорослими особинами (експерименти проводилися на щурах) при відсутності проліферації нейронів (ідентифікованої за допомогою бромдезоксіурідина) свідчить про те, що нейрогенез може підтримуватися протягом усього життя за рахунок популяції дормантних стовбурових/прогеніторних клітин [75].

З КПНГ формується різні клітини периферичної глії: Шваннівські клітини (ШК) периферичних нервів, МГ сенсорних і симпатичних гангліїв, глія кишкової нервової системи [45].

Відомо, що ранні КПНГ, так звані попередники ШК (Schwann cell precursors), мігрують уздовж периферичних аксонів і заселяють СГ. Диференціація цих прогеніторних клітин визначається факторами, які експресуються на аксонах і, перш за все, нейрорегуліном-1, що зв'язується з рецептором ErbB3. Процес розвитку МГ в СГ є менш вивченим, хоча було показано, що вибір шляху диференціювання між цими двома представниками периферичної глії визначається за допомогою Notch-опосередкованого латерального гальмування. Notch-ліганд Delta-1 експресується ранніми нервовими клітинами, в той час як недиференційовані клітини НГ експресують Notch-1. Якщо передача сигналів Notch активована, то клітина не може диференціюватися в нейрональному напрямку, а піддається гліогенезу. Цей механізм забезпечує фізіологічне співвідношення нейрональних та гліальних клітин у гангліях [45].

Існують роботи [76, 77], в яких показано, що навіть в СГ статевозрілого організму МГ експресують ряд маркерів прогеніторних клітин-попередників ШК, зокрема кадгерин-19 (CDH19). При спільному культивуванні МГ здатні мієлінізувати аксони нейронів, що дозволяє припустити високу пластичність цієї субпопуляції клітин СГ, яка в залежності від сигналів мікрооточення має потенціал до диференціювання/трансдиференціювання.

Мантійні гліоцити у складі СГ є спеціалізованими клітинами, що оточують тіла ЧН. Вважається, що МГ беруть участь в регуляції хімічного мікрооточення нейронів, здійснюють їхню структурну й трофічну підтримку, виділяють гліотрансмітери та полегшують передачу сигналу [78–83, 85]. Анатомічно, у СГ тіла ЧН є щільно упакованими, однак вони не утворюють синапси один з одним. Кожна сома ЧН оточена шаром МГ, утворюючи морфофункціональну одиницю. Клітинні скупчення (кластери), які містять по 2-3 нейрони та навколишні МГ, укладені в загальну делікатну сполучнотканинну оболонку.

З огляду на роль МГ у формуванні структурного і функціонального мікрооточення нейрона (механічна й трофічна підтримка, регуляція складу позаклітинного простору, створення бар'єру між нейронами та фенестрованими кровоносними капілярами, отримання та передача хімічних сигналів), більшість дослідників асоціюють МГ у ПНС з астроцитами у ЦНС. На користь такої схожості також свідчить те, що МГ здатні експресувати глутамінсинтетазу (ГС), GFAP [7], пуринергічні рецептори [86–88], різні цитокіни, аденозинтрифосфат (АТФ) [89] та інші хімічні месенджери [7, 90, 91]. Кількісні дослідження показали, що кількість МГ, яка припадає на нейрон, збільшується пропорційно обсягу нейрона. Це узгоджується з ідеєю, що МГ підтримують нейрони метаболічно [92]. Крім того, МГ можуть впливати на збудливість нейронів через щільні контакти та регулювати передачу аферентного сигналу [93].

Але, незважаючи на певну схожість з астроцитами, МГ мають набір власних унікальних властивостей. Наприклад, було встановлено, що МГ з ембріональних та неонатальних СГ є мультипотентними КПНГ і можуть диференціюватися в Шваннівські клітини, астроцити і олігодендроцити [10, 11, 94]. Крім того, в роботі [10] автори показали, що з експлантатів СГ виселяються КПНГ, які при певній стимуляції диференціюються не тільки в різні типи глії, а й в нейрони. З цього автори роблять висновок, що МГ можуть брати участь як в постійному, так і регенеративному нейрогенезі. Крім того,

МГ мають високі проліферативні властивості. Наприклад, після аксонотомії значно зростає співвідношення МГ/нейрон [78, 95].

Встановлено важливу роль МГ в патогенезі деяких неврологічних розладів і, особливо, в станах, що супроводжуються хронічним больовим синдромом [94–98]. Відомо, що МГ активуються за умов патологічних станів, таких як ушкодження периферичних нервів [99–103], діабет [104–106], хіміотерапія [107], герпесна інфекція [107], запалення [108, 109]. При цьому нейрони вивільняють специфічні медіатори, такі як АТФ, оксид азоту, білок, пов'язаний з геном кальцитоніну (CGRP) і речовину Р, які здатні активувати МГ. Активовані МГ, у свою чергу, також можуть вивільняти прозапальні агенти, які сприяють продовженню нейрональної сенсibiliзації [7]. Існують також переконливі докази виникнення морфологічних і біохімічних змін в МГ, а також їх активації [110, 111] і проліферації [99, 103] у відповідь на патологічну стимуляцію. Однак механізми, що призводять до цих реактивних морфологічних і біохімічних змін в МГ під час патологічного стану, все ще мало вивчені.

1.3. Морфологічні та фенотипові властивості мантийних гліоцитів

Щодо морфологічних особливостей МГ існують суперечливі дані. З огляду на той факт, що МГ створюють мікрооточення функціонально різним нейронам, вони цілком можуть мати різну форму. На підтримку даної теорії свідчать роботи [112–114]. Відомо, що МГ за розміром менше, ніж нейрони, можуть мати відростки [81], хоча інші автори вважають це артефактом [78]. У той же час, існують дані, що МГ морфологічно характеризуються неправильною формою з пластинчастими розширеннями і мікрворсинками, які збільшують площу їх поверхні [114]. У роботі [9] МГ охарактеризовані як клітини еліптичної форми з 2 відростками.

У роботі Siemionow зі співат. [113] вивчили ультраструктуру МГ і, ґрунтуючись виключно на морфологічних критеріях, прийшли до висновку, що існує три різних типи МГ: клітини 1-го типу (55,8%) містили овально-

веретеноподібні ядра з щільним хроматином, вони оточували сому нейрона; клітини 2-го типу (4%) – мають більші ядра з великою кількістю включень, прилягають до деяких нейронів певною стороною, на якій розташована багат шарова звивиста мембрана з органелами МГ. Дані особливості мембрани невиразні при спостереженні за допомогою світлового мікроскопа. Цей тип клітин раніше не був описаний, і їх функція не зрозуміла. Клітини 3-го типу (39,7%) частково розташовані в ендоневрії, а частково – асоційовані з аксонами (обволікають аксон в області цитоплазми). Особливість даних клітин в тому, що вони розташовуються поруч з нейроном, але не стикаються з ним.

Дані спостереження узгоджуються з результатами Nascimento зі співат. [112] про відмінність у морфології МГ й різницю у профілі білків, які вони експресують в залежності від приналежності до певного типу нейрону.

Характерною фенотиповою особливістю МГ є експресія глутамінсинтетази (ГС). Цей фермент каталізує АТФ-залежне перетворення глутамату в глутамін [115, 116]. Загальноприйняті маркери глії GFAP та S100 не є ідеальними в разі вивчення МГ, оскільки S100 експресується не тільки в МГ, але і в деяких нейронах СГ, а також ШК. GFAP у фізіологічних умовах експресується у МГ на низькому рівні, але підвищується при патологічному процесі (пошкодженнях нерва, запаленні або вірусній інфекції) [78, 112, 117]. Саме тому специфічним маркером МГ на теперішній час вважається ГС.

Однак експресія фенотипових маркерів МГ може залежати від низки факторів (видової приналежності організму або його віку, наявності пошкодження і т.д.). Так, наприклад, дослідження показали низьку експресію CNPase і GFAP у щурів Sprague Dawley у віці від 1 до 2 місяців, яка підвищувалася після пошкодження нерва [110, 118]. Навпаки, МГ, отримані від щурів Вістар у віці від 3 до 4 місяців, характеризувалися високою експресією GFAP [112]. Крім того, в СГ мишей лінії C57BL/6J віком 8 тижнів в МГ була виявлена висока експресія GFAP [119], тоді як у 4-місячних мишей лінії C57BL/6NCrl MP даний маркер не спостерігався [120].

У дослідженнях [32] показано, що МГ дорослих собак експресують CNPase, GFAP, віментин, нестин і Sox2. Робота Liu H. і співавт. [121] свідчить про те, що рівень експресії GFAP в МГ підвищується при пошкодженні периферичних нервів.

Багатьма авторами в умовах культивування була виявлена експресія клітинами СГ маркерів КПНГ, а саме нестину та P75^{NTR} [9, 10, 32, 122, 123]. Даний факт вказує на те, що популяція МГ в чутливих гангліях постнатального організму може містити нейральні стовбурові клітини

1.4. Характеристика різних підходів до культивування клітин чутливих гангліїв

Існує декілька форматів культивування клітин нервової тканини – культивування у вигляді експлантів (органна культура), а також культивування ізольованих клітин у вигляді моношару або тривимірних агрегатів (мультиклітинних сфероїдів).

Культивування ізольованих клітин включає 2 етапи: отримання суспензії дисоційованих (поодиноких клітин) за допомогою механічної та/або ферментативної обробки (наприклад, трипсином, папаїном, колагеназою) з подальшим їх культивуванням. Дисоціація є дуже важливим етапом отримання життєздатних клітин, від якого в значній мірі залежать результати культивування. Крім того, відомо, що обрані умови культивування (поживне середовище, ростові добавки, поверхня культивування, кількість пасажів) є селективним фактором, здатним значно змінювати цитоморфологічний і фенотиповий склад культури у порівнянні з вихідним.

Уперше дисоційовані клітини спинного мозку курячого ембріону були культивовані у вигляді моношару в роботі Cavanaugh у 1955 році [124]. На сьогоднішній день метод культивування у вигляді моношару широко використовується для нейральних клітин людини та тварин. Моношарові культури мають як переваги, так і недоліки в порівнянні з іншими форматами культивування. З одного боку, вони дозволяють проводити пряме

морфологічне спостереження і контроль за окремими клітинами. Формат моношару зручний при проведенні електрофізіологічних досліджень. Крім того, моношарові культури складаються з гомогенної популяції клітин-попередників (на відміну від сфероїдів) [125], що дозволяє відстежити процес диференціювання окремих клітин. Однак цей метод не дозволяє вивчати тривимірні міжклітинні взаємодії та їх вплив на функціонування клітин.

Однією з найбільш зручних моделей для вивчення механізмів розвитку захворювань ПНС, а також пошуку потенційних мішеней для нейропротекції і регенерації аксонів є культура клітин, отримана зі СГ.

У СГ тіла нейронів оточені мантийними гліоцитами (МГ), які є представниками гліальних клітин периферичної нервової системи, як і Шваннівські клітини, що створюють мієлінізацію аксонів. СГ оточені сполучнотканинною капсулою, між нервовими волокнами теж знаходиться прошарок сполучнотканинних компонентів (ендонеурія) з кровоносними судинами [126], що проходять по ним. Таким чином, первинна культура клітин, отримана зі СГ, може містити різні типи клітин (тіла нейронів, фібробласти, гліальні і ендотеліальні клітини).

Культури клітин зі СГ активно вивчалися, починаючи з 70-х років 20 століття, і досі, до цього часу, є зручним об'єктом завдяки простоті отримання та підтримки *in vitro*. Однак цим методом в основному досліджувалися функціональні властивості сенсорних нейронів, у той час як гліальні клітини залишалися на периферії зацікавленості широкого кола дослідників аж до останнього десятиліття.

Встановлено, що морфологічні та фенотипові властивості клітин, що ростуть в культурі зі СГ, значно залежать від умов культивування (склад поживного середовища, присутність ФТС, адгезивність поверхні). Наприклад, при культивуванні клітин СГ мишачих ембріонів в середовищі MEM, збагаченому 10% сироватки коня і 10% ФТС, на 9 добу спостерігався моношар, який складався з дрібних, веретеноподібних клітин, що представляють собою МГ, і великих розпластаних фібробластоподібних

клітин [127]. На моношарі розташовувалися поодинокі або зібрані в невеликі групи нейрони з відростками.

Ці результати збігаються з даними роботи [128], в якій Meller отримав суспензію клітин зі СГ курячого ембріона, потім культивував на обробленій для поліпшеної адгезивності поверхні в культуральному середовищі, що містить 10% ФТС. У початкову добу культивування великі нервові клітини були чітко впізнаваними, вони організовувалися групами. Їх оточували групи МГ.

В роботі Poulsen та співавт. у первинній культурі, отриманій з ганглію трійчастого нерва дорослих щурів на середовищі Ham's F12 без спеціального покриття культурального пластика, на 2 добу спостерігалися невеликі групи клітин з довгими тонкими або великими сплюсненими відростками. Через 7 діб у культурі спостерігалася проліферація клітин. Морфологія клітин змінювалася: ставало менше клітин з великими сплюсненими відростками, але більше клітин з довгими і тонкими. На 14 добу культивування велика частина клітин набувала веретеноподібної форми. Моношар досягав конфлюентності, а на 21 добу культура являла собою клітини, що ростуть в кілька шарів. У деяких місцях почали утворюватися клітинні кластери, частина клітин мала відростки, які були орієнтовані в одному напрямку. Клітини були ідентифіковані як МГ за використаними маркерами GFAP та ГС [8].

У роботі Belzer V. та співавт. були детально вивчені процеси розвитку первинної культури, отриманої з ганглію трійчастого нерва дорослих мишей при культивуванні на середовищі альфа-МЕМ з 10% ФТС і без спеціального покриття культурального пластика [129]. Автори відзначають, що у початкові 6 годин культивування клітини прикріплялися до поверхні культурального посуду. У цей момент у культурі ідентифікувалися 2 типи клітин – великі тіла чутливих нейронів і прилеглі до них дрібні МГ. Через 24 години в культурі у МГ з'являлися товсті широкі або тонкі довгі відростки. Частина МГ починала мігрувати від нейронів. Максимум міграції МГ від нейронів спостерігався на 2-у добу після початку культивування. На

2–7 добу було зафіксовано активну проліферацію МГ, тоді як кількість нейронів зменшувалася. У цей же час змінювалася форма МГ: деякі клітини були розпластаними і характеризувалися неправильною формою, інші набували веретеновидної форми з двома відростками. За тиждень в культурі кількість веретеноподібних клітин збільшувалася, і вони покривали більшу частину поверхні культивування, а іноді розташовувалися в декілька шарів, однак рівень експресії ГС у цих клітинах був досить низьким. У деяких місцях клітини формували кластери. У культурі спостерігалися також фібробласти.

Ці дані суперечать результатам роботи Laursen та співавт., в якій культура клітин, отримана з експлантів трійчастого нерва дорослих щурів, характеризувалася високим рівнем експресії ГС і GFAP з 7-ї до 21-ї доби культивування [130]. Ця суперечність даних може бути пов'язана з різними видами тварин, а також тим, що культури були отримані різними способами.

Wang та співавт. отримували культуру з експлантів СГ неонатальних щурів. Експланти поміщали в чашки Петрі, з поверхнею, покритою полі-D-лізином (для посилення адгезії), вирощували в середовищі ДМЕМ/F12, з додаванням B27, БСА (3%), GlutaMAX, (дексаметазону 2, мкг/мл, інсуліну 0, 5%, T3 10 мкг/мл, T4 400 мкг/мл, NRG- β 1). Це культуральне середовище не містило сироватки та в поєднанні з домішкою B27 інгібувало проліферацію фібробластів і Шваннівських клітин, та вибірково сприяло виживанню МГ. У той же час, присутність в культуральному середовищі глутаміну викликало загибель дорослих нейронів. Культивування в подібних умовах призводило до міграції з експлантів клітин і формуванню моношару, що складався з клітин еліптичної форми з біполярними відростками, які авторами були ідентифіковані як МГ за експресією ГС (97,10%), GFAP (67,69%) і S100 (91,66%) [9].

Схожі результати, а саме утворення моношарової культури клітин, що містила МГ, були отримані при культивуванні клітин, виділених зі СГ дорослих щурів ферментативним способом, в середовищі Neurobasal, що не

містить сироватки, з додаванням B27, БСА та GlutaMAX. Використання культуральних середовищ, що не містять ФТС, сприяє пригніченню проліферації фібробластів в культурі клітин [131].

У роботі Schwarz та співавт. первинна культура клітин, виділена зі СГ 6-місячних собак, складалася з великих круглих нейрональних клітин і МГ, представлених переважно веретеноподібними біполярними, іноді мультиполярними клітинами. Клітини, після виділення, були центрифуговані в градієнті щільності перколла (25% та 27%), після чого висіяні в планшети, покриті полі-L-лізином і ламініном [22].

Tongtako та співавт. отримували культуру МГ зі СГ статевозрілих собак, мишей і мавп на середовищі DMEM з додаванням 10% ФТС. СГ були попередньо дисоційовані на поодинокі клітини і висіяні в концентрації 1×10^5 клітин на полі-L-лізінову поверхню. Дослідження показали, що культури клітин, отримані зі СГ собак і мишей, мають морфологічно 4 клітинних типи, включаючи веретеноподібні, мультиполярні, сплюснені фібробластоїдні і маленькі круглі клітини [32]. Ці типи були виявлені в рівних кількостях в культурах клітин зі СГ собак, тоді як в культурах зі СГ мишей спостерігалися рівні кількості веретеноподібних, мультиполярних і фібробластоїдних клітин. У дослідженнях Wang та співавт. показано, що культивування експлантів СГ в середовищі, що не містить сироватки, з додаванням B27 інгібувало проліферацію фібробластів і Шваннівських клітин і вибірково сприяло виживанню МГ [9].

Таким чином, вищенаведені дані свідчать, що МГ характеризуються активним ростом у культуральних середовищах з сироватками або їх заміниками. Якщо потребуються культури, збагачені нейронами, тоді культивування проводять на безсироватковому середовищі з додаванням N2, інсуліну (5 г/мл), трансферину (100 мкг/мл), прогестерону (20 нмоль), путресцину та селену (30 нмоль) [132]. У роботі на щурах після отримання поодиноких клітин зі СГ їх центрифугували в градієнті 15% БСА (автори вважали, що таким чином вони отримують культуру, збагачену нейронами),

після чого сіяли на адгезивну поверхню і культивували в Ham's F12 з 1% сапплементу N2 [27].

Лі та співавт. було показано, що в СГ статевозрілих щурів присутні клітини, здатні в умовах *in vitro* в залежності від наявності в культуральному середовищі сироватки диференціюватися в нейрони, глію (в безсироватковому середовищі) і гладком'язові клітини, що підтверджувалося аналізом маркерів, які експресувалися цими клітинами. При цьому в умовах культивування з експлантів СГ дорослих щурів виселяються клітини, які в середовищі, що містить поживне середовище Neurobasal, глутамін, bFGF, EGF, БСА, гепарин, 2-меркаптоетанол і ретинову кислоту, здатні формувати флотуючі сфероїди. Після дисоціації даних сфероїдів на поодинокі клітини зберігалася здатність до формування нових сфероїдів аж до 3-ї генерації. Клітини таких сфероїдів були здатні в певних умовах диференціюватися в нейрональні, гліальні і гладком'язові [10]. Поряд з цими даними, авторам не вдалося отримати сфероїди з дисоційованої культури клітин СГ, що може пояснюватися порушенням міжклітинних взаємодій, зміною клітинного оточення і втратою деяких поверхневих рецепторів при отриманні дисоційованої культури.

Singh та співавт. встановлено, що при отриманні культури зі СГ без дисоціації на окремі клітини і в умовах стимуляції ростовими факторами (EGF, FGF) можливо довгострокове (протягом декількох років) підтримання мультипотентних властивостей КПНГ [2]. При цьому спостерігається збереження чутливості КПНГ до дії NGF і BDNF. Трансплантація таких клітин в область спінальної травми показала їхню здатність до диференціювання в сенсорні нейрони [2].

При отриманні культури з попередньо дисоційованих ембріональних і неонатальних СГ щурів на поживному середовищі Neurobasal c B27 і факторами росту Svenningsen A. і співавт. виділили клітини-попередники олігодедроцитів [11]. Причому, вони були виявлені в культурах, отриманих зі СГ ембріонів E17 і неонатальних (P0 і P8) тварин, але не з дорослих СГ, що вказує на певні детермінанти, які обмежують мультипотентність КПНГ.

У роботі Mudge A. і співавт. при культивуванні клітин СГ курячого ембріона до 5-8 діб в культурі формувалися і відокремлювалися прикріплені клітинні агрегати сферичної форми, з яких виселялися нейробластоподібні клітини, утворюючи радіальні тяжі [26].

З часу відкриття гліальних клітин понад сто років тому було досягнуто суттєвого прогресу в розумінні походження, розвитку і функціонування різних типів гліальних клітин в ЦНС і ПНС [133]. Подібно нейронам, астроцити і олігодендроцити мають нейроектодермальне походження [134], тоді як Шваннівські клітини і МГ виникають з НГ [135, 136]. Клітини мікроглії утворюються з мезенхімальних попередників жовткового мішка, які проникають в нервову систему під час ембріонального розвитку [137, 138]. Досить імовірно, що різниця в походженні і розвитку клітин різних нейральних ліній накладає відбиток на властивості, що проявляються в культурі *in vitro*.

1.5. Закономірності формування мультиклітинних сфероїдів

Отримання мультиклітинних сфероїдів (МС) є одним з перспективних підходів культивування клітин різних тканин. Даний підхід заснований на природній схильності клітин перебувати в оточенні таких же клітин на відміну від класичної моношарової культури, в якій клітини контактують тільки в одній площині. МС *in vitro* імітують процеси, які відбуваються в організмі, такі як ембріогенез, морфогенез, органогенез [139]. МС є клітинні агрегати з певною архітектонікою, в яких спостерігаються градієнти поживних речовин, газів, факторів росту і сигнальних клітин, які характерні для клітин у складі тканини в організмі.

Вперше МС були отримані Moscona A. та співавт. [140]. Вони продемонстрували, що дисоційовані клітини нервових тканин птахів і ссавців в культурі можуть збиратися в агрегати з характеристиками, подібними до інтактної тканини [140]. Далі у ряді робіт було показано, що такі тривимірні клітинні утворення здатні зберігати особливості тканини, з якої вони були

отримані. Так, наприклад, МС, отримані з кардіоміоцитів [141], мають здатність до скорочення, з гепатоцитів – виконувати функції печінки [141], а з ендотеліальних клітин – васкуляризовувати тканини [142].

Багатоклітинна структура МС має складну архітектоніку, динамічні взаємодії клітина-клітина і клітина-матрикс [143], що дозволяє краще зрозуміти міжклітинні взаємодії, процеси розвитку тканин в цілому, а також розвиток пухлинного процесу [143].

Утворення МС в процесі культивування *in vitro* характерне для стовбурових клітин різного ступеню зрілості і дозволяє забезпечити їх розвиток відповідно до просторово-часових факторів. У роботі [144] показано, що МС, утворені клітинами різного ступеню комітованості, неоднакові. Наприклад, МС, утворені плюрипотентними стовбуровими клітинами, повторюють розвиток ембріона і складаються з клітин 3 (трьох) зародкових листків. МС, утворені мультипотентними клітинами, є гетерогенною популяцією клітин, що повторюють розвиток тієї тканини, з якої вони отримані. Подібні МС містять комітовані клітини, здатні до проліферації і диференціації [144, 145]. Процес сфероутворення забезпечує реалізацію залежної від часу програми розвитку, закладеної в геномі [144]. Це робить МС перспективним об'єктом для вивчення особливостей ембріогенезу.

Клітинний склад МС неоднорідний. Наприклад, в центрі нейросфер (особливо великих) клітини є більш диференційованими, ніж на периферії [145]. Це пояснюється тим, що міжклітинні взаємодії всередині нейросфер перешкоджають підтриманню стовбурових клітин [146, 147].

Процес формування МС включає 3 основних етапи [143, 148]: 1) утворення пухких агрегатів в результаті спонтанного зближення і взаємодії через молекули позаклітинного матриксу (ПКМ) поодиноких клітин; 2) активацію експресії і накопичення кадгеринів на поверхні мембрани клітин в результаті міжклітинних контактів; 3) утворення щільних МС за рахунок утворення зв'язків «кадгерин-кадгерин» між клітинами [143, 149]. Крім кадгеринів, у процесі сфероїдоутворення також беруть участь і інші білки

міжклітинної адгезії, такі як коннексин і паннексин, а також білки цитоскелету [143, 149, 150].

У зв'язку зі щільною упаковкою клітин і відсутністю судин у великих агрегатах можуть виникнути труднощі дифузії поживних речовин, особливо кисню, до центральних клітин. Якщо діаметр сфероїду перевищує 200-250 мкм, виникає градієнт концентрації кисню з найменшою його кількістю в центрі сфероїду [151]. Крім цього, у великих сфероїдах накопичуються вуглекислий газ і продукти життєдіяльності клітин. З огляду на всі ці фактори, сфероїди розміром більше 500 мкм в діаметрі можна умовно поділити на кілька шарів, що відрізняються функціональною активністю та життєздатністю клітин [152].

Зовнішній шар МС представлений клітинами, що активно діляться. Ці клітини характеризуються наявністю нормального ядра, великої кількості мікроворсинок (філоподій) [153–155] і є метаболічно активними. Середній шар представлений клітинами, у яких розміри ядра і мембрани скорочені, щодо інтактних, вони є метаболічно слабо активними. Ці клітини знаходяться в стадії спокою, проте активуються при наявності достатньої кількості поживних речовин. Внутрішній шар, також званий некротичним ядром, представлений клітинами, в яких відбулися незворотні порушення в ядрах і мембрані внаслідок нестачі поживних речовин і накопичення продуктів розпаду. Товщина кожного шару залежить від розміру МС [143; 156–158]. За даними авторів [159] максимальний розмір МС, який повністю складається з живих клітин, становить 100–150 мкм, що обумовлено здатністю до дифузії кисню.

На сьогодні розроблені різні підходи для отримання МС, які можна розділити на три групи:

1. Отримання МС з суспензії клітин (matrix-free). Для реалізації даного підходу зазвичай використовуються середовища, збагачені ростовими факторами, низько- або неадгезивна культуральна поверхня [143, 160–163], культивування клітин методом «стікаючої краплі» [165, 165] або колбі, яка

обертається, ротаційних біореакторах [166–168], а також вплив на клітини зовнішніми силами (електромагнітними, акустичними) [169–174]. В цілому, даний метод є найбільш простим, швидким і дешевим, однак він не дозволяє контролювати розмір отриманих МС.

При використанні поживних середовищ, збагачених ростовими факторами, формування сфероїдних структур було відзначено в культурах, отриманих з рогівки і сітківки ока, шкіри, серця, гіпофізу, наднирників, печінки, плаценти [49, 144, 175–180], клітин пухлин [160, 181, 182].

2. Отримання МС з суспензії клітин, які вбудовуються в матрицю гідрогелю (matrix-based). Для отримання МС подібним способом клітинну суспензію культивують на спеціальному матриксі, який може бути виготовлений як з натуральних біополімерів (колаген, хітозан, фібрин, агар та інш.), так і штучних (поліетиленгліколь, поліетиленоксид, полі-N-ізопропілакріламід та інш.) [148, 183–186].

Гідрогелеві скаффолди є біомімікативними матрицями, що характеризуються здатністю утворювати клітинно-матричні взаємодії. Структура каркаса, морфологія та склад його компонентів можуть бути скориговані для створення найбільш оптимального мікросередовища для МС [187]. Серед основних недоліків даного підходу – необхідність відділення отриманих МС від матриксу.

3. Отримання МС за допомогою мікрофлюїдних платформ (microfluidic platforms). Даний метод дозволяє локально контролювати і коригувати фізико-хімічні властивості, такі як напруженість кисню, температура, рН, осмолярність, концентрація розчинних факторів [188]. Основна перевага даного методу – можливість контролювати розмір МС [189], а також перспективність отримання МС у промислових масштабах.

У даний час добре вивчені МС, що формуються з певних областей мозку (нейросфери, НС) [144, 190–192]. FGF-2 і EGF, окремо або в комбінації, є основними мітогенами для ізоляції та підтримки НС в культурі. При цьому

EGF діє як фактор, що активує проліферацію і виживання [193], в той час як FGF-2 підтримує стовбурові клітини НС в незрілому стані [194].

Сукачем та співавт. при культивуванні ембріональних нейрональних клітин як в культуральному середовищі, що не містить ФТС, але в присутності факторів росту (FGF і EGF), так і в культуральному середовищі з ФТС, були отримані флотуючі НС, які при подальшому культивуванні (більше 10 діб) прикріплялися до поверхні культурального посуду [144]. Після прикріплення НС спостерігалось їх диференціювання в нейрони і гліальні клітини [195]. Ці дані узгоджуються з даними роботи [125], в якій автори отримували НС з дисоційованої культури клітин мозку дорослих мишей. При культивуванні клітин, виділених з субвентрикулярної зони і зубчастої звивини мозку мишей в присутності B27, FGF-2 і EGF спостерігалось формування НС протягом перших 2-3 діб росту. Культивування НС більше 7–10 днів призводило до збільшення їх розміру з наступною спонтанною адгезією до поверхні культурального посуду і диференціюванням у нейрональні та гліальні клітини.

Кувачевою та співавт. при культивуванні прогеніторних нервових клітин, виділених з гіпокампу і стінок бічних шлуночків дорослих щурів, в середовищі «NeuroCult» NS-A Proliferation були отримані НС. При цьому більш динамічне утворення НС спостерігалось з клітин, отриманих від тварин 7- 9 місяців в порівнянні з тваринами 23-25 місяців. Крім того, НС, отримані з клітин молодих тварин, характеризуються великими розмірами, вони більш структуровані і стабільні [191].

При отриманні попередньо дисоційованої культури з мозку ембріонів щурів, Моргуном та співавт. спостерігали формування НС вже через добу, після виділення і культивування у середовищі «NeuroCult» NS-A Proliferation. Подальше культивування отриманих НС у поживному середовищі ДМЕМ, що містило 10% ФТС та ростові фактори M-CSF і/або bFGF, призводило до їх диференціювання в астроцити. У той же час, культивування в середовищі «NeuroCult» NS-A Proliferation у присутності факторів bFGF і/або EGF стимулювало диференціювання НС в нейрони [196]. Ці дані також

узгоджуються з даними, отриманими Сукачем та співавт., в якій авторами спостерігалось утворення флотуючих НС при культивуванні клітин мозку новонароджених щурів в середовищі DMEM/F12 з 10% ФТС протягом першої доби росту [192].

Здатність формувати НС вважається одним з маркерних властивостей НСК. Останнім часом з'являється все більше робіт, які свідчать про наявність НСК або більш пізніх прогениторів в гангліях ПНС.

Diensthuber M. та співавт. показали можливість отримання флотуючих МС при культивуванні клітин, виділених із спірального чутливого ганглію постнатальних мишей, в безсироватковому середовищі DMEM/F12 в присутності B-27, EGF, bFGF, IGF-1, гепаринсульфати [155]. Утворення МС спостерігалось на 3-5 добу після виділення. Клітини, що знаходяться на периферії, містили велику кількість філоподій і мітохондрій, що свідчить про їх високу проліферативну активність. Цікаво, що формування МС відбувалося як без факторів росту, так і в їх присутності. Найбільш сильним стимулятором утворення МС був bFGF. Культивування подібних МС на желатиновій підложці в присутності BDNF, B-21 і NT-3 призводило до їх адгезії і подальшого диференціювання в нейрони і глію.

Таким чином, існує багато даних щодо отримання МС з нервової тканини ЦНС у вигляді НС, однак практично робіт, які б стосувалися МС, отриманих з ПНС, надзвичайно мало.

1.6. Кріоконсервування культур нейральних клітин

Широке застосування тканин і клітин тварин, а також органотипових і первинних клітинних культур в різних областях біології та біотехнології, ветеринарної та клінічної медицини вимагає розробки нових або вдосконалення вже існуючих протоколів їх тривалого зберігання. Кріоконсервування є одним із способів довгострокового зберігання біологічного матеріалу. На сьогоднішній день для багатьох тканин і клітин створені протоколи заморожування і відтавання, що дозволяють зберігати

біоматеріал з мінімальними структурними ушкодженнями і максимальним збереженням його фізіологічних функцій [197, 198].

Кріоконсервування – процес, при якому клітини або тканини піддають дії низьких температур, як правило, від -80°C до -196°C , з метою зупинки функціональної активності внутрішньоклітинних процесів [194], що дозволяє зберігати клітини протягом тривалого часу. Існують різні методи кріоконсервування, які в основному розрізняються за швидкістю заморожування/відтавання і виду кріопротектору в складі кріозахисного середовища [199–202]. Диметилсульфоксид (ДМСО) найбільш широко використовується як кріопротектор для кріоконсервування нервової тканини і нейрональних попередників [23, 203–207]. Однак високі концентрації ДМСО (більше 12%) мають виражену токсичну дію на клітини [208–210].

ДМСО – кріопротектор ендоцелюлярної дії, який впливає на процес зародкоутворення кристалів льоду і його формування у середині клітини. При збільшенні концентрації ДМСО в середовищі від 1% до 15% розмір внутрішньоклітинних кристалів льоду знижується більш ніж в 10 разів [211].

Для кріоконсервування клітин нервової тканини успішно використовуються протоколи, що включають як повільні, так і швидкі швидкості охолодження (вітрифікацію) [212, 213].

Протоколи кріоконсервування нервової тканини у вигляді суспензії клітин або їх агрегатів (нейросфер або експлантів) неоднакові як за застосовуваними кріопротекторами, так і швидкостями охолодження [202, 210].

1.6.1. Кріоконсервування культур нейральних клітин у вигляді клітинної суспензії

Кріоконсервування моношарових культур включає кілька етапів: дезагрегацію клітинного моношару (найчастіше ферментативна), заморожування, відтавання, видалення кріопротектору. Кожен з цих етапів є істотним і впливає на збереження, життєздатність і функціональність клітин.

Для дисоційованих культур дуже важливо відновити як після виділення, так і після кріоконсервування взаємодію клітин одна з одною, а також з позаклітинним матриксом, оскільки це запускає певні сигнали виживання клітин і запобігання апоптозу [214, 215]. Найчастіше клітини дисоційованих культур не можуть швидко відновити мікрооточення, що супроводжується запуском апоптозу ті їхньою загибеллю. Зниження життєздатності клітин, заморожених у вигляді клітинної суспензії, також може бути пов'язано з порушенням цілісності мембрани в ході механічної або ферментативної дисоціації клітин, що саме по собі є несприятливим фактором, крім того, тягне більш швидке проникнення в клітини ДМСО і різке збільшення його внутрішньоклітинної концентрації, що може спричинити цитотоксичний ефект до замерзання зразка [199, 201, 202, 216–218].

Так, за даними Parker та співавт. кріоконсервування первинної культури клітин нейронів кори головного мозку ембріонів мишей (E17) у кріозахисному середовищі, що містить 50% ФТС, 40% ДМЕМ і 10% ДМСО, зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ з подальшим зануренням в рідкий азот дозволяло отримати не більше 18% життєздатних клітин після розморожування [219].

Ці дані також узгоджуються з роботою Ma X. і співавт. [210], в якій показано, що кріоконсервування клітин гіпокампу 13–15 денних плодів щурів у кріозахисному середовищі, що містить від 5 до 10% ДМСО, зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C з подальшим зануренням в рідкий азот, у вигляді суспензії поодиноких клітин дозволяє отримати вдвічі менше життєздатних клітин (від 20 до 40%) у порівнянні із замороженими у вигляді сфероїдів (від 40 до 80%).

Аналогічні дані також були отримані Ляшенко та співавт. [220]. При кріоконсервуванні клітин мозку новонароджених щурів у розчинах, що містять від 2,5 до 12% ДМСО, як з сироваткою крові, так і без неї, в режимі, описаному в попередній роботі, після відтавання вдалося отримати не більше 40% життєздатних клітин.

Робіт з низькотемпературного зберігання клітин, отриманих з чутливих гангліїв, дуже мало, проте ті, що існують, також свідчать про досить низьке збереження клітин після кріоконсервування.

Так в роботі [22] Schwarz та співавт. при кріоконсервуванні свіжовиділених клітин, отриманих зі СГ собак, в кріозахисному середовищі на основі поживного середовища MEM, 10% ДМСО, 31% ФТС зі швидкістю охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C з подальшим зануренням в рідкий азот, після відтавання життєздатність клітин була знижена в середньому в 2 рази (становила не більше 20%), щодо нативних зразків. Крім того, в культурі, яку заморожували, кількість клітин знизилася в 2 рази. При цьому зберігалася співвідношення нейронів і гліальних клітин, але кількість нейронів, здатних формувати відростки, знизилася більш ніж у 5 разів. Ці дані також узгоджуються з даними, отриманими в роботі [221].

При кріоконсервуванні суспензії клітин важливим фактором також є концентрація клітин в ній. У роботі [222] Nishiyama та співавт. було показано, що кріоконсервування культури клітин hiPSC-NS/PCs у кріозахисному середовищі Stem-Cellbanker (містить 10% ДМСО, глюкозу і високомолекулярну речовину, описану в Японській Фармакопії в якості другого кріопротективного агента) зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C призводить до зниження клітинної життєздатності до 34%. При цьому життєздатність клітин, заморожених в концентрації 5×10^6 клітин/мл нижча, ніж в концентрації 2×10^6 клітин/мл. Подальше зниження концентрації клітин призводило до значного зниження даного показника.

1.6.2. Кріоконсервування культур нейральних клітин у вигляді сфероїдів

З огляду на той факт, що для виживання клітин одним з визначальних чинників є мікрооточення і можливість утворення міжклітинних контактів [215], кріоконсервування клітин нервової тканини у вигляді сфероїдів вважається дуже перспективним.

Ряд робіт [192, 210, 223] свідчить про те, що процес кріоконсервування чинить неоднаковий вплив на поодинокі та заморожені у вигляді агрегатів клітини. Була показана більш висока збереженість клітин нервової тканини, підданих кріоконсервуванню у вигляді сфероїдів у порівнянні із суспензією клітин.

Так, наприклад, в роботі [224] автори проводили кріоконсервування нейральних стовбурових клітин, отриманих з медіального гангліозного горбка ембріонів мишей лінії CD-1 (вік E12-E13), у вигляді НС, свіжовиділених експлантів, а також суспензії поодиноких клітин, в кріозахисному середовищі на основі DMEM/F12, що містило 10% ДМСО, зі швидкістю охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот. Після відігрівання кріоконсервованих зразків життєздатність клітин, заморожених у вигляді суспензії, знижувалася в порівнянні з інтактними зразками і становила $66,47 \pm 12\%$. Життєздатність клітин з експлантів становила $76,90 \pm 2,4\%$. Життєздатність клітин, заморожених у вигляді НС, значно не відрізнялася від незаморожених і становила $92,23 \pm 7,3\%$. Цікаво, що НСК, заморожені у вигляді експлантів, мали високу здатність до генерації вторинних НС, в той час як НСК, заморожені у вигляді НС або поодиноких клітин, повністю втрачали цю здатність.

Ці дані також узгоджуються з роботою [210], в якій Ма та співавт. показали, що збереженість клітин нервової тканини, кріоконсервованих у вигляді суспензії клітин, значно нижчі, ніж заморожених у вигляді сфероїдів.

Одним з критичних чинників, які в процесі кріоконсервування впливають на збереженість клітин, є діаметр сфероїдів, оскільки можливість і швидкість проникнення кріопротектору в клітини, що знаходяться в центрі сфероїду або на його периферії, неоднакова.

У роботі [222] Nishiyama та співавт. було показано, що життєздатність нейросфер hiPSC-NS/PC діаметром більше $80,2 \pm 2,9$ мкм після кріоконсервування в кріозахисному середовищі Stem-Cellbanker зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C була вкрай низькою. Життєздатність клітин НС з діаметром

від 80 до 100 мкм, отриманих при культивуванні клітин гіпокампу 13–15 денних плодів щурів та заморожених у середовищі з 8% ДМСО зі швидкістю 1°C/хв до -80°C з подальшим зануренням в рідкий азот, була більше 80% [210]. У роботі Сукача О.М. і співавт. [193] НС діаметром 100 мкм, отримані при культивуванні клітин мозку новонароджених щурів, піддавали кріоконсервуванню зі швидкістю 1°C/хв до -80°C з подальшим зануренням в рідкий азот в кріозахисному середовищі на основі ДЕМЕМ/F12, 10% ДМСО, 5% ФТС. Після відтавання отримували близько 50% життєздатних НС, які, аналогічно незаможеном зразкам, зберігали здатність до адгезії, міграції з них клітин і подальшого диференціювання в клітини глії і нейробласти.

Однак даних про кріоконсервування культур клітин, отриманих зі СГ, або ізольованих МГ, в доступній науковій літературі не зустрічається, що підкреслює актуальність досліджень, які проводяться в даному напрямку

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Схема експерименту і експериментальні тварини

Джерелом біологічного матеріалу – спінальних гангліїв – служили поросята першого покоління гібридів порід велика біла/ландрас і макстер/дюрок у першу добу після народження. Всього в експериментальній роботі було використано 47 новонароджених поросят, при цьому для кожного експерименту проводили від 3 до 10 повторів. Експерименти були проведені відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р) при дотриманні вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Експериментальна робота була поділена на три етапи (рис. 2.1.). На першому етапі отримували культуру клітин зі СГ у вигляді моношару, клітини якого піддавали кріоконсервуванню у вигляді клітинної суспензії. На другому етапі роботи здійснювали пересів моношарової культури, після чого також заморожували клітинну суспензію на першому пасажі. На третьому етапі отримували культуру зі СГ неонатальних поросят у вигляді МС, які в подальшому кріоконсервували. На всіх етапах кріоконсервування здійснювали у кріозахисному середовищі з різною концентрацією кріопротектору ДМСО. В рамках виконання кожного етапу роботи вивчали основні морфофункціональні властивості нативної і кріоконсервованої культури, отриманої у вигляді МС або моношару.

2.2. Отримання суспензії клітин

Тварин декапітували під ефірним наркозом. Після вилучення СГ поміщали в охолоджене поживне середовище α -МЕМ («Біолот», Росія), що містить 100 мкг/мл гентаміцину («ПанЕко», Росія), 2,5 мкг/мл амфотерицину В («Biowest», Франція). СГ піддавали ферментативній дезагрегації в

середовищі α -MEM, що містить 1,25 мг/мл колагенази типу ІА («ПанЕко») з подальшою обробкою 0,25% розчином трипсину-ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко») за методом De Luca A. та співав. [27].

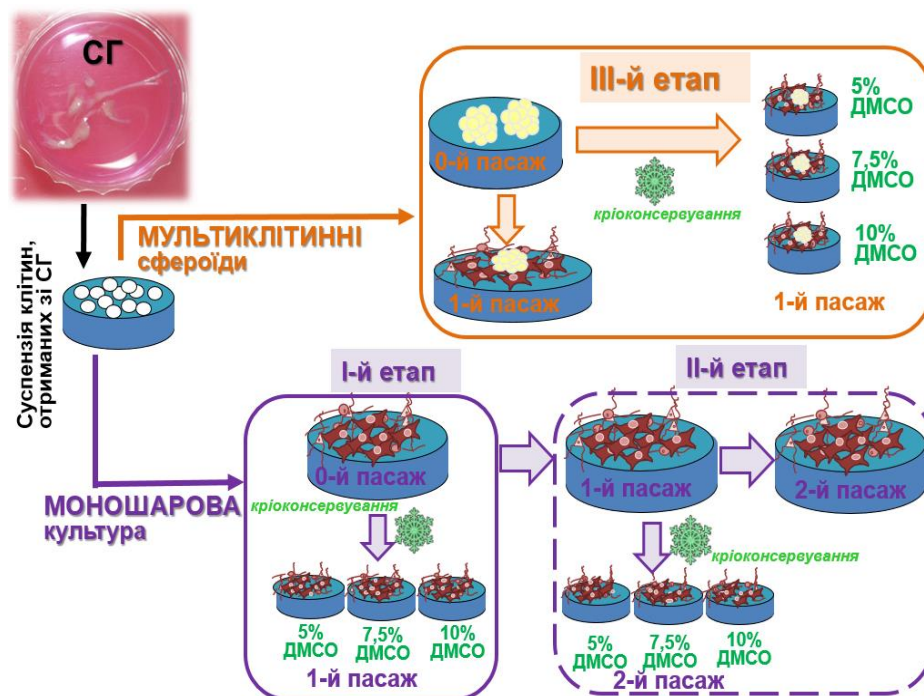


Рис. 2.1. Дизайн експерименту.

Ферментативну обробку в розчині колагенази проводили в 2 етапи (60 і 40 хв) в термостаті при температурі 37°C. Після першого етапу СГ обережно збирали і видаляли розчин, що містив клітинний дебрис, до решти СГ доливали свіжу порцію ферментативного розчину. По закінченні 2-х етапів, обробку СГ продовжували 0,25%-м розчином трипсину-ЕДТА протягом 30 хв при температурі 37°C. Після цього ферментативний розчин видаляли, а до СГ додавали розчин, що містив поживне середовище α -MEM та ФТС (Biosera, Франція) у співвідношенні 1:1 для інактивації ферменту. Надосадову рідину видаляли. До СГ додавали 5 мл поживного середовища α -MEM, в якому дезінтегрували їх на поодинокі клітини шляхом піпетування. Отриману суспензію клітин фільтрували через нейлонове сито з діаметром пір 100 мкм для видалення клітинного дебриса.

2.3. Визначення збереженості та виходу клітин

Збереженість та вихід клітин в отриманій суспензії оцінювали за стандартною методикою за допомогою фарбування 0,4%-м розчином трипанового синього, який додавали до суспензії клітин у співвідношенні 1:1. Клітини у зразках підраховували з використанням камери Горяєва [224]. Збереженість визначали як відношення кількості незабарвлених клітин до їх загальної кількості, виражене у відсотках. Збереженість клітин після ферментативної дезагрегації СГ становила в середньому $(80 \pm 10)\%$.

Вихід клітин визначали як відношення загальної кількості клітин після кріоконсервування до загальної кількості клітин до кріоконсервування, виражене у відсотках.

2.4. Моношарове (2D) та об'ємне (3D) культивування

Моношарове (2D) культивування проводили з використанням поживного середовища α -MEM з додаванням антибіотиків (100 мкг/мл гентаміцину і 100 мкг/мл цефотаксиму), амфотерицину В (2,5 мкг/мл), 10% ФТС при 37°C в атмосфері 5% CO₂ – 95% повітря. Клітини, отримані зі СГ, висівали у концентрації $2,5\text{--}5 \times 10^5$ клітин/мл та культивували в пластикових чашках Петрі з адгезивною поверхнею або поверхнею, обробленою полі-D-лізином, з площею ростової поверхні 8,5 см² (Orange Scientific, Бельгія), при цьому в чашку Петрі вносили по 2,5 мл суспензії. Після першої доби культивування проводили заміну культурального середовища. Надалі середовище міняли кожні 3–4 доби.

При об'ємному (3D) культивуванні використовували культуральне середовище, що не містило сироватку, приготоване на основі поживного середовища α -MEM з додаванням 2% B27 (Thermo Fisher Scientific, USA) або «Нейромакс» (НПП «ПанЕко»), гентаміцину (100 мкг/мл) і амфотерицину В (2,5 мкг/мл). Посівна концентрація клітин, лабораторний пластик та склад атмосфери культивування були такими ж, як зазначено вище. Заміну половини обсягу культурального середовища здійснювали кожні 3–4 доби.

2.5. Пересів клітин та МС

Пересів клітин моношарової культури проводили після її відкріплення від ростової поверхні. Для відкріплення від поверхні клітини інкубували при 37°C у ферментативному розчині (0,05% розчину трипсину у розчині Версену) протягом 5–10 хв. Процес відкріплення клітин контролювали за допомогою мікроскопу. Потім клітини обережно дезагрегували шляхом піпетування, переносили у центрифужну пробірку, після чого суспензію клітин центрифугували 5 хв при 1000 об/хв на центрифугі MPW-260R (MPW Med. Instruments, Польща). Клітини ресуспендували в 1 мл середовища культивування, підраховували кількість клітин та висівали у 24-х лунковий планшет у концентрації $3\text{--}4 \times 10^4$ клітин/мл.

Отримані мультиклітинні сфероїди (МС) переносили на різну добу в 24-лункові планшети з адгезивною поверхнею з площею ростової поверхні 1,864 см² (SPL Life Sciences, Корея); в деяких експериментах – в 96-лункові планшети того ж виробника. Для пересіву МС, утворених в одній чашці Петрі (приблизно 15–20 МС) в процесі культивування, ретельно збирали піпеткою (контролювали процес за допомогою світлового інвертованого мікроскопу), переносили у центрифужну пробірку («SPL LifeSciences», Корея), після чого здійснювали концентрування МС шляхом пасивної седиментації або центрифугування протягом 5 хв при 1000 об/хв на центрифугі MPW-260R (MPW Med. Instruments, Польща), надосадову рідину видаляли. МС ресуспендували у 2 мл середовища культивування, після чого висівали по 1 мл у лунки 24-х лункового планшету, при цьому кінцева концентрація МС, яку теж контролювали за допомогою світлового інвертованого мікроскопу, становила 8–10 МС/лунку.

2.6. Забарвлення гематоксиліном і еозином

Клітинний моношар фіксували у 4% розчині параформальдегіду (Sigma, США) протягом 15 хв, потім відмивали фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS, pH 7,4, Biowest, Франція) і послідовно

витримували по 1 хвилині у розчинах спирту етилового у концентраціях 96%, 80% та 70%. Після видалення спирту зразки поміщали на 10 хв в розчин гематоксиліну. Потім гематоксилін видаляли, клітини промивали проточною водою і поміщали на 2–5 хв в еозин. Після видалення еозину зразки послідовно витримували по 1 хвилині у розчинах спирту етилового зростаючих концентрацій (70%, 80%, 96%), після чого піддавали мікроскопічним дослідженням.

2.7. Імуноцитохімічні дослідження

Для визначення експресії досліджуваного маркера використовували фарбування первинними антитілами, потім вторинними антитілами, кон'югованими з флуорохромом. Зразки клітинних культур фіксували в 4% розчині параформальдегіду на PBS протягом 15 хв. Відмивали PBS тричі по 5 хв. Пермеабілізацію проводили в 0,3% розчині Triton X-100 (Sigma) на PBS протягом 10 хв. Блокували неспецифічне зв'язування антитіл розчином PBS, що містило 0,1% Triton X-100, 1% бичачий сироватковий альбумін (БСА, «Біолот», Росія), 0,3 М гліцин (Reanal, Угорщина) протягом 1 години при кімнатній температурі. Інкубацію з первинними антитілами проводили при 4°C протягом ночі, потім тричі відмивали PBS. Інкубацію із вторинними антитілами проводили при кімнатній температурі протягом 30 хв в темряві, потім тричі відмивали PBS. Антитіла готували на розчині PBS, що містить 0,1% Triton X-100, 1% БСА. Ядра клітин фарбували Hoechst 33342 (5 мг/мл).

В якості негативного контролю використовувалися зразки культури клітин СГ, які пройшли всі етапи імуноцитохімічного фарбування, за винятком інкубації з первинними і вторинними антитілами (контроль аутофлуоресценції). Контролем неспецифічного зв'язування вторинних антитіл були зразки культури клітин СГ, які замість розчину первинних антитіл інкубували у фосфатно-сольовому буфері з 0,1% Triton X-100. Характеристики використаних в роботі антитіл представлені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. Характеристики антитіл, використаних в роботі для імуноцитохімічних досліджень

№ п/п	Антитіла	Мішень	Розведення	Фірма, країна-виробник
1	Mouse Anti-Neuron specific beta-III-Tubulin	Нейрон, нейробласт	1:600	Abcam, Великобританія
2	Rabbit Anti-Glutamine Synthetase	Мантійний гліоцит	1:600	Abcam, Великобританія
3	Mouse Anti-S100	Шваннівська клітина, мантійний гліоцит	1:250	Abcam, Великобританія
4	Rabbit Anti-Chromogranin A	Адренергічний нейрон, адреномедулярна клітина	1:300	Abcam, Великобританія
5	Goat Secondary Antibody to Mouse, Hi Lyte Fluor 488-кон'юговані	IgG	1:500	Abcam, Великобританія
6	Goat Secondary Antibody to Rabbit, AlexaFluor 488-кон'юговані	IgG	1:750	Abcam, Великобританія

2.8. Світлова та флуоресцентна мікроскопія

Спостереження за клітинами в культурі СГ, а також мікрофотозйомку здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопу «Біомед-4І» (Росія) з відеоокуляром «Tour Cam» (Китай) та конфокального лазерного мікроскопу

Carl Zeiss AxioObserver Z (Carl Zeiss, Німеччина). Прижиттєве спостереження здійснювали при 10-кратному збільшенні окуляра і 4–40-кратному збільшенні об'єктива. Морфометричний аналіз проводили за мікрофотографіями з використанням програми «TourView 3.7» (Китай) та «AxioVisionRel. 4.8» (CarlZeiss, Німеччина).

2.9. Кріоконсервування культури клітин зі СГ неонатальних поросят у вигляді суспензії та МС

Зразки клітинної суспензії та МС заморожували за допомогою програмного заморожувача ЗПМ-1 (НПК «Отел», Україна) в кріопробірках об'ємом 1,8 мл («SPL LifeSciences», Корея) за наступною програмою: І етап – зі швидкістю 0,5 °C/хв до –20°C; ІІ етап – зі швидкістю 1 °C/хв до –80°C з наступним зануренням у рідкий азот (ІІІ етап).

У роботі були використані кріопротекторні розчини на основі поживного середовища α -MEM з додаванням 25% ФТС та ДМСО («AppliChem», Німеччина) у кінцевих концентраціях 5, 7,5 та 10%. Насичення кріопротектором проводили протягом 15 хв при 4°C.

Заморожені зразки зберігали не менш 2–3 тижнів у рідкому азоті перед використанням у подальших експериментах.

2.9.1. Кріоконсервування культури у вигляді суспензії клітин

Для кріоконсервування використовували моношарову клітинну культуру 5–7-х діб культивування. Після відкріплення від поверхні за допомогою 0,25% розчину трипсину-ЕДТА, клітини відмивали від ферментативного розчину, центрифугували протягом 5 хв при 1200 об/хв на центрифугі MPW-260R (MPW Med. Instruments, Польща), видаляли супернатант, осад ресуспендували в 0,5 мл поживного середовища α -MEM і по краплях додавали рівний об'єм відповідного кріозахисного середовища з подвійною концентрацією кріопротектору, попередньо охолодженого до 4–8°C. У кожен кріопробірку поміщали 1 мл клітинної суспензії з концентрацією $3\text{--}4 \times 10^5$ клітин/мл.

2.9.2. Кріоконсервування культури у вигляді МС

Для кріоконсервування використовували МС на восьму добу культивування. МС збирали як вказано вище. Осад, що містив МС, ресуспендували у 0,5 мл поживного середовища α -МЕМ і по краплях додавали рівний об'єм відповідного кріозахисного середовища з подвійною концентрацією кріопротектору, попередньо охолодженого до 4–8°C. МС у 1 мл кріозахисного середовища переносили в кріопробірку, при цьому концентрація МС у кріопробірці становила 15–20 МС/мл.

2.10. Деконсервування культури клітин зі СГ неонатальних поросят

Відігрівання зразків здійснювали на водяній бані при температурі 37°C до зникнення твердої фази. Для видалення кріопротектору до суспензії клітин або МС по краплях додавали 10-кратний об'єм поживного середовища, центрифугували протягом 5 хв. при 1200 об/хв, супернатант видаляли. Цю процедуру повторювали двічі.

2.11. Рекультивування клітин та МС після кріоконсервування

Рекультивування проводили у 24-лункових планшетах з адгезивною поверхнею («SPL Life Sciences») на поживному середовищі α -МЕМ, що містило 10% ФТС («BioSera»), антибіотики і антимікотики при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ – 95% повітря.

Осад клітинної суспензії, отриманий після деконсервування 1 ампули і видалення кріопротектору, ресуспендували в 1 мл середовища культивування, після чого проводили підрахунок збереженості та виходу клітин, висівали у 24- лунковий планшет у концентрації $3\text{--}4 \times 10^4$ клітин/мл.

Осад МС, отриманий після деконсервування 1 ампули і видалення кріопротектору, ресуспендували у 2 мл середовища культивування, після чого висівали по 1 мл у 24-лунковий планшет, при цьому кінцева концентрація МС

становила 8–10 МС/лунку (контролювали візуально за допомогою інвертованого світлового мікроскопу).

При цьому клітини та МС сіяли таким чином, щоб їхня кількість в контрольних (незаморожених) зразках відповідала кількості в зразках після кріоконсервування. Використовували клітини та МС однакових пасажів. Загальна схема експериментів з кріоконсервування та рекультивування представлена на рисунку 2.2.

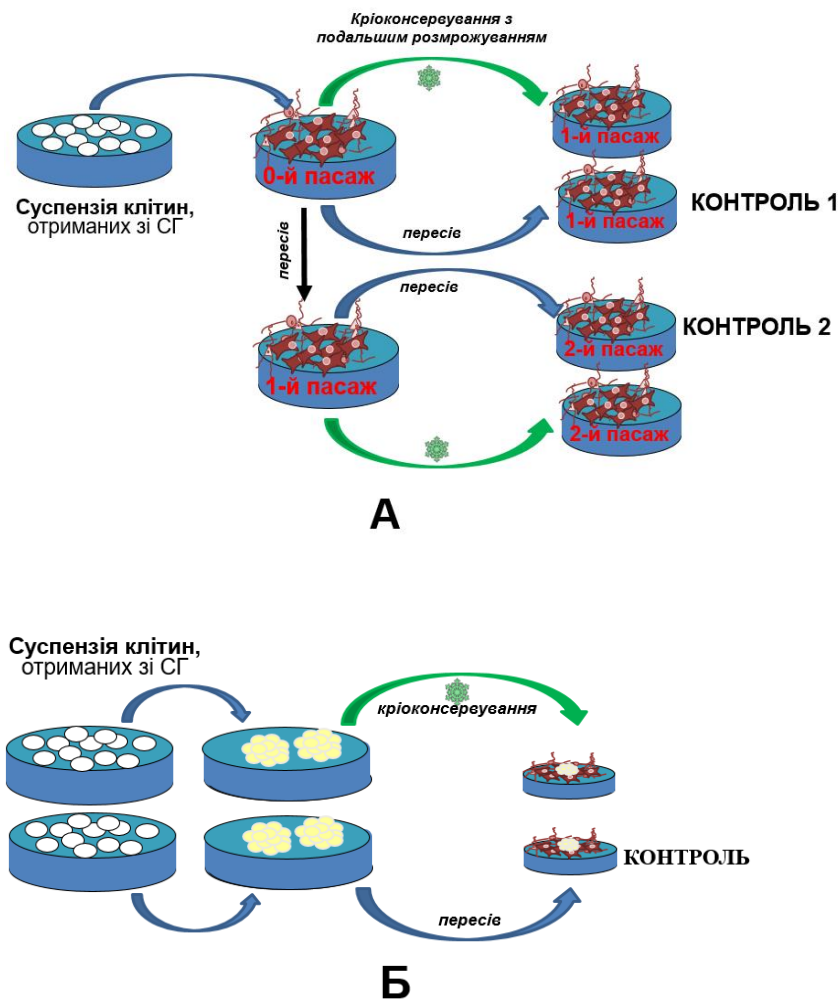


Рис. 2.2. Схема експериментів з кріоконсервування клітин зі СГ у вигляді суспензії (А) та МС (Б).

2.12. Визначення здатності МС до адгезії і здатності клітин МС до міграції

Здатність МС до адгезії та здатності клітин МС до міграції визначали за методом [225]

Здатність МС до адгезії визначали через добу після знаходження в умовах культивування. Відносну кількість прикріплених МС вираховували за формулою:

$$A = \text{ПМС} / \text{ЗМС} \times 100\%,$$

де ПМС – кількість прикріплених МС; ЗМС – загальна кількість МС.

Здатність до міграції клітин з МС визначали після знаходження МС протягом 2-х діб в умовах культивування. Відносну здатність клітин МС до міграції вираховували за формулою:

$$B = (\text{ВМС} / \text{ПМС}) \times 100\%,$$

де ВМС – кількість прикріплених МС, з яких мігрували клітини; ПМС – загальна кількість прикріплених МС.

2.13. Швидкість формування моношару

Швидкість формування моношару визначали за методом [225]. Після пересіву або при рекультивуванні відносну площу моношару, сформованого клітинами, які мігрували з МС, визначали на 5, 10, 15 та 25-ту добу, а клітини моношарової культури – на 2, 4, 6, 8 та 10-ту добу. Конфлюентність моношару оцінювали у відсотках. Для цього сканували дно 24-лункового культурального планшету з зафіксованими та забарвленими гематоксилін-еозином клітинами на сканері Kyosera (Японія). Площу забарвлених ділянок моношару в лунці та загальну площу лунки визначали за допомогою програми «AxioVisionRel. 4.8» («CarlZeiss»). Відносну площу моношару розраховували за формулою:

$$S \text{ моношару} = \sum S \text{ забарвлених ділянок} / S \text{ лунки} \times 100\%.$$

2.14. Визначення морфологічного складу культури клітин СГ неонатальних поросят

Морфометричний аналіз проводили за мікрофотографіями з використанням програми TourView 3.7 (Китай) і AxioVision Rel. 4.8 («CarlZeiss», Німеччина). Визначення морфологічного складу кріоконсервованих культур проводили після розморожування і рекультивування протягом 3-х діб. Підраховували 200 клітин моношару. Відносну кількість клітин певного морфологічного типу вираховували за формулою:

$$C = (A/B) \times 100\%,$$

де А – кількість клітин певного морфологічного типу; В – загальна кількість клітин.

2.15. Статистична обробка результатів

Отримані в роботі експериментальні дані обробляли за допомогою додатку «Statistica 10» («StatSoft», США). Нормальність розподілу визначали за допомогою W-критерію Шапіро-Вілка, значущість відмінностей між групами даних визначали з використанням параметричного t-критерію Стьюдента. Відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

2.16. Реактиви

У роботі були використані наступні реактиви: поживне середовище α -MEM («Біолот», Росія); гентаміцин («ПанЕко», Росія), цефотаксим («Біохімік», Росія), амфотерицин В («Biowest», Франція); колагеназа типу ІА («ПанЕко»); розчин трипсину-ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко»); ФТС (Biosera, Франція); В-27 (Thermo Fisher Scientific, USA); «НейроМакс» (НПП «ПанЕко»); параформальдегід (Sigma, США); PBS, pH 7,4, (Biowest, Франція); Triton X-100 (Sigma, США); бичачий сироватковий альбумін («Біолот», Росія); гліцин (Reanal, Угорщина); Hoechst 33342 (Abcam, Великобританія; Cell Signaling Technology, США); антитіла для

імуноцитохімічних досліджень (Abcam, Великобританія; Cell Signaling Technology, США); гематоксилін, еозин, ДМСО («AppliChem», Німеччина).

РОЗДІЛ 3. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ І ІМУНОФЕНОТИПОВІ ВЛАСТИВОСТІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ У ВИГЛЯДІ МОНОШАРУ АБО МУЛЬТИКЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ

3.1. Морфофункціональні та імунофенотипові властивості моношарової культури із клітин СГ неонатальних поросят

Відомо, що обрані умови культивування (поживне середовище, ростові добавки, поверхня культивування, кількість пасажів) є селективним фактором, здатним значно змінювати цитоморфологічний і фенотиповий склад культури у порівнянні з вихідним. При цьому можлива експансія тих клітинних субпопуляцій, яким створені відповідні умови, і згасання інших. Наприклад, культивування чутливих нейронів проводять у середовищах, що містять глюкозу і ростові фактори, які секретуються нейроглією [226, 227]. Для росту Шваннівських клітин використовують оброблені ламініном поверхні та культуральне середовище з додаванням форсколіну, інсуліну і ростових факторів FGF, NGF, IGF [228, 229]. Ендотеліальні клітини у культурі добре розвиваються на желатиновій підкладці у культуральному середовищі з FGF, EGF у присутності інсуліну, гепарину і трансферину [230]. Використання культурального середовища з достатнім вмістом фетальної телячої сироватки (10-30%) дозволяє отримати зі СГ первинну культуру клітин, збагачену МГ [32, 96, 129, 231], тоді як для збагачення культури нейронами необхідне використання спеціальних ростових домішок і середовищ (Neurobasal medium, N2, фактор росту нервів, фактор росту фібробластів, епідермальний фактор росту). Також потрібно відзначити, що середовища з високим вмістом ФТС сприяють проліферації фібробластів. Крім того, є дані, які свідчать про те, що культивування у присутності ФТС сприяє зростанню МГ в культурах клітин, отриманих з чутливих гангліїв [96, 128, 129, 232].

Оскільки у фокусі наших досліджень знаходилися МГ, ми використовували культуральне середовище, що містило сироватку (10% ФТС),

і не створювали спеціальних умов для підтримки нейронів. Це призводило до елімінації нейронів з культури при пересіві.

При посіві клітини, отримані зі СГ неонатальних поросят методом ферментативної дезагрегації, прикріплялися до поверхні у першу добу. Формування моношару активно відбувалося в наступну добу культивування. Морфологічний аналіз виявив присутність чотирьох морфологічних типів клітин у культурі. Світлі великі клітини згідно із спостереженнями попередніх авторів [115, 232] були ідентифіковані нами як тіла чутливих нейронів (ЧН). Решта клітин, які, очевидно, належали до представників периферичної глії, були розділені нами на три морфологічні типи:

- полігональні клітини з вираженими сплюсненими відростками (тип 1);
- веретеноподібні клітини з двома тонкими відростками (тип 2);
- великі розпластані фібробластоїдні клітини (тип 3).

Це збігається з даними попередніх авторів [22, 32, 127, 129], які теж спостерігали всі ці типи клітини та відносили їх до мантийних гліоцитів. Однак немає робіт, в яких би обговорювалася така морфологічна пластичність МГ та пропонувався механізм зміни однієї форми клітин в іншу. З іншого боку відомо, що морфологічні особливості клітин мають неабиякий вплив на їхню збереженість після кріоконсервування. Виходячи з цього, нами було вирішено відстежувати при культивуванні та кріоконсервуванні усі типи МГ окремо.

Співвідношення клітин різних типів у складі моношару змінювалося протягом культивування. На першу добу спостерігалися тіла ЧН, оточені групами дрібних округлих клітин з двома довгими відростками, що представляють собою у відповідності до анатомічної будови СГ, мантийні гліоцити (рис. 3.1).

На третю добу морфологічні особливості отриманої культури клітин змінювалися. Навколо кластерів, що складаються з тіл ЧН, спостерігалася розселення і проліферація клітин типів 1 та 2 (рис. 3.2).

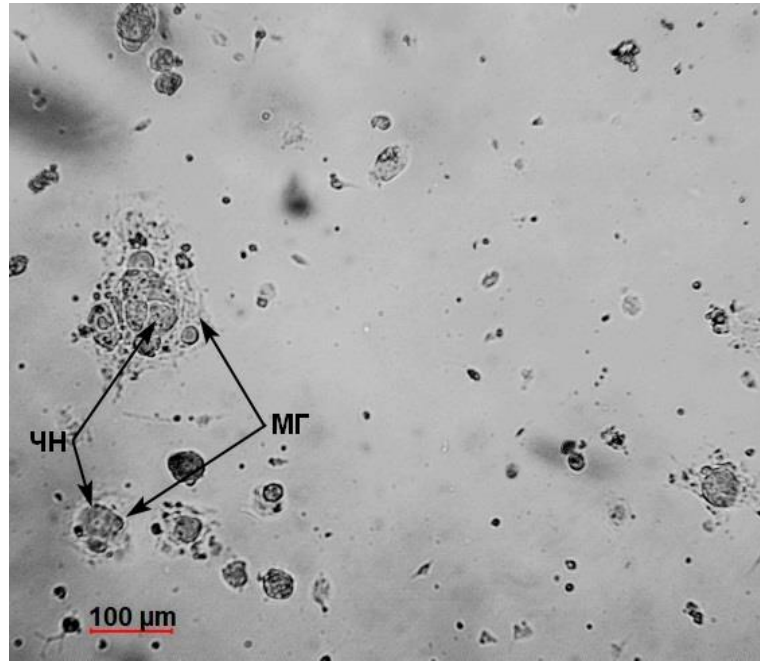


Рис. 3.1. Первинна культура клітин зі СГ неонатальних поросят, отримана у процесі культивування в середовищі, що містило 10% ФТС. Перша доба культивування. ЧН – тіла чутливих нейронів, поодинокі або зібрані у кластери, МГ – мантійні гліюцити (клітини типу 2), що оточують чутливі нейрони. Прижиттєва світлова мікроскопія.

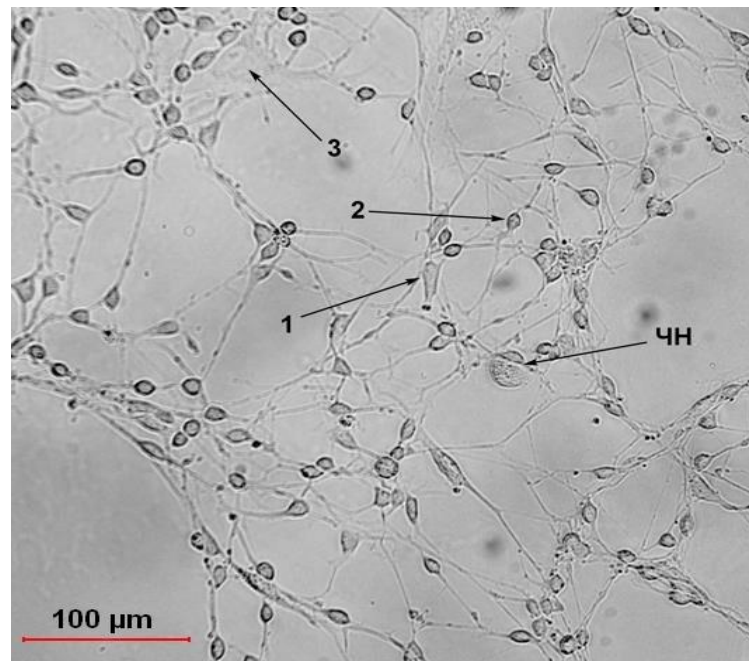


Рис. 3.2. Первинна культура клітин СГ неонатальних поросят, отримана у процесі культивування у середовищі, що містило 10% ФТС. Третя доба культивування. ЧН – тіла чутливих нейронів, 1 – клітини типу 1, 2 – клітини типу 2, 3 – клітини типу 3. Прижиттєва світлова мікроскопія.

До 5-6 доби утворювався моношар, який складався переважно з клітин типу 2. Крім того, в культурі спостерігалися острівці клітин типу 3. У деяких місцях (очевидно, кластерах з тілами ЧН) спостерігалось утворення прикріплених сфероїдів, що формували довгі радіальні тяжі (рис. 3.3).

На 15 добу культивування помітно, що великі поодинокі нейрони і клітинні кластери розташовуються на підкладці, яка утворена клітинами типу 2, що розрослися у кілька шарів (рис. 3.4).

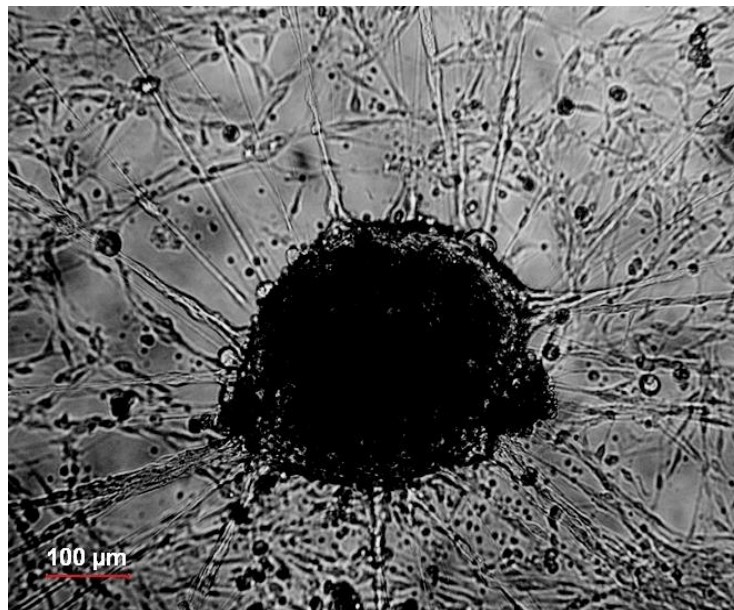


Рис 3.3. Прикріплені сфероподібні структури, що формують радіальні тяжі, у первинній культурі клітин СГ неонатальних поросят, отриманої у процесі культивування у середовищі, що містило 10% ФТС. Восьма доба культивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

Наші результати збігаються з даними інших авторів, які спостерігали подібну морфологічну картину при культивуванні в середовищі з додаванням

сироватки клітин СГ собак [32], курячих [26] і мишачих [127] ембріонів, гангліїв трійчастого нерва дорослих щурів [8] і мишей [129].

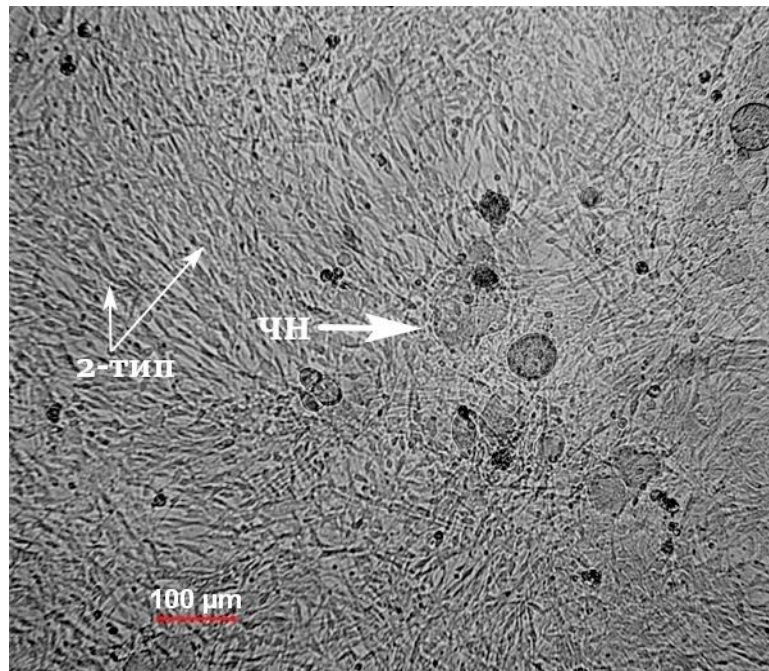


Рис. 3.4. Первинна культура клітин СГ неонатальних поросят, отримана у процесі культивування у середовищі, що містить 10% ФТС. 15-а доба культивування. ЧН – тіла чутливих нейронів, 2-тип – клітини типу 2. Прижиттєва світлова мікроскопія

При кількісній оцінці встановлено, що клітини типів 1 та 2 переважали у первинній культурі, оскільки становили $(49,5 \pm 2,4)\%$ та $(41,7 \pm 1,5)\%$, відповідно (рис. 3.5). Кількість ЧН і клітин типу 3 була незначною: $(3,5 \pm 0,6)\%$ і $(5,3 \pm 1,9)\%$, відповідно.

Оцінка конфлуентності моношару, утвореного клітинами зі СГ неонатальних поросят, на різну добу культивування приведена на рисунку 3.6. Помітно, що процес формування моношару (фаза експоненційного зростання) активно тривав протягом шести діб, після чого спостерігалось досягнення фази стаціонарного зростання (плато на кривій).

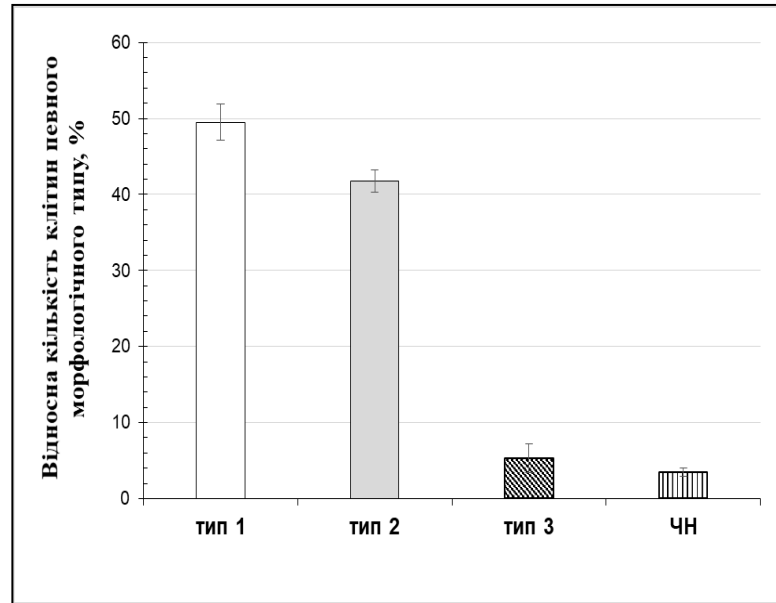


Рис. 3.5. Співвідношення клітин різних морфологічних типів у первинній культурі клітин зі СГ неонатальних поросят. Третя доба культивування.

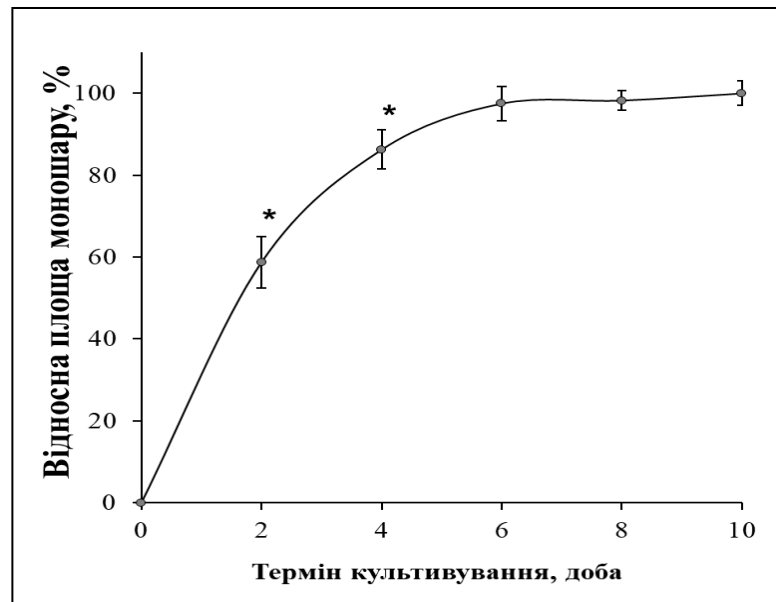


Рис. 3.6. Зміна відносної площі моношару у процесі культивування первинної ККСГ неонатальних поросят. Примітка: * – відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) відрізняються у порівнянні із шостою добою зростання.

Якщо при отриманні первинної культури не використовуються спеціальні прийоми, що дозволяють збагатити вихідну суспензію клітинами певного імунофенотипу (центрифугування у градієнті щільності, імуномагнітна селекція і т.д.), то вона містить кілька клітинних субпопуляцій. Виходячи з того, що анатомічно до складу СГ входять чутливі нейрони, мантийні гліоцити (МГ), Шваннівські клітини, клітини ендотелію капілярів і фібробласти, в отриманій нами культурі могли перебувати всі вищеназвані типи.

Для визначення приналежності клітин культури зі СГ до субпопуляцій нейронів або гліальних клітин ми провели імунофенотипування за допомогою забарвлення антитілами до β -III-тубуліну – маркера нейрональних клітин [233], ГС – маркера мантийних гліоцитів [78], S100 – маркера Шваннівських клітин [234], хромограніну А (ХрА) – маркера хромафінних клітин і адренергічних нейронів [235].

Імуноцитохімічне мічення з антитілами показало імунофенотипову гетерогенність культури.

Клітини, що експресують β -III-тубулін, розрізнялися морфологічно. Одні з них представляли собою дрібні клітини з довгими розгалуженими відростками, що формують мережу, тому були ідентифіковані як нейрони (рис. 3.7). Інші були великими, розпластаними фібробластоїдними клітинами з невеликими відростками (рис. 3.8). Оскільки морфологічно дані клітини не належать до нейронів, вони можуть належати до інших клітин-похідних нервового гребеня, які, як було нещодавно показано, теж можуть експресувати β -III-тубулін [236–238]. Для ідентифікації цієї субпопуляції потрібні подальші дослідження із залученням додаткових імунофенотипових маркерів.

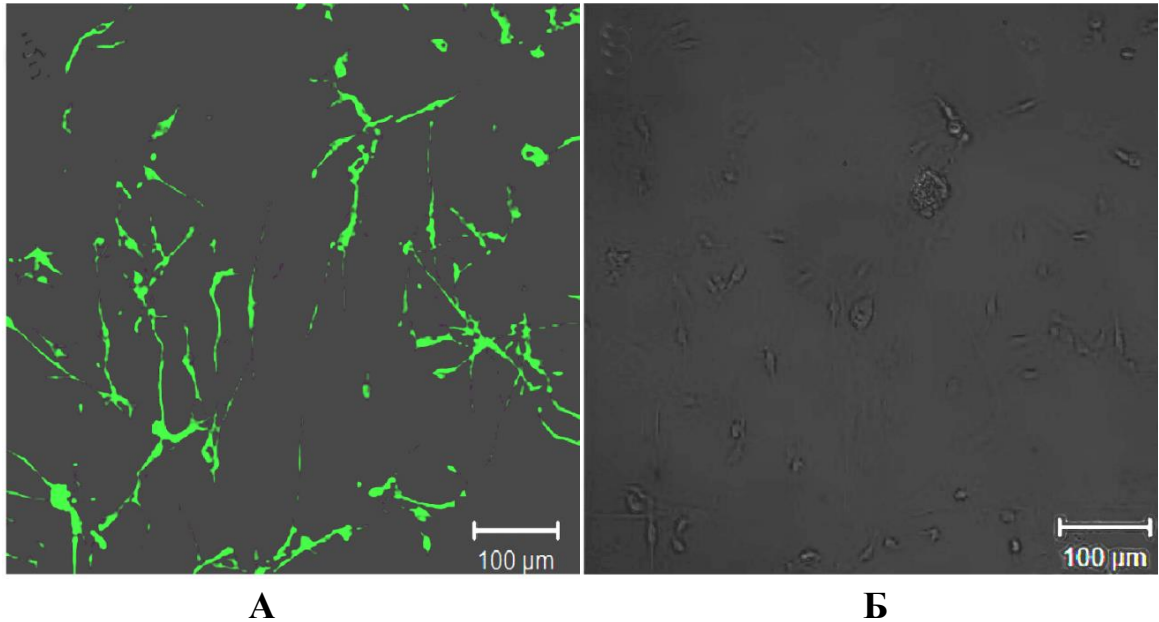


Рис. 3.7. Експресія β -ІІІ-тубуліну (зелена флуоресценція) клітинами з довгими розгалуженим відростками (тип 1) в культурі, отриманій зі СГ неонатальних поросят. Сьома доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна (А) і світлова (Б) мікроскопія.

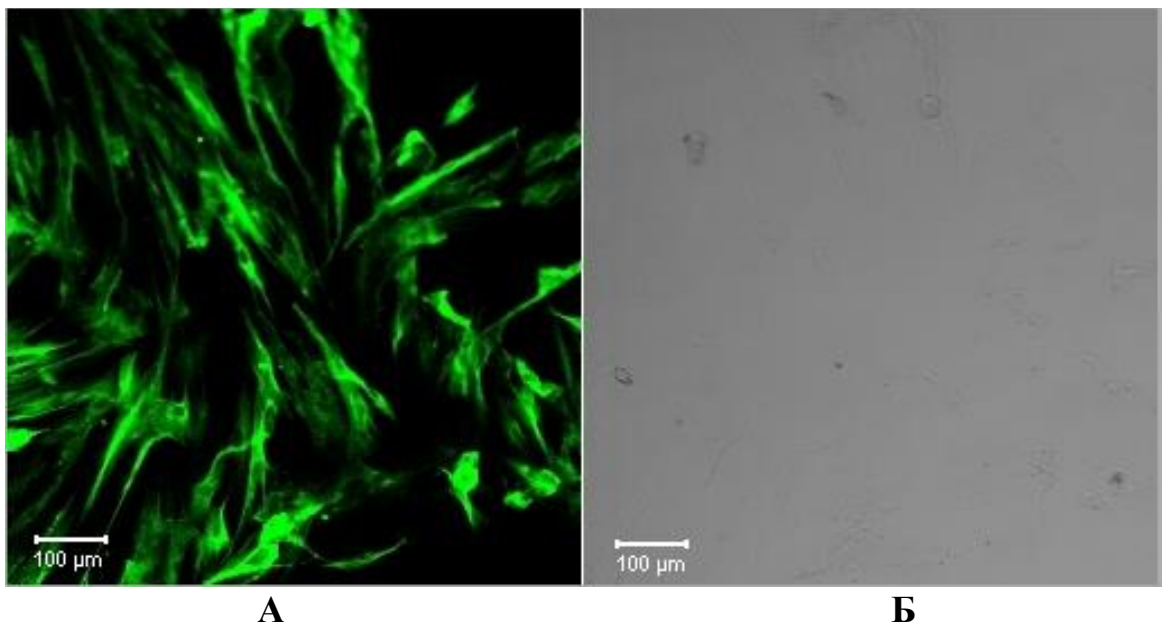


Рис. 3.8. Експресія β -ІІІ-тубуліну (зелена флуоресценція) клітинами типу 3 в культурі, отриманій зі СГ неонатальних поросят. Сьома доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна (А) та світлова (Б) мікроскопія.

Характерною особливістю МГ є великий вміст глютамінсинтетази (ГС) – ферменту, що каталізує перетворення глютамату в глютамін [115]. Шваннівські клітини, які забезпечують мієлінізацію аксонів ЧН і також присутні в СГ, не експресують ГС [9]. Завдяки цьому використання антитіл до ГС дає можливість виявити субпопуляцію МГ в культурі клітин СГ.

Клітини типу 2 (дрібні веретеновидні) і типу 3 (великі фібробластоїдні) клітини експресували ГС, що характеризувало їх як МГ (рис. 3.9.). Відносна кількість ГС-позитивних клітин в культурі клітин, отриманій нами зі СГ неонатальних поросят, становила $(80,0 \pm 1,2)\%$. Решта клітин моношару представляла собою розпластані полігональні (клітини типу 1), що не експресували ГС.

Клітин, які б експресували S100, в культурі не спостерігалось. Це свідчило про те, що в обраних нами культуральних умовах Шваннівські клітини не підтримуються.

Цікаво, що в культурі спостерігалася деяка кількість ХрА-позитивних клітин. Морфологічно вони представляли собою клітини різних розмірів і форм, серед яких переважали клітини з відростками (рис. 3.10).

Відомо, що ХрА експресується в сомі більшості гальмівних, збуджуючих та адренергійних нейронів головного і спинного мозку [239]. В роботі Хуе Z. та спів. у культурі клітин, отриманій зі СГ, спостерігалися нейрони адренергічного фенотипу [240]. Це пояснюється присутністю в гангліях клітин-похідних нервового гребеня, здатних диференціюватися у симпато–адреналовому напрямку [241]. Можливо, цей факт пояснює появу клітин, що експресують ХрА, у первинній ККСГ.

Найбільш простим і широко використовуваним методом отримання культури, збагаченої стовбуровими/прогеніторними клітинами, є субкультивування, при якому високо диференційовані клітини елімінуються при пасируванні [242, 243]. Крім того, субкультивування є важливим етапом для нарощування кількості клітин, необхідних для використання в рамках поставлених завдань.

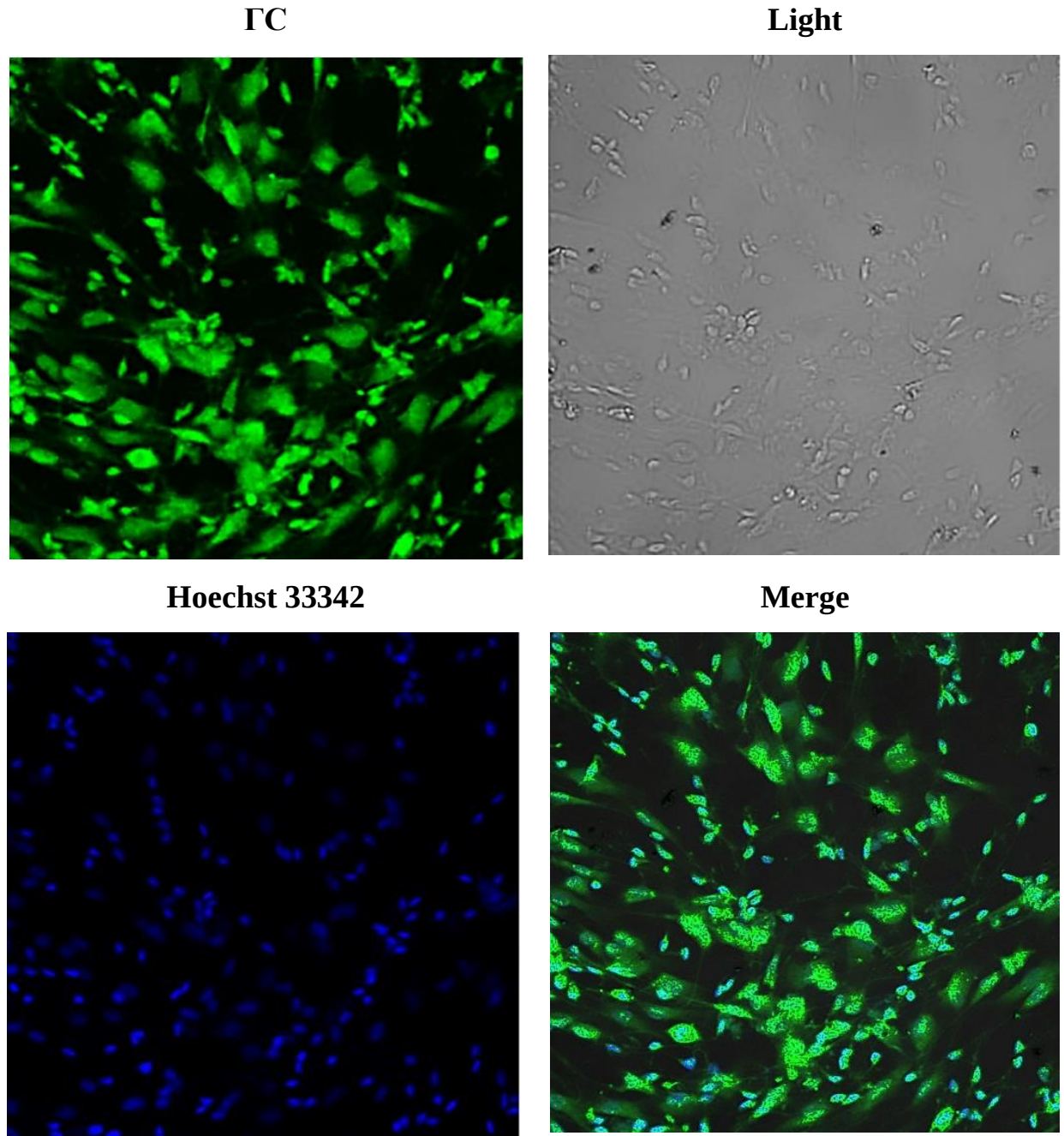


Рис. 3.9. Експресія ГС (зелена флуоресценція) великими фібробластоїдними клітинами (тип 3) і дрібними клітинами з довгими відростками (типу 2) у культурі, отриманій зі СГ неонатальних поросят. Сьома доба субкультивування. Ядра клітин пофарбовані Hoechst 33342 (синя флуоресценція). Об'єднане зображення (merge) демонструє ко-локалізацію фарбування. Фіксований препарат, світлова (Light) та флуоресцентна мікроскопія.

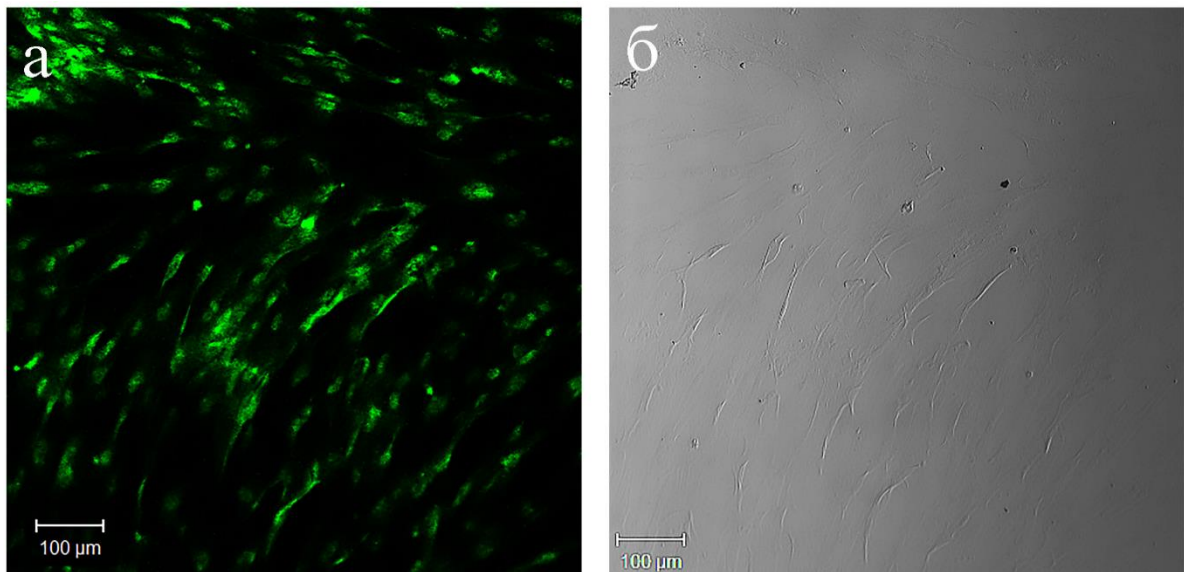


Рис. 3.10. Експресія ХрА (зелена флуоресценція) у культурі, отриманій зі СГ неонатальних поросят. Сьома доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна (А) і світлова (Б) мікроскопія.

У наших експериментах пересів первинної культури призводив до елімінації тіл ЧН, зменшення кількості клітин типу 2 і експансії клітин типу 3 протягом двох пасажів (Рис. 3.11, 3.12 і 3.13). Кількісний аналіз показав, що на першому пасажі спостерігалось $(50,8 \pm 1,9)\%$ клітин типу 3, $(37,0 \pm 2,2)\%$ клітин типу 2 і $(12,3 \pm 1,5)\%$ клітин типу 1, а на другому пасажі – $(66,0 \pm 1,8)\%$ клітин типу 3, $(29,0 \pm 1,8)\%$ клітин типу 2 і $(5,0 \pm 0,8)\%$ клітин типу 1 (Рис. 3.14).

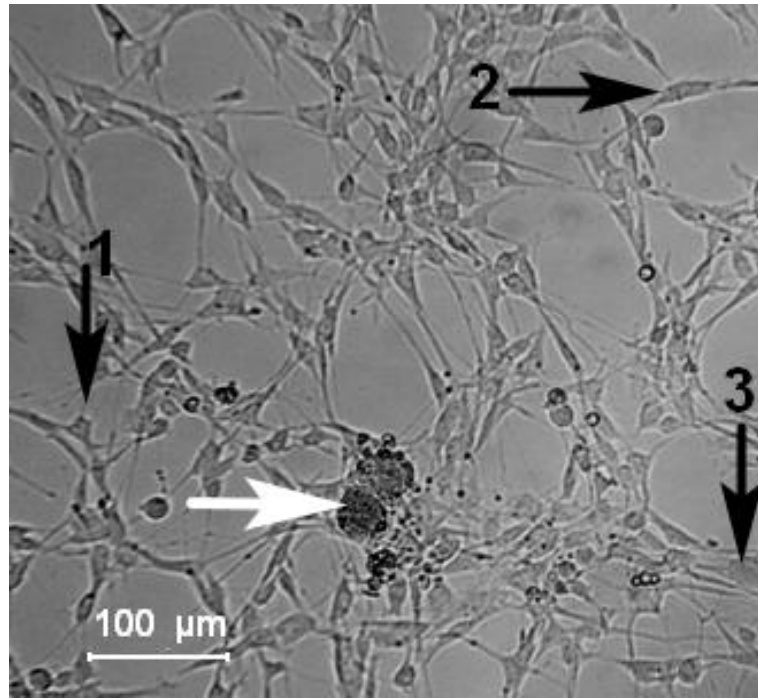


Рис. 3.11. Культура клітин СГ неонатальних поросят у процесі культивування у середовищі з 10% ФТС на нульовому пасажі. Біла стрілка – кластер тіл ЧН, 1 – клітини типу 1, 2 – клітини типу 2, 3 – клітини типу 3. Третя доба після посіву. Прижиттєва фотозйомка, світлова мікроскопія.

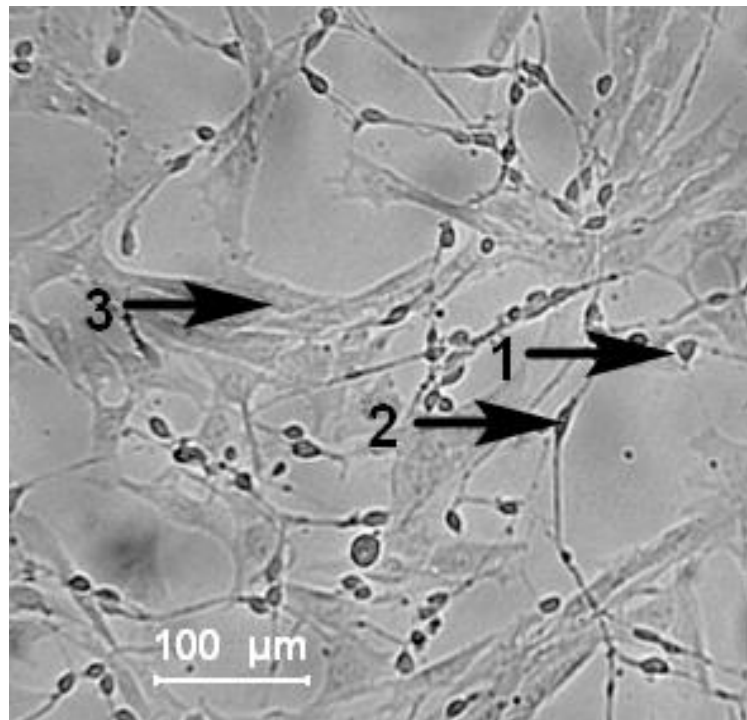


Рис. 3.12. Культура клітин СГ неонатальних поросят у процесі культивування у середовищі з 10% ФТС на першому пасажі. 1 – клітини типу

1, 2 – клітини типу 2, 3 – клітини типу 3. Третя доба після посіву. Прижиттєва фотозйомка, світлова мікроскопія.

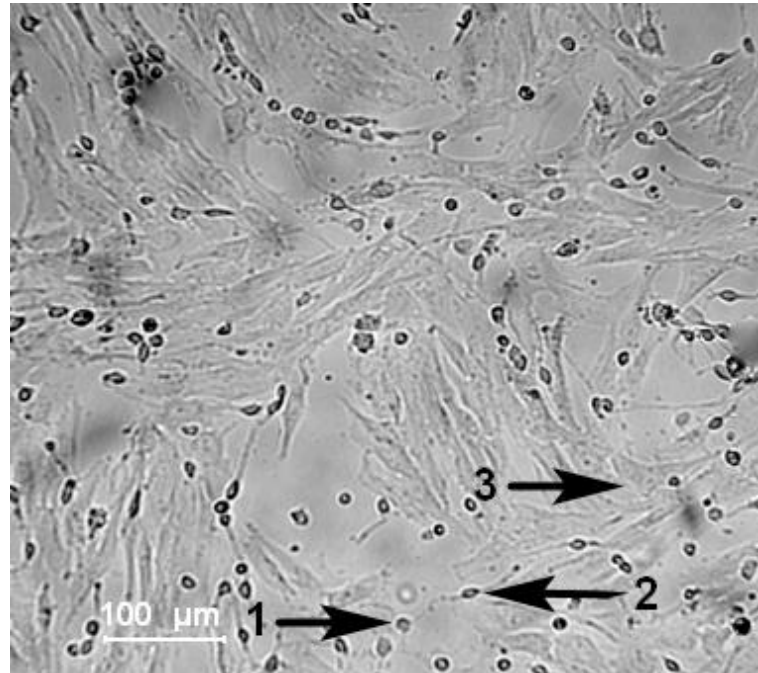


Рис. 3.13. Культура клітин СГ неонатальних поросят у процесі культивування у середовищі з 10% ФТС на другому пасажі. 1 – клітини типу 1, 2 – клітини типу 2, 3 – клітини типу 3. Третя доба після посіву. Прижиттєва фотозйомка, світлова мікроскопія.

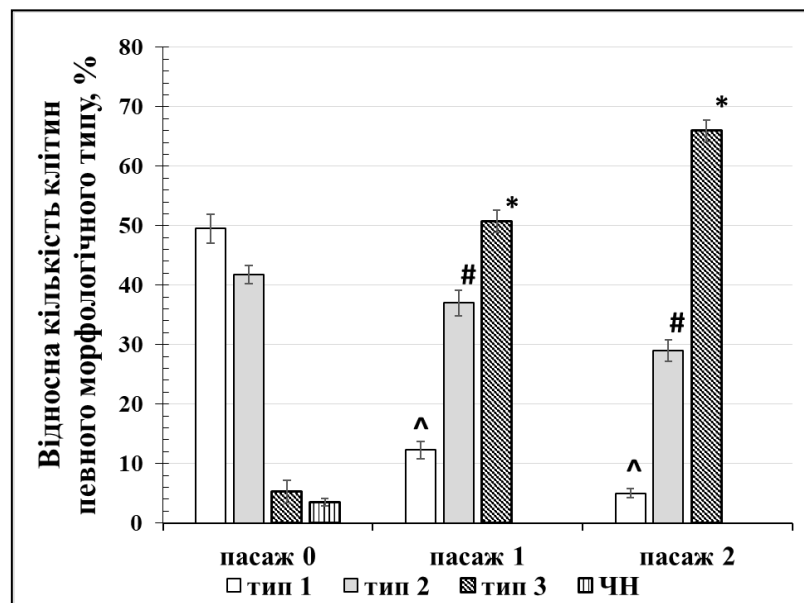


Рис. 3.14. Співвідношення клітин різних морфологічних типів у культурі клітин СГ різних пасажів. Примітка: [^] – відмінності статистично значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються в порівнянні до нульового пасажу для клітин

типу 1, # – відмінності статистично значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються в порівнянні до нульового пасажу для клітин типу 2, * – відмінності статистично значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються в порівнянні до нульового пасажу для клітин типу 3.

Таким чином, у процесі пересіву спостерігаються зміни морфологічного складу ККСГ. Перш за все, вони стосуються зникнення з культури тіл ЧН. По-друге, у культурі знижується кількість клітин типу 1, які були ідентифіковані нами як нейрони завдяки морфологічним характеристикам (наявність відростків) та імунофенотипу (експресія β -III-тубуліну). Це є цілком закономірним, оскільки для нейронів не було створено спеціальних умов культивування (підложка культивування, фактори росту). Навпроти, МГ знаходилися у сприятливих умовах, тому у культурі спостерігалася підвищення кількості веретеноподібних та фібробластоїдних клітин типів 1 та 3, які, як було встановлено імуноцитохімічно, експресували ГС. Залишається питання, чому з пасажами у культурі виникала експансія саме клітин типу 3 – фібробластоїдної форми. Можна припустити, що у субкультурі, в якій відсутні нейрони, не реалізуються фізіологічні регуляторні сигнали «нейрон-глія». Це призводить до втрати спеціалізованих властивостей МГ (якщо прийняти, що веретеноподібна морфологія є більш спеціалізованою формою МГ) та дедиференціювання МГ. На користь цього припущення може свідчити наявність у клітин типу 3 (фібробластоїдних) не тільки гліального (експресія ГС), але й нейронального імунофенотипу (експресія β -III-тубуліну).

3.2. Вплив складу культурального середовища на морфофункціональні і імунофенотипові властивості МС із клітин СГ неонатальних поросят

В даний час одним з перспективних підходів до культивування клітин, в тому числі виділених зі СГ, є культивування у вигляді сфероїдів, оскільки в даних умовах клітини виявляють властивості більш ранніх попередників в порівнянні з клітинами, культивованими у вигляді моношару [16]. Крім того, у ряді робіт було показано, що подібні тривимірні клітинні новоутворення здатні зберігати особливості тканини, з якої вони були отримані [140–142].

ФТС являє собою найбільш популярну добавку до середовища культивування, оскільки містить життєво важливі поживні речовини, білки-переносники і фактори росту, необхідні для підтримки клітин ссавців *in vitro*. Однак її використання супроводжується низкою ризиків: вона нестандартна за складом, є потенційним джерелом контамінації клітинних культур бактеріями, грибами, мікоплазмами і вірусами, крім того, може бути джерелом неідентифікованих, атипових білків і гормонів, які є основною причиною дестабілізації цитоморфологічних і каріологічних характеристик культивованих клітин, тому останнім часом з'явилася тенденція до використання заміників сироватки, наприклад, таких як В-27 і Нейромакс.

У деяких роботах [2, 3, 10, 74] для отримання сфероїдів використовувалося безсироваткове середовище, що містить замітники сироватки, такі як В27. Аналогом добавки В27 є Нейромакс. До складу обох входять вітаміни, антиоксиданти, гормони, ліпіди, альбумін, інсулін, трансферин. З огляду на вищесказане, в експериментах з отримання МС зі СГ неонатальних поросят було використано культуральне середовище без ФТС, але з домішками В27 або Нейромакс.

Суспензію клітин зі СГ, отриману методом ферментативної дезагрегації, висівали на культуральний адгезивний пластик. У першу добу в культурі, культивованій у присутності В27 або Нейромаксу, спостерігалися великі круглі клітини – тіла чутливих нейронів, котрі були позбавлені відростків (Рис. 3.15). Вочевидь, що під час ферментативної обробки при

отриманні клітинної суспензії нейрони пошкоджуються, втрачають відростки та зникають після пересіву (при субкультивуванні).

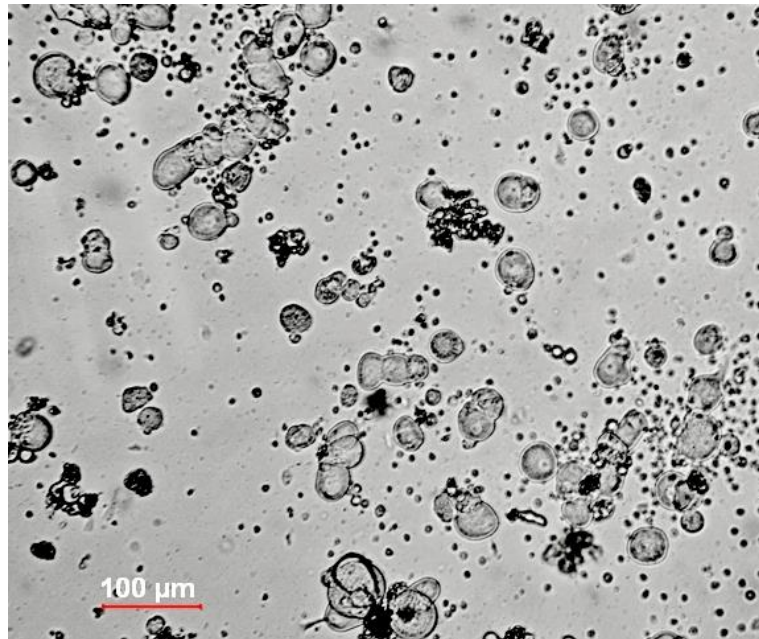


Рис. 3.15. Тіла чутливих нейронів у ККСГ неонатальних поросят, яка була отримана у безсироватковому середовищі із додаванням 2% Нейромаксу. Перша доба культивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

На третю добу культивування спостерігалися флотуючі агрегати, які склалися переважно з невеликої кількості клітин, а також поодинокі клітини та клітинний дебрис (рис. 3.16).

На 5–7-у добу культивування у середовищах з обома домішками флотуючі агрегати ущільнювалися, набували округлої форми, були темніші у центрі, з округлими великими та дрібними клітинами по краях (Рис. 3.17). Згідно з уявленнями про утворення сфероїдів при 3D-культивуванні, таку форму ми вважали мультиклітинними сфероїдами (МС).

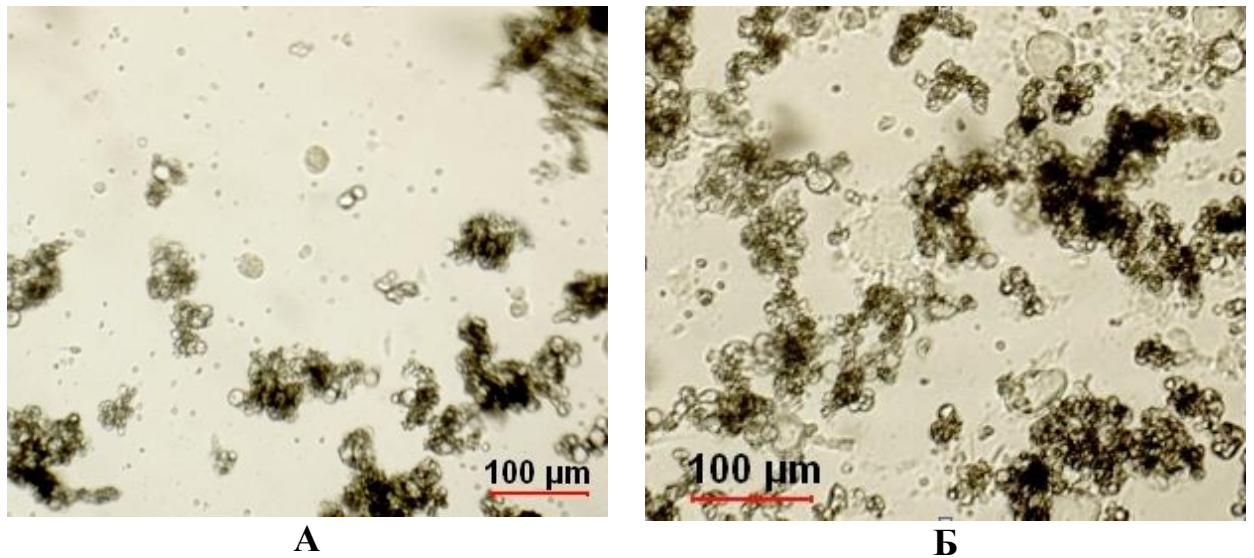


Рис. 3.16. Флотуючі агрегати, що складаються з невеликої кількості клітин, у ККСГ неонатальних поросят, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 (А) та Нейромаксу (Б). Третя доба культивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

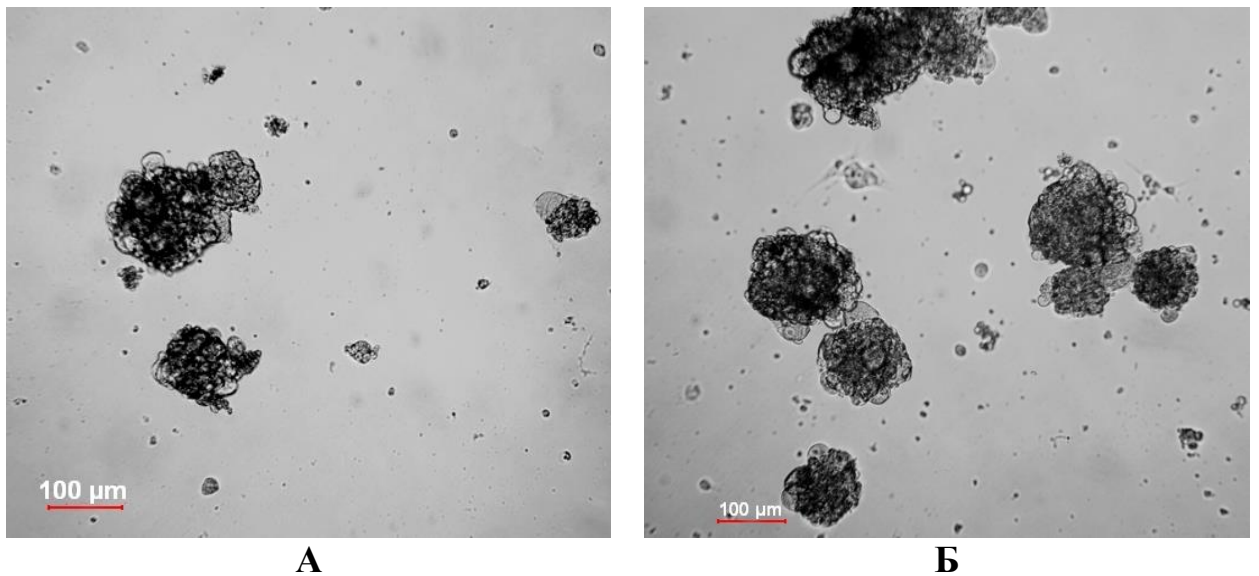


Рис. 3.17. МС у ККСГ неонатальних поросят, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 (А) та Нейромаксу (Б). П'ята доба культивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

До 15-ї доби культивування МС збільшувалися у розмірах, ущільнювалися, набували рівних обрисів (Рис. 3.18). Деякі МС мали тенденцію до злиття між собою.

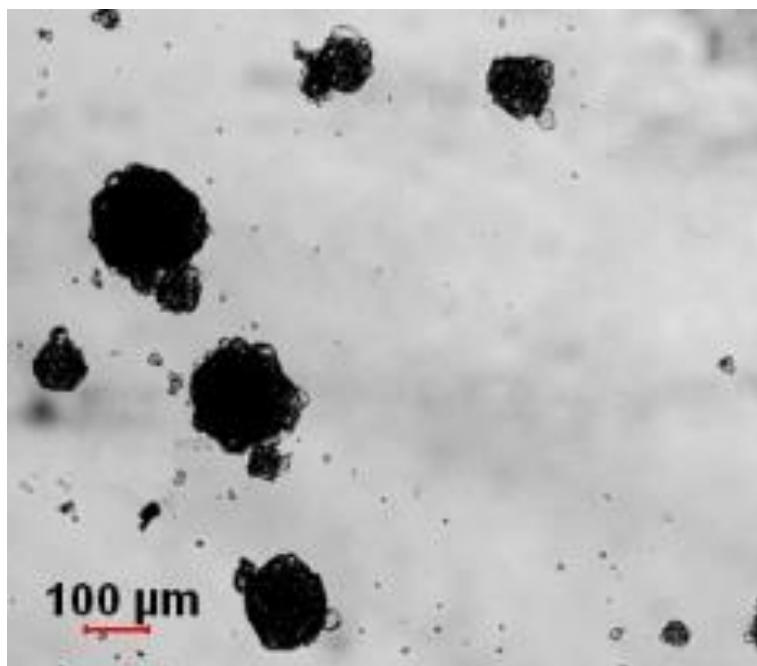


Рис. 3.18. МС у ККСГ неонатальних поросят, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% Нейромаксу. 15-а доба культивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

На 21–25-ту добу культивування кількість МС зменшувалася. Це відбувалося за рахунок того, що частина МС зливалася та формувала великі флотуючі щільні агрегати неправильної форми. У культурі також були присутні неприкріплені поодинокі клітини та клітинний дебрис, що вказувало на процеси загибелі клітин (Рис. 3.19). Дегенерація МС на цьому терміні, можливо, була наслідком недостатньої кількості ростових факторів, необхідних для росту і підтримки культури у 3D-форматі.

Таким чином, нами були встановлені терміни формування та деградації ККСГ при культивуванні у форматі МС. При цьому, вочевидь, кріоконсервування або пересів МС потрібно було здійснювати не раніше 5–7 доби та не пізніше 15 доби.

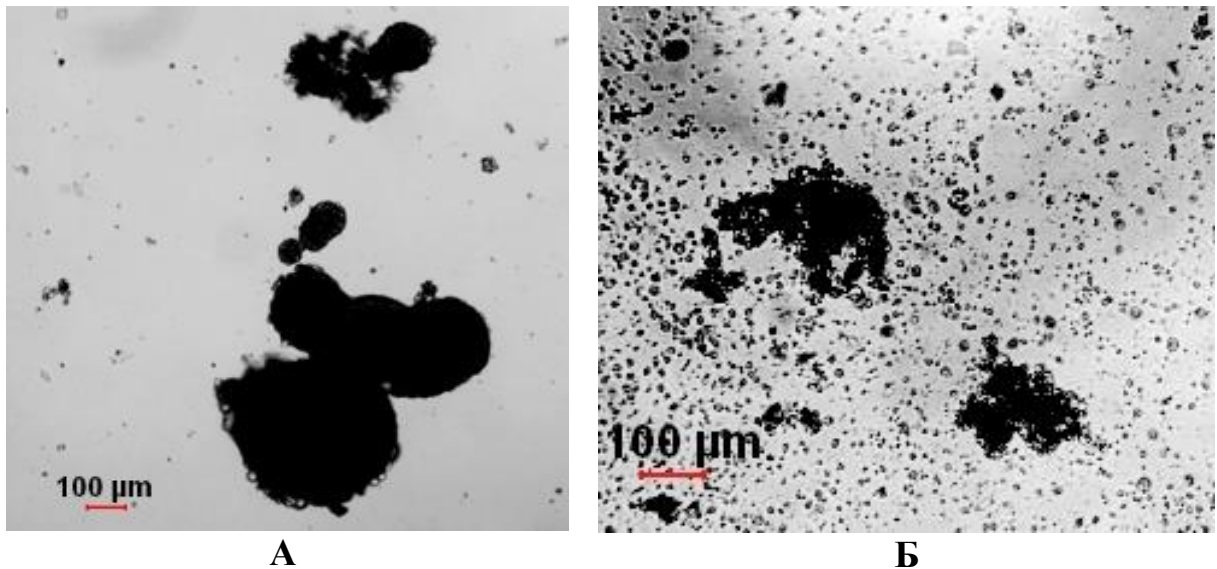


Рис. 3.19. Деградація ККСГ, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% Нейромаксу при тривалому культивуванні: МС, утворені в результаті злиття декількох МС (А), агрегати різної форми, поодинокі клітини та клітинний дебрис (Б). 25-а доба культивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

На рис. 3.20 та 3.21 представлені кількісні дані, що свідчать про зміну розміру та кількості МС, утворених у ККСГ, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 або Нейромаксу. Середній діаметр і кількість сформованих МС незначуще відрізнялися між собою в залежності від виду добавки. Середній діаметр МС у процесі культивування на середовищі із Нейромаксом становив (151 ± 55) мкм, а їхня кількість дорівнювала (14 ± 4) МС/ 10^6 посіяних клітин, в той час як в середовищі з В27 середній розмір МС становив (151 ± 20) мкм, а кількість – (7 ± 3) МС/ 10^6 посіяних клітин. При цьому протягом на протязі культивування спостерігалось повільне збільшення діаметру МС, а значуще збільшення діаметру відбувалося після 20-ти діб культивування, що відображає процес злиття МС (Рис. 3.20).

Помітно, що в процесі культивування кількість МС поступово знижується. У термінальні строки культивування (25-а доба) кількість МС значно менша в порівнянні з 5-ю добою. Зниження кількості МС відбувалося

як за рахунок злиття окремих МС між собою, так і через руйнування МС. Це вказує на те, що використане безсироваткове середовище із домішками В27 або Нейромаксом підходить для отримання МС, але не їхньої довгострокової підтримки.

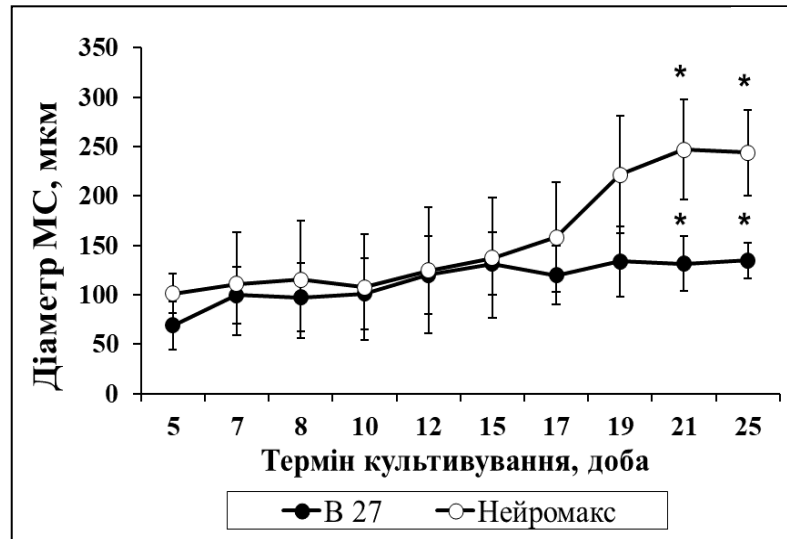


Рис. 3.20. Зміна діаметру МС у ККСГ неонатальних поросят, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 та Нейромаксу. Примітка: * – відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні із п'ятою добою культивування.

Таким чином, загальна динаміка сфероїдоутворення була схожою при культивуванні ККСГ як з В27, так і з Нейромаксом. При цьому спостерігалися усі фази формування сфероїдів, описані раніше [143, 148–150]. При поміщенні у середовище культивування клітини СГ за рахунок тенденції до самоорганізації формували тривимірні багатоклітинні агрегати. Перші контакти між клітинами формувалися у першу добу культивування, коли утворювалися пухкі агрегати. Як було встановлено, процес ініціації сфероїдоутворення є обумовленим взаємодією між клітинами за рахунок зв'язування довголанцюгових молекул ПКМ з інтегринами на поверхні клітинної мембрани [143].

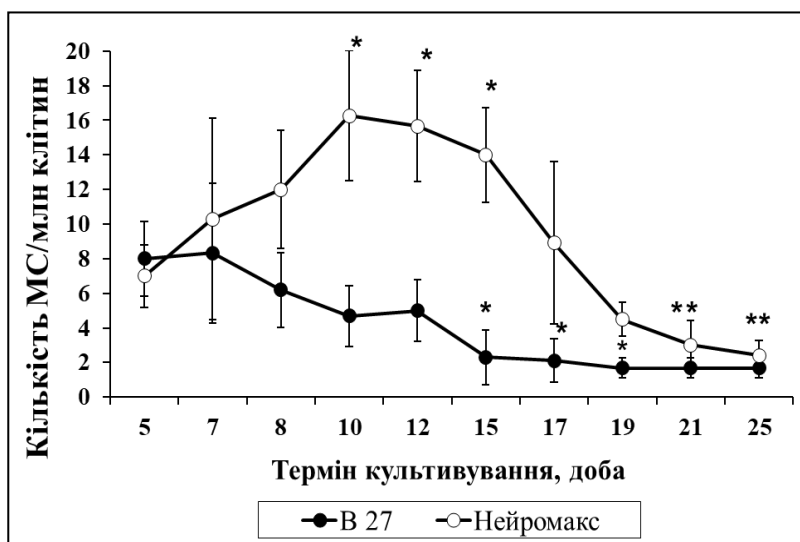


Рис. 3.21. Зміна кількості МС у ККСГ неонатальних поросят, яка була отримана у безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 та Нейромаксу. Примітка: * – відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні із п'ятою добою культивування.

Крім того, існує ймовірність, що в процесі ферментативної обробки клітин може відбуватися зміна їхнього поверхневого заряду, внаслідок чого виникає електростатична взаємодія між клітинами, що сприяє їхньому початковому зближенню. Прямий міжклітинний контакт через первісну агрегацію призводить до підвищеної експресії кадгерину, котрий накопичується на поверхні мембран. Внаслідок виникнення взаємодій «кадгерин-кадгерин» відбувається подальша компактизація та ущільнення клітин всередині агрегатів та утворення сфероїдів більш правильної геометричної форми [143]. Всі ці стадії було спостережено у ККСГ при культивуванні у безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 та Нейромаксу.

Відомо, що процес первинного контакту клітин у 3D умовах може бути стимульовано за рахунок обережного перемішування середовища, ротації або струшування культурального посуду [140, 166–168]. В нашій роботі ми не використовували спеціальних пристроїв для ротації, проте спостерігали утворення МС. Вірогідно, це відбувалося за рахунок

маніпуляцій, які проводили під час культивування (заміна культурального середовища, перенесення чашки Петрі або планшету до інкубатору або мікроскопу). У майбутньому є доцільним проведення окремих експериментів для визначення часу формування МС у ККСГ при стимуляції первинного контакту клітин. Цілком можливо, що присутність ущільнених МС буде спостерігатися раніше, ніж це було у нашій поточній роботі.

Відомо, що пересів МС у культуральне середовище, що містить ФТС, сприяє їхньому прикріпленню і міграції з них клітин [245]. Аналіз сформованого при цьому моношару дозволяє з'ясувати, які типи клітин у складі МС мають здатність до міграції та проліферації.

У наших експериментах при пересіві МС у культуральне середовище, що містило 10% ФТС, спостерігалася прикріплення $(88,5 \pm 8)\%$ МС до поверхні культурального посуду протягом першої доби. З $(90 \pm 9)\%$ МС, які прикріпилися, мігрували клітини (Рис. 3.22).

Клітини проліферували та утворювали моношар (Рис. 3.23). Потрібно відзначити, що спочатку спостерігалася активна міграція та розмноження клітин типу 2, тому моношар мав вигляд сітки. Пізніше у ньому з'являлися фібробластоїдні клітини типу 3. Вони могли розташовуватися під клітинами з відростками або формували окремі ділянки.

Кількісний аналіз площі моношару, утвореного після пересіву МС, представлено на рисунку 3.24. Помітно, що формування моношару тривало упродовж 10-ти діб, після чого спостерігалася уповільнення росту клітин. Подібна динаміка зростання культури була характерною для МС, отриманих як при додаванні В27, так і Нейромаксу.

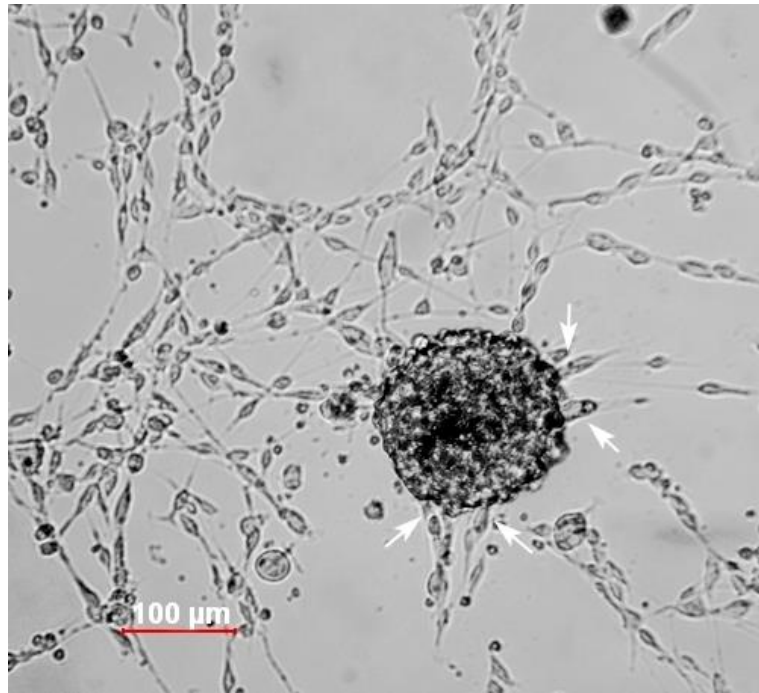


Рис. 3.22. Міграція клітин із МС після його пересіву у культуральне середовище із 10% ФТС. МС є прикріпленим до поверхні культурального посуду. Перша доба субкультивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

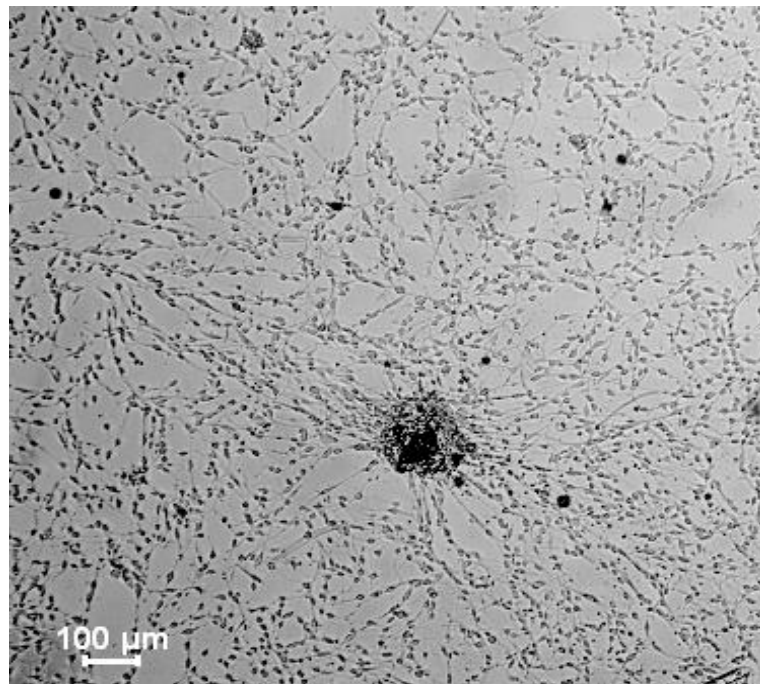


Рис. 3.23. Моношар, отриманий після пересіву МС у культуральне середовище із 10% ФТС. 10-а доба субкультивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

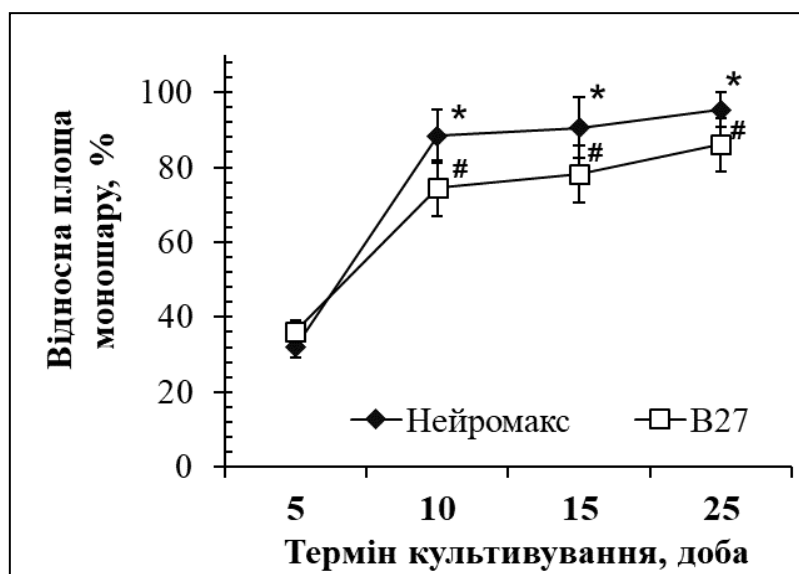


Рис. 3.24. Відносна площа моношару, сформованого клітинами, що мігрували з МС при пересіві у культуральне середовище із 10% ФТС. Примітка: *, # – відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) в порівнянні з п'ятою добою культивування для середовищ із Нейромаксом або B27 відповідно.

При пересіві МС у моношарі були виявлені клітини трьох морфологічних типів, незалежно від того в присутності якої домішки (B27 або Нейромакс) формувалися МС (Рис. 3.25).

Кількісний аналіз показав, що при пересіві МС, утворених в культуральному середовищі із Нейромаксом, клітини типу 1 складають $(8 \pm 3)\%$, типу 2 – $(31 \pm 7)\%$ і типу 3 – $(61 \pm 11)\%$ (Рис. 3.26). При пересіві МС, утворених у середовищі із B27, клітини типу 1 складають $(6 \pm 3)\%$, типу 2 – $(20 \pm 6)\%$ і типу 3 – $(74 \pm 10)\%$. Значущих розбіжностей в залежності від використаної домішки не спостерігалось.

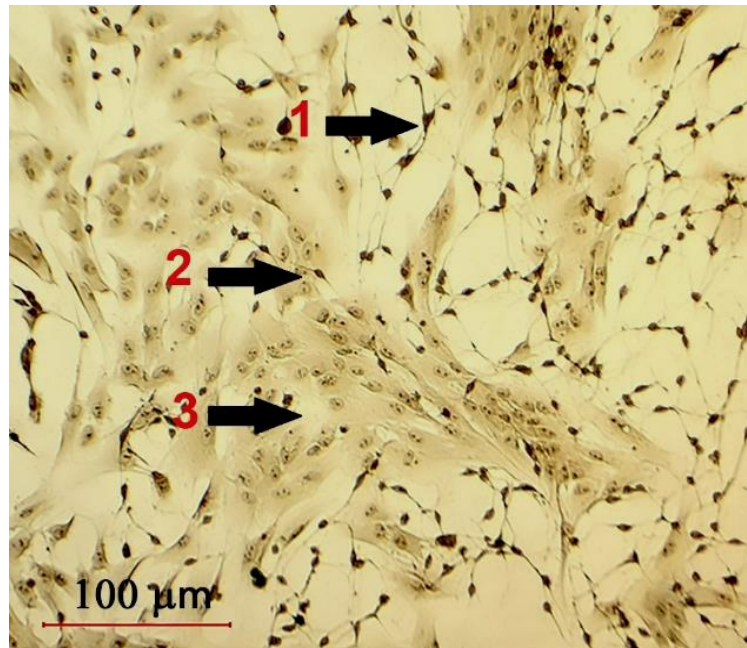


Рис. 3.25. Моношар, що складався з клітин усіх морфологічних типів, отриманий при пересіві МС. 10-а доба субкультивування. 1 – клітини типу 1, 2 – клітини типу 2, 3 – клітини типу 3. Фіксований препарат, забарвлення гематоксилином та еозином.

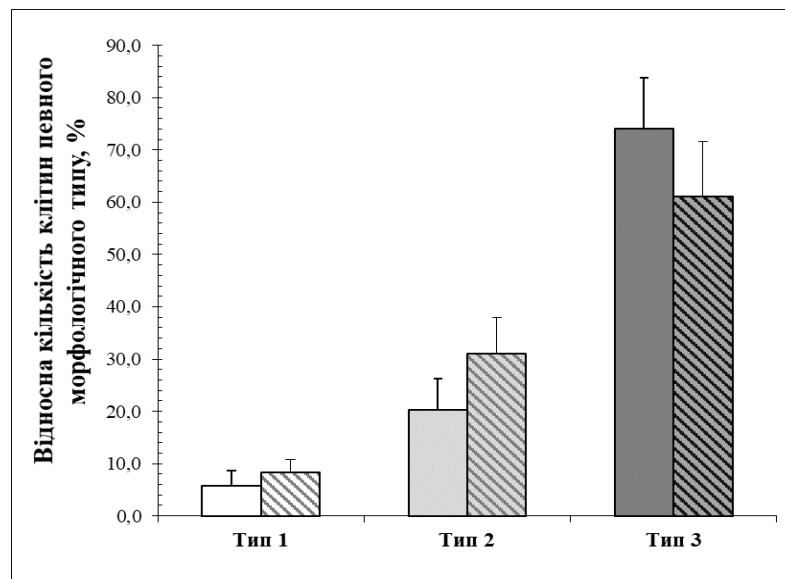


Рис. 3.26. Відносна кількість клітин різних морфологічних типів у моношарі, отриманому при пересіві МС в культуральне середовище із 10% ФТС. ▨ – МС, утворені в середовищі із Нейромаксом; □ – МС, утворені в середовищі із В27. 10-а доба культивування.

Імуноцитохімічне забарвлення показало виражену експресію ГС у моношарі, отриманому при пересіві МС, отриманих як при додаванні В27, так й Нейромаксу (рис. 3.27). За морфологічними характеристиками, клітини, які експресували ГС, належали до клітин типів 2 та 3.

У моношарі, сформованому після пересіву МС, також була виявлена експресія β -III-туб (рис. 3.28). Причому, вона спостерігалася у клітинах всіх морфологічних типів. При цьому, як і раніше при дослідженні клітин моношарової ККСГ, експресії S-100 не було виявлено.

В залежності від тривалості культивування МС мали різну здатністю до адгезії при пересіві у культуральне середовище, що містить 10% ФТС. На більш ранніх термінах культивування (8–10 добові) МС прикріплялися й утворювали моношар, як це було описано вище.

На пізніх термінах культивування (21–25-м добу) у культурі спостерігалася наявність великих (більше 300–400 мкм) і середніх (100–150 мкм) МС (рис. 3.29). При цьому великі МС втрачали здатність до адгезії при пересіві у культуральне середовище із 10% ФТС. У культурі після пересіву таких МС спостерігалися неприкріплені пухкі клітинні агрегати неправильної форми, щільні сферичні темні сфероїди та клітинний дебрис. Середні МС прикріплялися до поверхні культурального пластика при пересіві, але кількість тих клітин, які виселялися з них, була незначною.

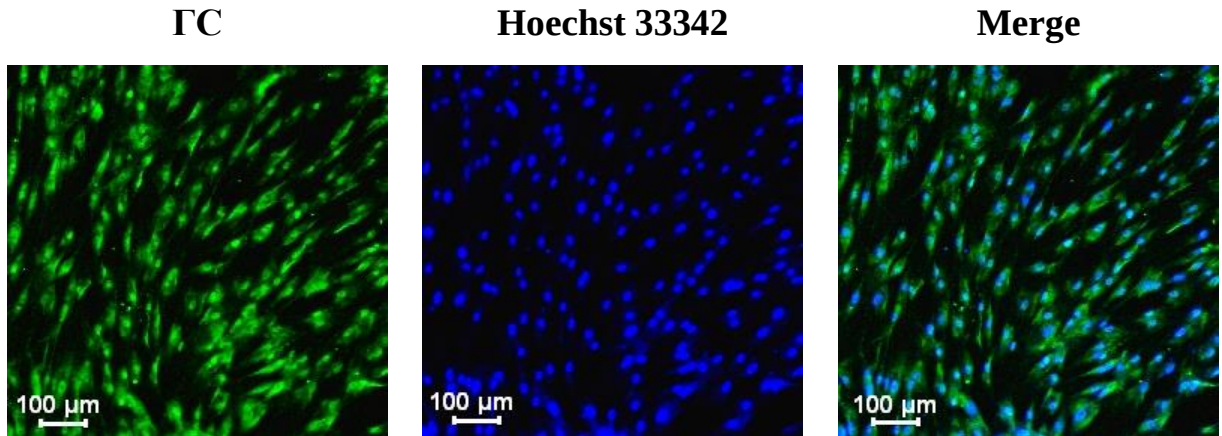


Рис. 3.27. Експресія ГС (зелена флуоресценція) у клітинах моношару, що утворився при пересіві МС у культуральне середовище із 10% ФТС. МС були отримані у безсироватковому середовищі, що містило 2% Нейромаксу. 14-а доба субкультивування. Ядра клітин пофарбовані Hoechst 33342 (синя флуоресценція). Об'єднане зображення (merge) демонструє ко-локалізацію фарбування. Фіксований препарат, флуоресцентна мікроскопія.

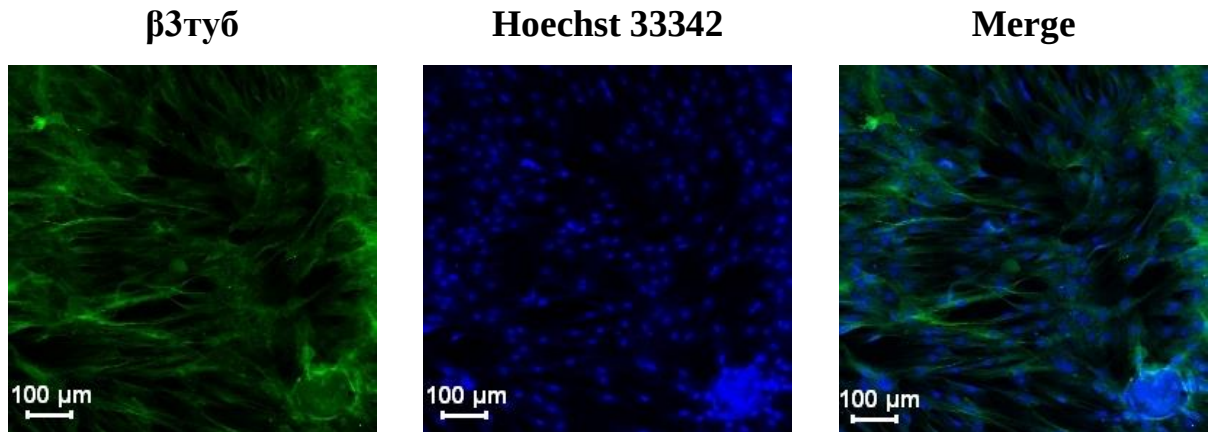


Рис. 3.28. Експресія β -III-туб (зелена флуоресценція) у клітинах моношару, що утворився при пересіві МС у культуральне середовище із 10% ФТС. МС були отримані в безсироватковому середовищі, що містило 2% Нейромаксу. 14-а доба субкультивування. Ядра клітин пофарбовані Hoechst 33342 (синя флуоресценція). Об'єднане зображення (merge) демонструє ко-локалізацію фарбування. Фіксований препарат, флуоресцентна мікроскопія.

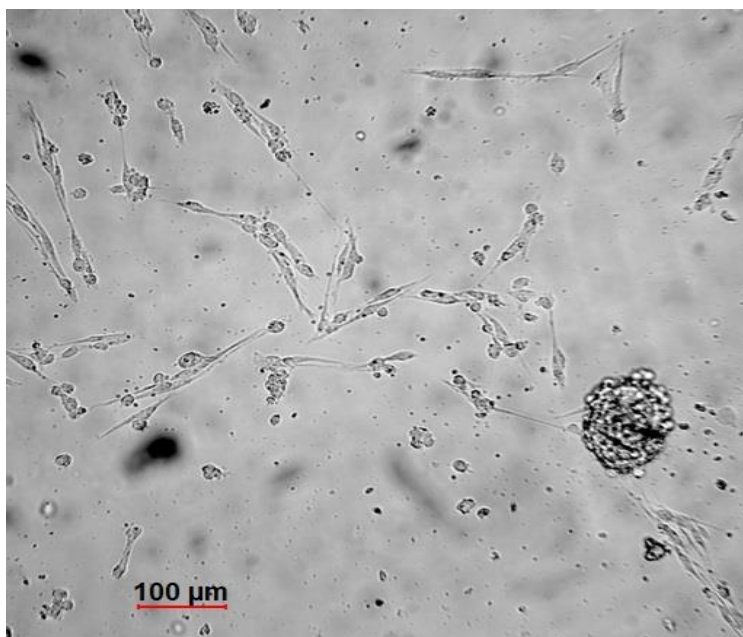


Рис. 3.29. Прикріплення МС, отриманих у безсироваткових умовах культивування, після їх пересіву на 25-ту добу у середовище із 10% ФТС. Восьма доба субкультивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

Висновки за розділом:

1. Культивування клітин, виділених зі СГ неонатальних поросят, у культуральному середовищі, що містило 10% ФТС, призводить до формування клітинного моношару, який складається з морфологічно різних типів клітин: полігональних клітин з вираженими сплюсненими відростками (тип 1), веретеноподібних клітин з двома тонкими відростками (тип 2), великих фібробластоїдних клітин (тип 3) та тіл ЧН.
2. Кількість пасажів впливає на морфологічний тип клітин, який переважає у клітинній культурі СГ неонатальних поросят. При першому пасажі спостерігається елімінація тіл ЧН, на другому пасажі спостерігається експансія фібробластоїдних клітин (тип 3).
3. Культивування клітин, виділених зі СГ неонатальних поросят, у безсироватковому середовищі із додаванням В27 або Нейромаксу призводить до утворення МС, при цьому Нейромакс забезпечує більш інтенсивне сфероїдоутворення.

4. Перенесення МС, сформованих у присутності обох домішок, у культуральне середовище із 10% ФТС призводить до прикріплення МС та виселення клітин типів 1–3. Тривале культивування МС призводить до втрати їхніх морфофункціональних властивостей та деградації.
5. Незалежно від способу отримання культури у вигляді моношару або МС, клітини культури експресують ГС та β -III-тубулін, але не експресують S100. При цьому, експресія ГС спостерігається у клітинах типу 2, що в комплексі з морфологічними характеристиками дозволяє віднести їх до МГ. У клітинах типу 1 спостерігається експресія β -III-тубуліну, що в комплексі з морфологічними характеристиками дозволяє віднести їх до нейронів. Клітини типу 3 експресують ГС та β -III-тубулін, що може свідчити про втрату спеціалізованих властивостей МГ та їх дедиференціювання.

Публікації за розділом:

1. Али СГ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Серія «Біологія». 2018; (30):49–59.
2. Али СГ, Коваленко ИФ, Божок ГА. Некоторые фенотипические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 3(152):46–50.
3. Али СГ, Лаврик АА, Божок ГА. Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 40-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 23–24.05.2016 м. Харків, 2016. С. 29.
4. Али СГ. Влияние условий культивирования на некоторые морфофункциональные характеристики первичных культур клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Научные исследования и

разработки 2018 года: материалы Международной научно–практической конференции, г. Москва, Россия, 15–31.10.2018 г. Москва, 2018. с. 303–7.

5. **Али СГ, Божок ГА.** Экспрессия нейрональных маркеров в культуре клеток, полученной из нативных и криоконсервированных мультиклеточных сфероидов из спинальных ганглиев неонатальных поросят. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 43-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 27–29.05.2019 г. Харків, 2019. с. 27.
6. **Алі СГ, Божок ГА.** Експресія нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18–21.2019 Yaremche, 2019. p. 163.

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ У КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩАХ ІЗ РІЗНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ ДМСО НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА ІМУНОФЕНОТИПОВІ ВЛАСТИВОСТІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ

Кріоконсервування є найбільш популярним та перспективним способом тривалого зберігання клітинних культур. Взагалі, відносно клітинних культур існує тільки одна альтернатива кріоконсервуванню – довготривала підтримка культури шляхом пересіву. Але багаторазові пасажі підвищують ризик втрати культурою притаманних їй ростових та імунофенотипових властивостей [246] та зараження культур патогенними мікроорганізмами, є ресурсовитратними та трудомісткими. Кріоконсервування не тільки знімає необхідність постійного пасажування, але й надає достатньо часу для всебічного аналізу та стандартизації біоматеріалу, дає можливість його накопичення у кріобанках, транспортування й використання за запитом.

Для вибору режиму кріоконсервування необхідно враховувати такі основні складові: вид кріопротектору, час насичення ним біооб'єкту, швидкість охолодження та відігріву. У теперішній час зустрічається вкрай мало даних про кріоконсервування культур клітин зі СГ, тому при виборі підходів до кріоконсервування ККСГ ми керувалися наступними міркуваннями.

В роботі Schwarz та спів. кріоконсервування суспензії клітин, отриманих зі СГ собак, здійснювали з використанням кріозахисного середовища на основі 10% ДМСО з додаванням ФТС та повільної швидкості охолодження – 1 °C/хв до –80°C з подальшим зануренням в рідкий азот [22]. При цьому, збереженість гліальних клітин, які й були у фокусі нашого дослідження, становила близько 90% після кріоконсервування. Однак вихід клітин не перевищував 47% від початкової кількості до заморожування, що

може бути наслідком токсичної дії ДМСО. З огляду на це, в якості кріопротектору нами був обраний ДМСО. Додатково, спираючись на дані про токсичність високих концентрацій ДМСО [247], у складі кріозахисного середовища нами були протестовані його нижчі концентрації.

Щодо кріоконсервування клітин нейрального походження існували дані про досить високу життєздатність клітин після застосування повільної швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ [22, 210, 219, 220]. Для кріоконсервування сфероїдів нейрального походження (нейросфер) ця швидкість охолодження теж була використана з успіхом [192, 210, 226]. На жаль, досі не було створено режиму кріоконсервування МС саме зі СГ, однак для інших багатоклітинних об'єктів, які походять з НГ, теж використовували повільні швидкості заморожування – $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ та $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. При цьому були отримані суперечливі результати: в одній роботі встановлено перевагу $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ у порівнянні з $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ [248], в іншій – $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ у порівнянні з $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ [249]. Враховуючи це, нами було обрано обидві повільні швидкості охолодження для кріоконсервування ККСГ у вигляді клітин та МС.

Наявні протоколи кріоконсервування сфероїдів передбачають попередню інкубацію з ДМСО від 10 до 15 хв [225, 250, 251]. Крім того, існують роботи [220], в яких використовується аналогічний час насичення кріопротектором для суспензії поодиноких клітин [252].

Для стандартизації протоколів кріоконсервування, зниження матеріальних витрат, трудомісткості процесу заморожування особливо привабливим для лабораторій та кріобанків є створення режиму кріоконсервування, який би водночас підходив і для клітин, і для МС. Зрозуміло, що для крупних «зрілих» МС пізніх термінів культивування це є малоімовірним. Однак для «ранніх» МС восьмої доби розміром близько 100 мкм це здавалося прийнятним.

З огляду на все вищесказане, нами був обраний режим, що включав насичення як суспензії поодиноких клітин, так й МС, у кріозахисному середовищі з кріопротектором ДМСО протягом 15 хв при 4°C , з подальшим

3х-етапним охолодженням: 1) зі швидкістю охолодження 0,5 °C/хв до -20°C; 2) зі швидкістю 1°C /хв від -20°C до -80°C ; 3) занурення в рідкий азот. При цьому передбачалося, що використання 0,5°C/хв на першому етапі сприяло більш рівномірному насиченню кріопротектором клітин у складі МС та знижувало ймовірність пошкодження МС за рахунок термопружної деформації.

4.1. Кріоконсервування культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді клітинної суспензії

Моношарову ККСГ неонатальних поросят, яка сформувалася на сьому добу культивування, відкріпляли від підложки за допомогою ферментативного розчину, насичували кріопротектором ДМСО у трьох концентраціях (5, 7,5 та 10%) та заморожували як описано у «Матеріалах і методах дослідження». Концентрація клітин після додавання кріопротектора становила $1-2 \times 10^5$ клітин/мл.

Якщо у контрольній (інтактній) ККСГ після відкріплення від поверхні культивування середній показник збереження клітин, визначений за забарвленням трипановим синім, становив $(92,6 \pm 1,6)\%$ (Рис. 4.1), то кріоконсервування у всіх використаних кріозахисних середовищах зменшувало показник збереження клітин.

Після кріоконсервування у середовищах, що містили 5 та 10% ДМСО, збереженість клітин знижувалася у порівнянні з контролем на 9,3 та 8,9% відповідно ($p \leq 0,05$), у середовищі, що містило 7,5% ДМСО – на 4,9%.

Вихід клітин після кріоконсервування становив $(74,3 \pm 8,1)\%$ у середовищі із 5% ДМСО, $(78,3 \pm 7,1)\%$ – у середовищі із 7,5% ДМСО та $(63,7 \pm 9,2)\%$ – у середовищі із 10% ДМСО (Рис. 4.1). Падіння показника виходу клітин у зразках, що були кріоконсервовані з 10% ДМСО, ймовірно, викликане проявом токсичних властивостей більш високої концентрації кріопротектору.

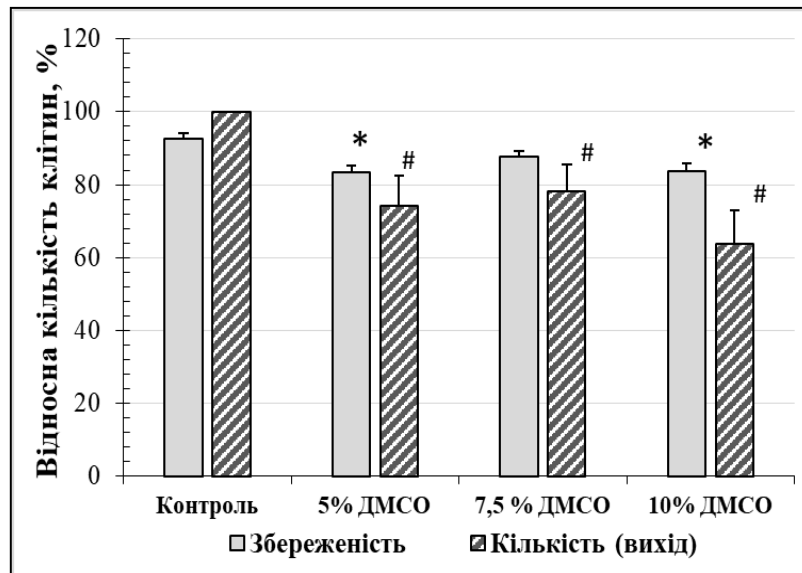


Рис. 4.1. Збереженість та вихід клітин після кріоконсервування ККСГ неонатальних поросят у кріозахисних середовищах із різними концентраціями ДМСО. Примітка: ■ – збереження; ▨ – вихід клітин; *,# – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем.

Для з'ясування функціональної життєздатності ККСГ, деконсервовані клітини після відмивання від кріопротектору сіяли у 24-лункові планшети у концентрації $3-4 \times 10^4$ кл/мл.

Кріоконсервування впливало на швидкість формування моношару (рис. 4.2). Якщо на четверту добу в контролі відносна площа моношару становила $(86,2 \pm 4,7)\%$, то в кріоконсервованих зразках цей показник був майже вдвічі нижчим ($p \leq 0,05$). При цьому не спостерігалось значних відмінностей між культурами, замороженими в присутності ДМСО в концентраціях 5% (площа моношару $(36,2 \pm 6,2)\%$), 7,5% (площа моношару $(37,5 \pm 5,0)\%$) і 10% ДМСО (площа моношару $(45,0 \pm 7,1)\%$).

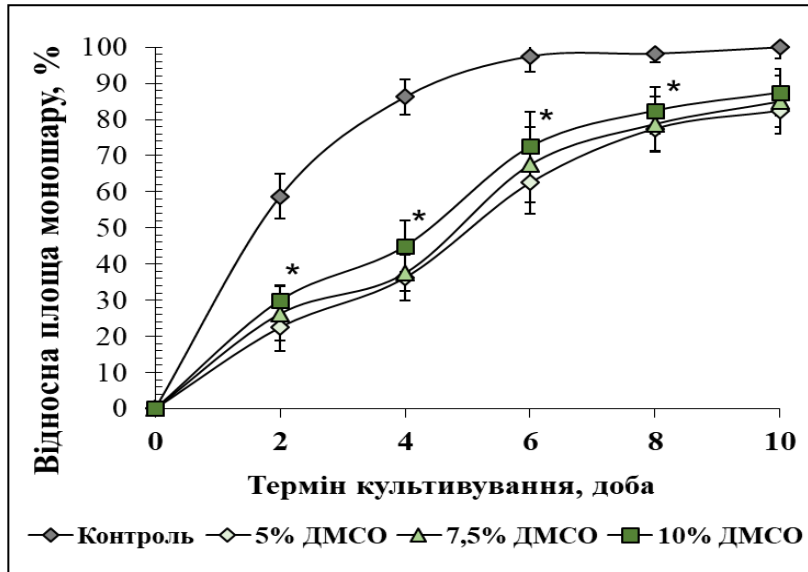


Рис. 4.2. Зміна відносної площі моношару у процесі субкультивування контрольної та кріоконсервованої у присутності різних концентрацій ДМСО ККСГ. Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем.

Морфологічний аналіз показав, що моношар, отриманий з кріоконсервованих зразків ККСГ, включав 3 типи клітин (типів 1–3), характерних для контрольної культури (Рис. 4.3). Як і при субкультивуванні контрольної ККСГ, так і після кріоконсервування в культурі були відсутні тіла ЧН. На 2–3 добу після розморожування в культурі спостерігалися переважно МГ, які формували «мережу». У наступні дні спостерігалось розростання клітин типу 3, при цьому клітини типу 2 часто розташовувалися на підкладці з клітин типу 3.

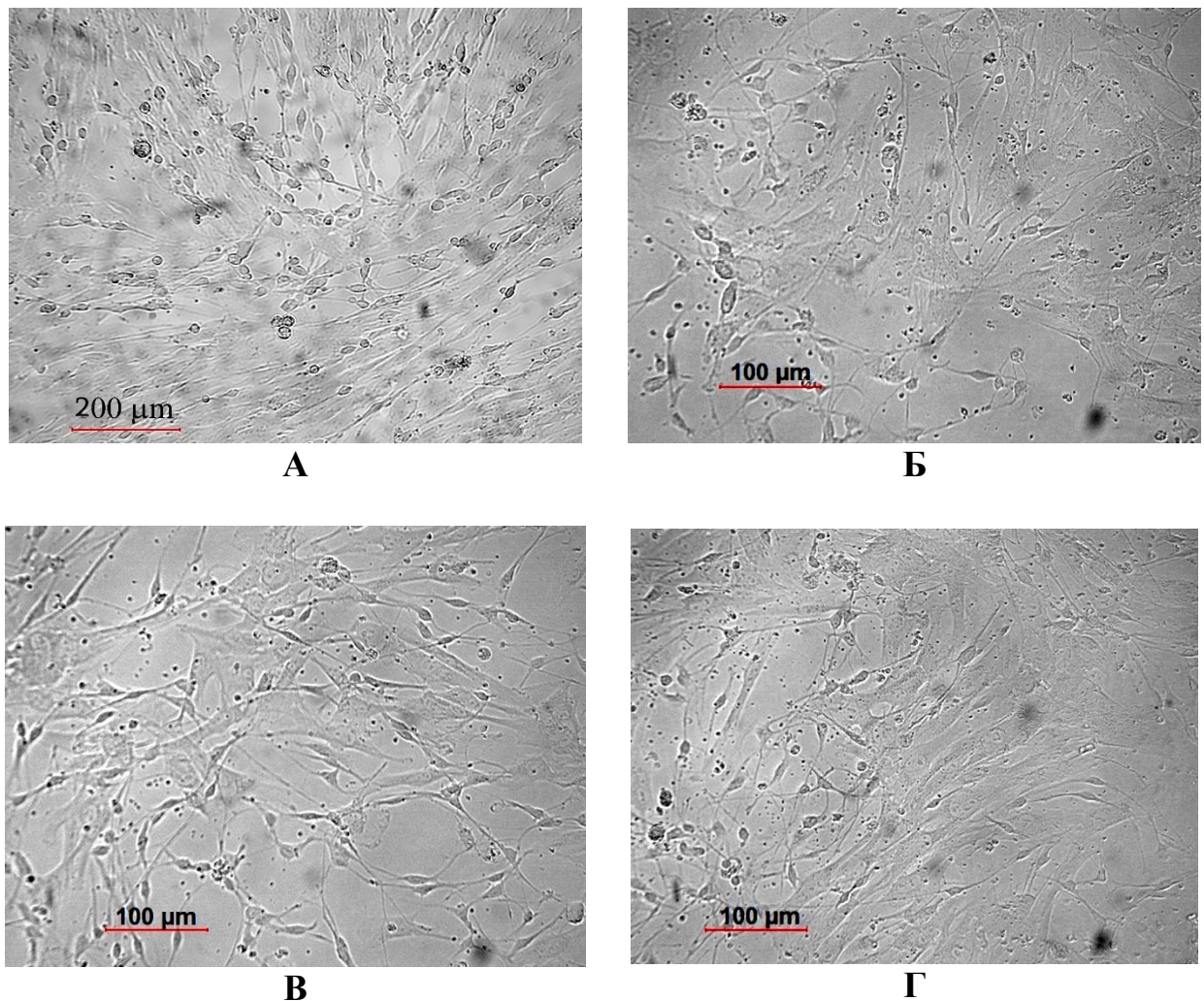


Рис. 4.3. Контрольна та кріоконсервована ККСГ неонатальних поросят на шосту добу субкультивування: А – контрольна культура; Б – кріоконсервування з 5% ДМСО; В – кріоконсервування з 7,5% ДМСО; Г – кріоконсервування з 10% ДМСО.

Кількісний аналіз показав, що кріоконсервування змінювало співвідношення морфологічних типів клітин у культурі (Рис. 4.4). Кількість клітин типу 1 збільшувалася у всіх кріоконсервованих зразках порівняно із контролем. Найбільш близькою до контролю за співвідношенням клітинних типів була культура, заморожена у присутності 10% ДМСО.

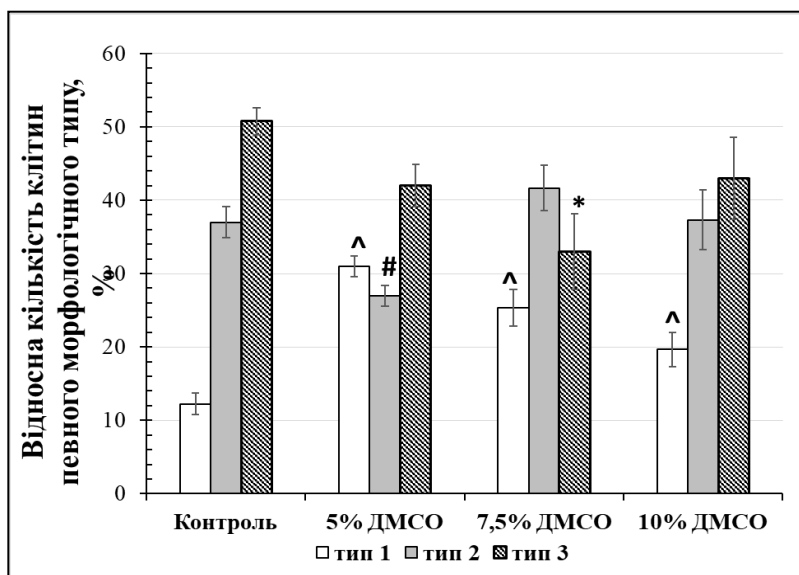


Рис. 4.4. Співвідношення клітин різних морфологічних типів у культурах клітин, кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО. Третя доба субкультивування. Примітка: [^], [#], ^{*} – відмінності значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються від контролю для клітин відповідного морфологічного типу.

Відомо, що процес кріоконсервації може мати вплив на експресію клітинних маркерів [253], тому було необхідним провести імуноцитохімічне дослідження деконсервованої ККСГ. Встановлено, що після кріоконсервування у присутності всіх досліджуваних концентрацій ДМСО ККСГ продовжувала експресувати ГС і β -III-тубулін (Рис. 4.5 і 4.6).

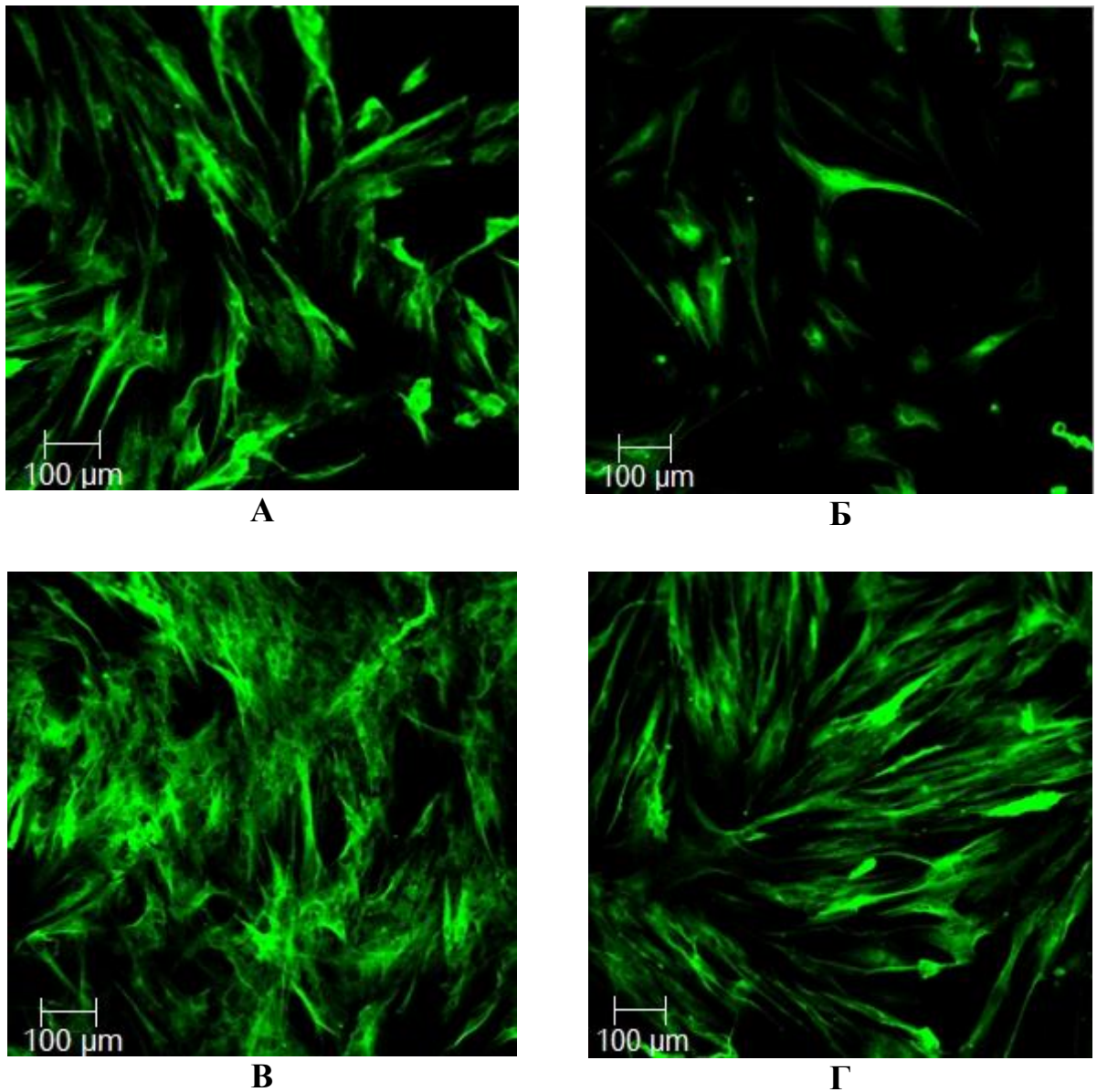


Рис. 4.5. Експресія β -ІІІ-тубуліну (зелена флуоресценція) у ККСГ: контрольній (А) та кріоконсервованій у присутності 5% (Б), 7,5% (В) і 10% (Г) ДМСО. 14-та доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна мікроскопія.

Оскільки МГ знаходилися у фокусі наших досліджень, було необхідним дослідити вплив процесу кріоконсервування на вихід цих клітин.

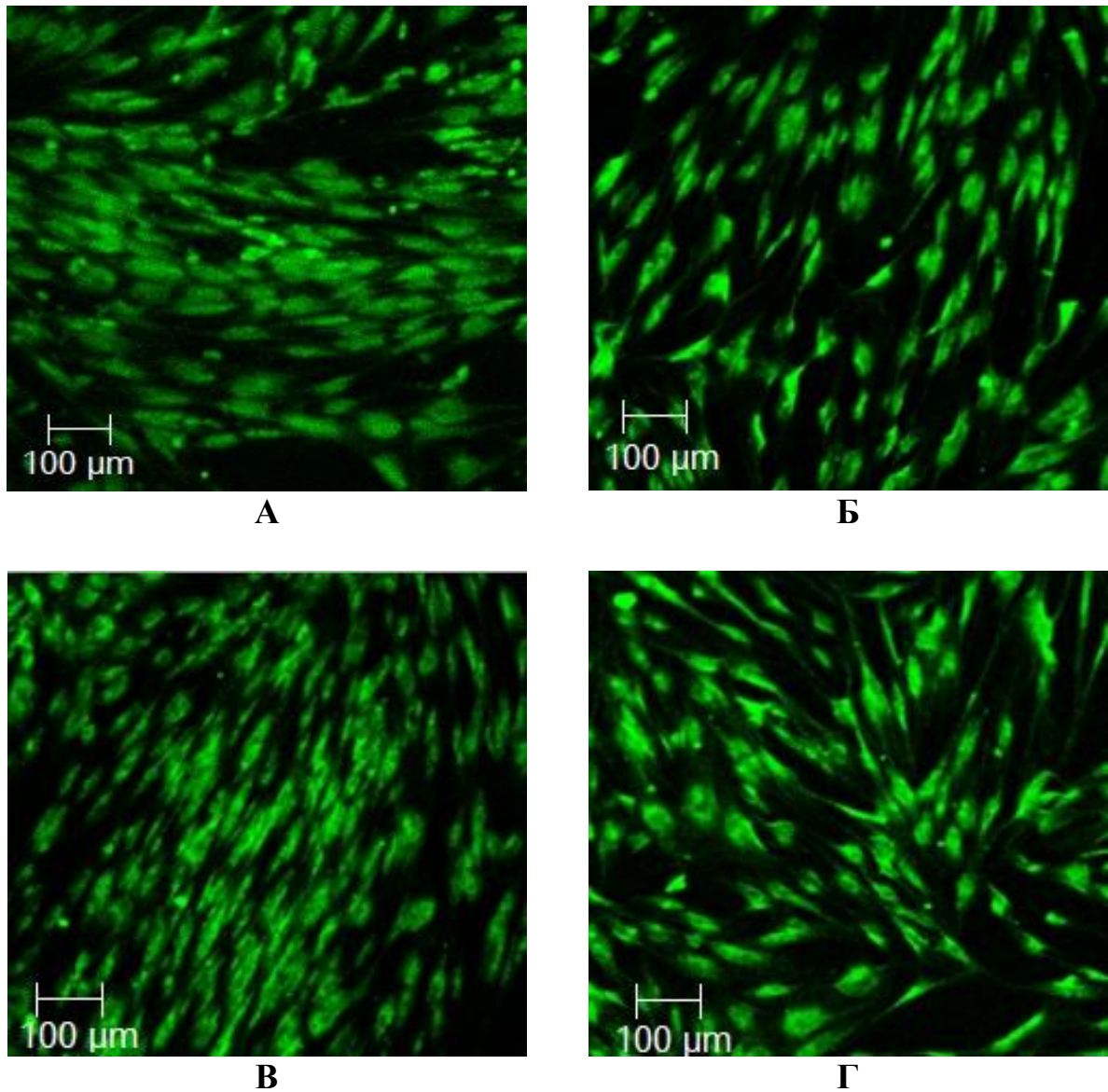


Рис. 4.6. Експресія ГС (зелена флуоресценція) у ККСГ: контрольній (А) та кріоконсервованій у присутності 5% (Б), 7,5% (В) і 10% (Г) ДМСО. 14-та доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна мікроскопія.

Ми оцінили кількість МГ, що експресують ГС, у субкультурі після пересіву або кріоконсервування. Встановлено, що відносна кількість ГС-позитивних клітин в кріоконсервованих зразках відрізнялася в залежності від концентрації ДМСО в кріозахисному середовищі (Рис. 4.7). Найбільша кількість МГ спостерігалася в ККСГ, замороженій у присутності 7,5% ДМСО ($(94,5 \pm 5,1)\%$ від контролю). У зразках, заморожених у присутності 5 і 10%

ДМСО, цей показник становив $(67,3 \pm 7,6)\%$ і $(75,4 \pm 6,9)\%$ від контролю, відповідно.

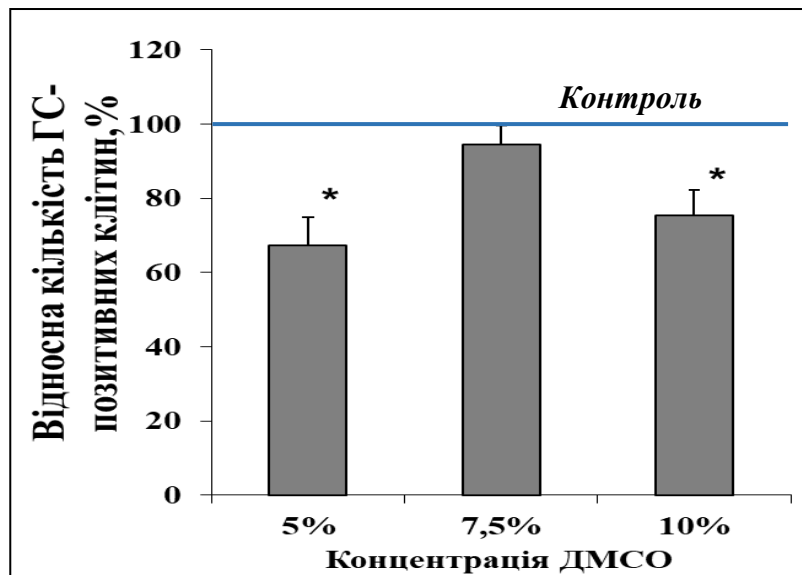


Рис. 4.7. Відносна кількість ГС-позитивних клітин на 14-ту добу субкультивування ККСГ, кріоконсервованих у кріозахисному середовищі із різними концентраціями ДМСО. Примітка: Контроль – кількість ГС-позитивних клітин у контролі брали за 100%. * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем.

Таким чином виявилось, що ККСГ неонатальних поросят є досить стійкою до пошкодження факторами кріоконсервування. На користь цього факту свідчить висока збереженість клітин ((83–87)%) відразу після розморожування. Концентрація ДМСО у кріозахисному середовищі не чинила значного впливу на швидкість утворення моношару, однак збереженість МГ залежала від цього фактору. У культурах після кріоконсервування з 5 та 10% ДМСО відносна кількість МГ зменшувалася на 33 та 25% відповідно порівняно з контролем, а з 7,5% ДМСО вона значуще не відрізнялася від контролю. Отримані результати дозволяють рекомендувати використання ДМСО в концентрації 7,5% у складі захисного середовища для кріоконсервування ККСГ, збагаченої МГ.

4.2. Кріоконсервування моношарової культури на різних пасажах

У багатоклітинних організмах клітини існують в нерозривному зв'язку одна з одною. Відомо, що клітини у процесі переходу зі стану *in vivo* до *in vitro* відчують сильний стрес, обумовлений рядом факторів: механічне пошкодження, хімічний вплив (подрібнення тканини, ферментативна обробка і т.д.), порушення міжклітинних зв'язків та зміна архітекtonіки тканини, зникнення звичної для них ендокринної та паракринної регуляції.

Після початку культивування клітини протягом декількох діб (а іноді й пасажів) відновлюються від стресу («ремонтують» мембрану, відновлюють рецептори), починають пристосовуватися до нових умов (прикріплюються до доступних поверхонь, переходять на новий режим метаболізму, змінюють форму, експресію генів та інш.). Виходячи з цього, структурно-функціональні властивості первинної культури клітин як правило відрізняються від культури більш пізніх пасажів. Більш того, чутливість клітин до кріоконсервування теж може залежати від цього фактору.

З огляду на цей факт, актуальним було проаналізувати збереженість клітин, кріоконсервованих на різних пасажах. Саме тому на другому етапі роботи було вивчено вплив кріоконсервування в присутності 5, 7,5 та 10% ДМСО на збереженість та морфологічний склад ККСГ різних пасажів.

Встановлено (Рис. 4.8), що кріоконсервування первинної культури (нульовий пасаж) зменшувало збереженість клітин у порівнянні з контролем з 92% до 83% у присутності 5 та 10% ДМСО ($p \leq 0,05$) і до 87,7% у присутності 7,5% ДМСО ($p \leq 0,05$). Клітини першого пасажу виявилися більш стійкими до кріоконсервування. При їх заморожуванні в присутності 5% ДМСО показник збереженості клітин знижувався до 84,9% ($p \leq 0,05$), а в присутності 7,5 і 10% ДМСО – значуще не відрізнявся від контролю і становив відповідно $(90,6 \pm 4,6)\%$ і $(87,7 \pm 3,9)\%$.

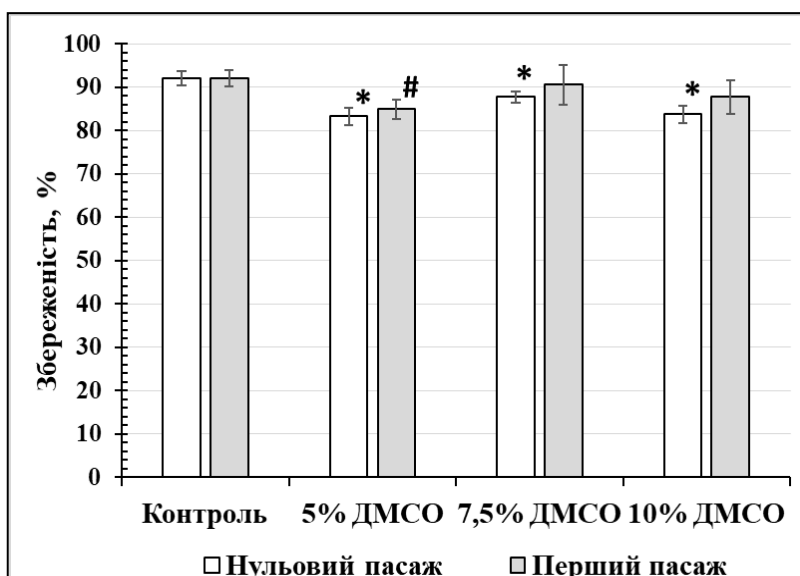


Рис. 4.8. Збереженість ККСГ неонатальних поросят різних пасажів після кріоконсервування. Контроль – інтактна ККСГ відповідного пасажу. Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) відрізняються в порівнянні з контролем нульового пасажу, # – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) відрізняються порівнянні з контролем першого пасажу.

Відомо, що процес кріоконсервування неоднаково впливає на виживаність різних типів клітин у гетерогенній за складом культурі. У зв'язку з цим, нами було проведено аналіз співвідношення типів клітин у ККСГ, яка була кріоконсервована на різних пасажах.

При кріоконсервуванні ККСГ першого пасажу виявилось, що відносна кількість клітин типу 1 незначущо відрізнялася від контрольної культури відповідного пасажу. У клітин типу 2 зростала чутливість до факторів кріоконсервування (Рис. 4.9). Відносна кількість цих клітин після розморожування становила від 11 до 14%, у той час як у контролі – 29%. Клітини типу 3 виявилися стійкими до заморожування, оскільки їх відносна кількість становила від 81 до 87% у залежності від використаної концентрації ДМСО. Цікаво, що в контрольній ККСГ кількість клітин цього типу була 66%.

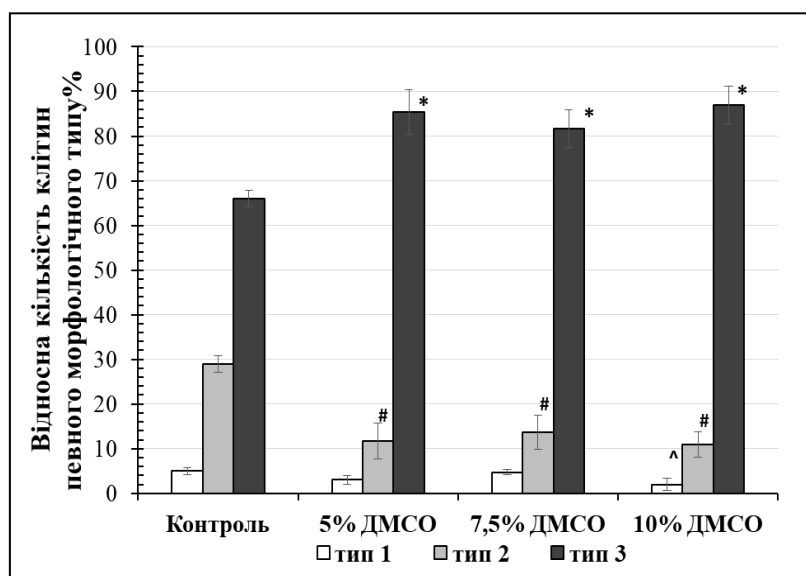


Рис. 4.9. Співвідношення клітин різних морфологічних типів у ККСГ, кріоконсервованих на першому пасажі. Примітка: ^, #, * – відмінності значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються у порівнянні з контролем (інтактною культурою першого пасажу) для клітин типів 1–3 відповідно.

Таким чином, отримані результати підтвердили, що ККСГ новонароджених поросят, має досить високу стійкість до пошкоджень факторами кріоконсервування при використанні повільних швидкостей охолодження та ряду концентрацій ДМСО від 5 до 10%. При цьому стійкість ККСГ зростає з кількістю пасажів. У цьому наші дані збігаються з результатами роботи [254], в якій було встановлено зміну чутливості фібробластів до кріоконсервування в залежності від кількості пасажів. Це є цілком закономірно, оскільки у первинній культурі є досить багато клітин, ушкоджених у процесі ізоляції із складу тканини. При субкультивуванні клітини з летальними пошкодженнями елімінуються з культури, отже у процес кріоконсервування вступають тільки життєздатні клітини.

4.3. Кріоконсервування культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді мультиклітинних сфероїдів

Культитивування клітин у складі МС є одним із сучасних перспективних підходів. Однак незважаючи на перспективність застосування культури клітин зі СГ, до сих пір практично не розроблені способи її кріоконсервування. Це стосується також й ККСГ, яка культивується у вигляді МС. Враховуючи актуальність проблеми, нами було проведено кріоконсервування МС з ККСГ неонатальних поросят.

МС, сформовані у безсироваткових умовах у присутності 2% Нейромаксу на восьму добу культивування, поділяли на дві частини, одну з яких піддавали кріоконсервуванню, а іншу (контроль) пересівали на 24-лунковий планшет з адгезивною поверхнею у поживне середовище α -МЕМ, що містило 10% ФТС.

Візуальна оцінка МС після кріоконсервування не виявила значних порушень. МС, які були проаналізовані нами після розморожування та видалення кріопротектору, зберігали правильну округлу форму, не мали видимих недоліків або дезорганізації структури.

Відомо, що в процесі кріоконсервування відбувається пошкодження зовнішньо- або внутрішньоклітинних структур без порушення цілісності плазматичної мембрани. У зв'язку з цим одним з методів оцінки збереженості МС після циклу заморожування-відігрівання є оцінка здатності МС до адгезії. Вона реалізується через складний комплекс мембранних рецепторів, які опосередковують взаємодії клітин з позаклітинним матриксом [249].

Після кріоконсервування МС зберігали здатність до адгезії. Статистично значущої різниці між контрольними та експериментальними зразками не спостерігалось, проте існувала тенденція до зниження адгезивної здатності МС, які піддавалися кріоконсервуванню в присутності 10% ДМСО (Рис. 4.10).

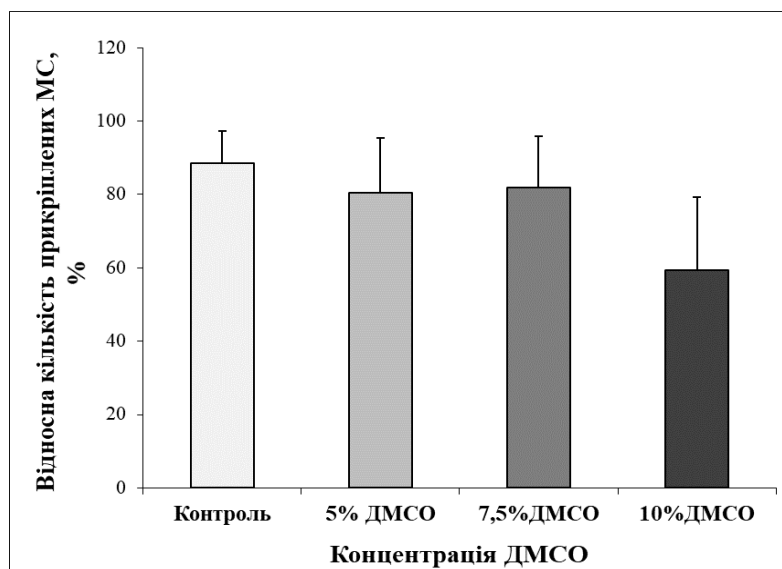


Рис. 4.10. Відносна кількість прикріплених МС після кріоконсервування в середовищах, що містили різні концентрації ДМСО. Перша доба після розморожування та поміщення МС до умов культивування.

На другу добу після поміщення деконсервованих МС до умов культивування спостерігалась міграція з них клітин (Рис. 4.11). Візуально, воно було менш вираженим, ніж в контрольних зразках.

Кількісна оцінка цього показника представлена на рисунку 4.12. У той час, як відносна здатність клітин контрольних МС до міграції становила $(90 \pm 9)\%$, в розморожених зразках спостерігалось зниження цього показника. Для всіх досліджуваних концентрацій ДМСО він знаходився в межах від 65 до 68%.

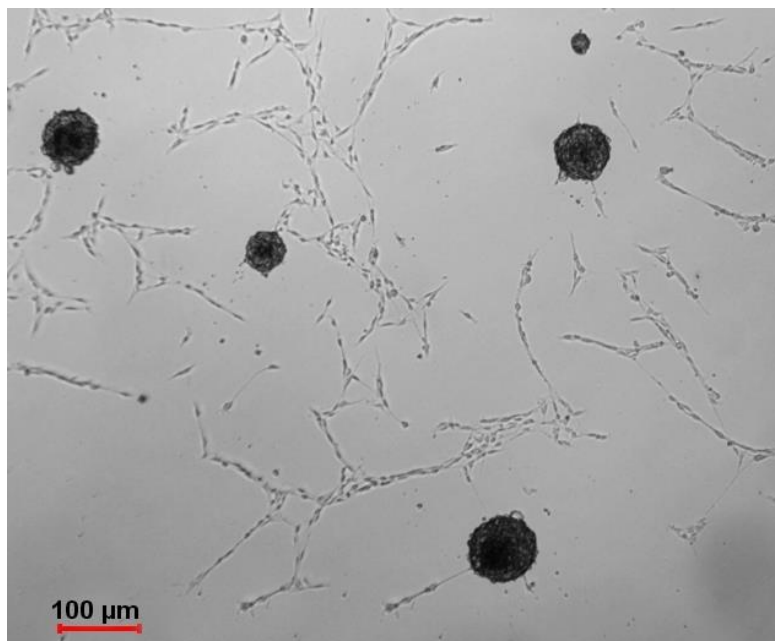


Рис. 4.11. Прикріплення кріоконсервованих МС при культивуванні в середовищі, що містило 10% ФТС. Спостерігається міграція клітин із МС. Четверта доба субкультивування. Прижиттєва світлова мікроскопія.

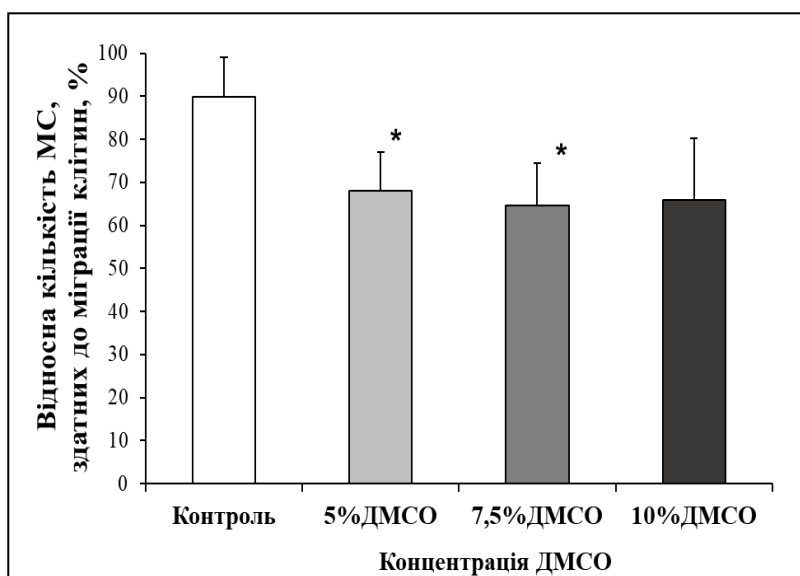


Рис. 4.12. Відносна кількість МС, клітини яких були здатні до міграції, після кріоконсервування МС у кріозахисних середовищах з різними концентраціями ДМСО. Друга доба субкультивування. Примітка: * – відмінності значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються від контролю.

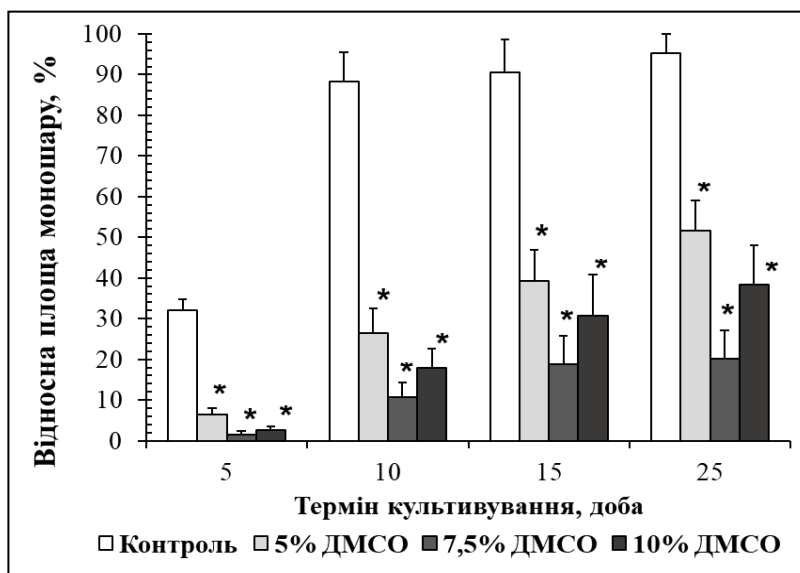


Рис. 4.13. Відносна площа моношару, отриманого із контрольних та кріоконсервованих МС на різних термінах культивування. Примітка: * – відмінності значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються від контролю відповідного терміну культивування.

У культурах клітин, отриманих з кріоконсервованих МС, швидкість формування моношару знижувалася. На 10-ту добу відносна площа моношару складала $(26,3 \pm 6,1)\%$ для МС, заморожених з 5% ДМСО, $(10,7 \pm 3,5)\%$ для МС, заморожених з 7,5% ДМСО, та $(17,8 \pm 4,9)\%$ для МС, заморожених з 10% ДМСО (Рис. 4.13). При цьому в контрольних зразках на цьому терміні спостереження моношар сягав 85–90%. Даний показник збільшувався до термінального строку спостереження та склав відповідно $(51,7 \pm 7,8)\%$, $(20,1 \pm 6,9)\%$ та $(38,5 \pm 9,5)\%$ для зразків, консервованих під захистом 5, 7,5 та 10% ДМСО.

Процес кріоконсервування зберігав всі морфологічні типи клітин, які спостерігаються у ККСГ при пересіві МС (Рис. 4.14). Однак мікроскопічний аналіз виявив, що використання різних концентрацій ДМСО впливало на співвідношення 3-х типів клітин у моношарі.

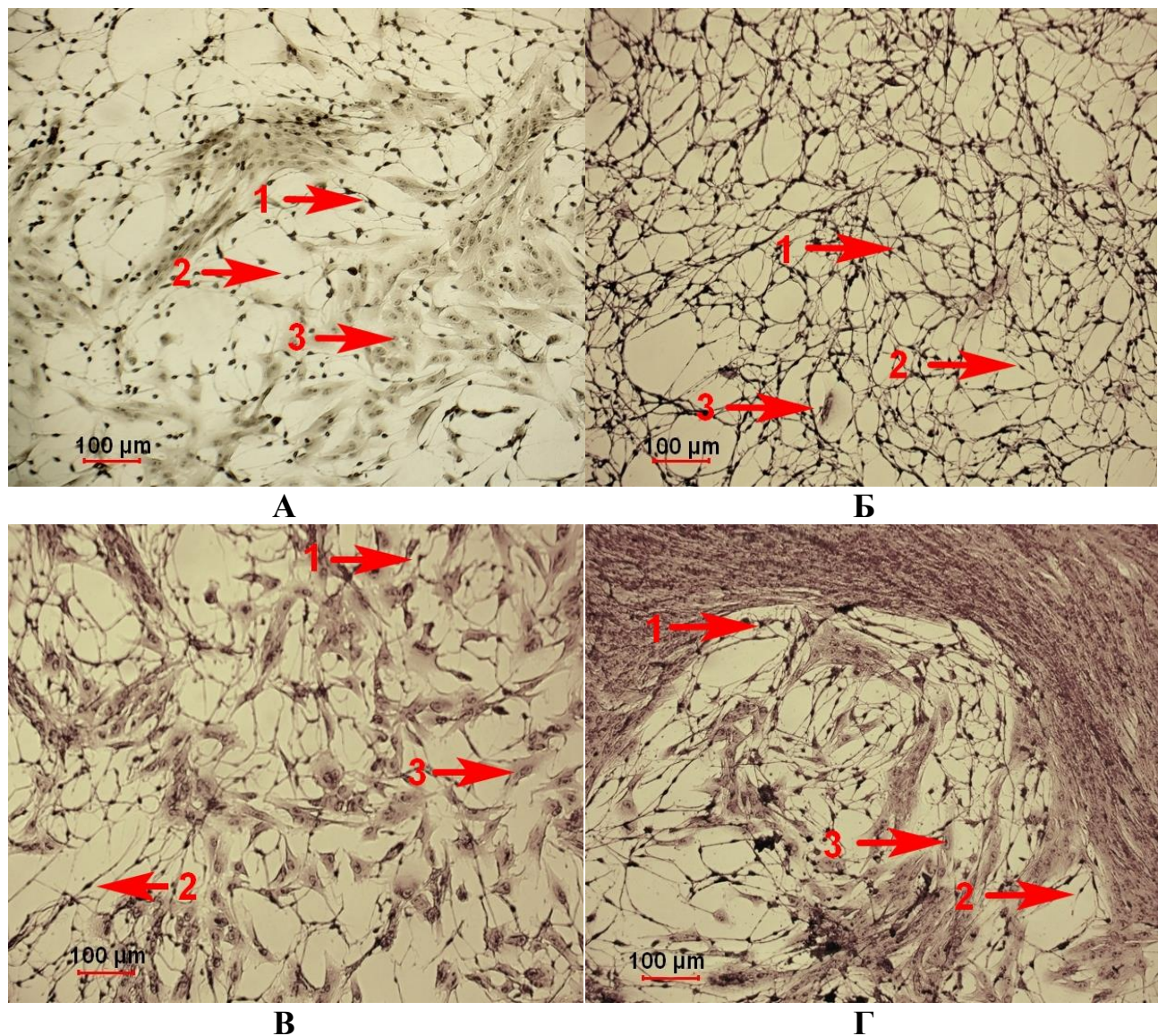


Рис. 4.14. Клітинний моношар, отриманий із МС на 10-ту добу субкультивування: А – контрольні МС; Б – кріоконсервування МС з 5% ДМСО; В – кріоконсервування МС з 7,5% ДМСО; Г – кріоконсервування МС з 10% ДМСО. 1 – клітини типу 1, 2 – клітини типу 2, 3 – клітини типу 3. Фіксований препарат, забарвлення гематоксиліном і еозином.

Кількісний аналіз показав, що найбільш близьке співвідношення клітинних типів до нативної культури зберігалося у культурі, яка була отримана з МС, кріоконсервованих у присутності 10% ДМСО (Рис. 4.15). При цьому кількість клітин типу 1 становила $(9 \pm 3)\%$, типу 2 – $(35 \pm 6)\%$, а типу 3 – $(56 \pm 8)\%$. У культурах, отриманих з МС, які були кріоконсервовані у присутності 5 та 7,5% ДМСО, спостерігалось значне зменшення кількості клітин типу 1 до 3–5%, а також збільшення кількості клітин типу 2 до 80–85% і типу 1 до 12–15%.

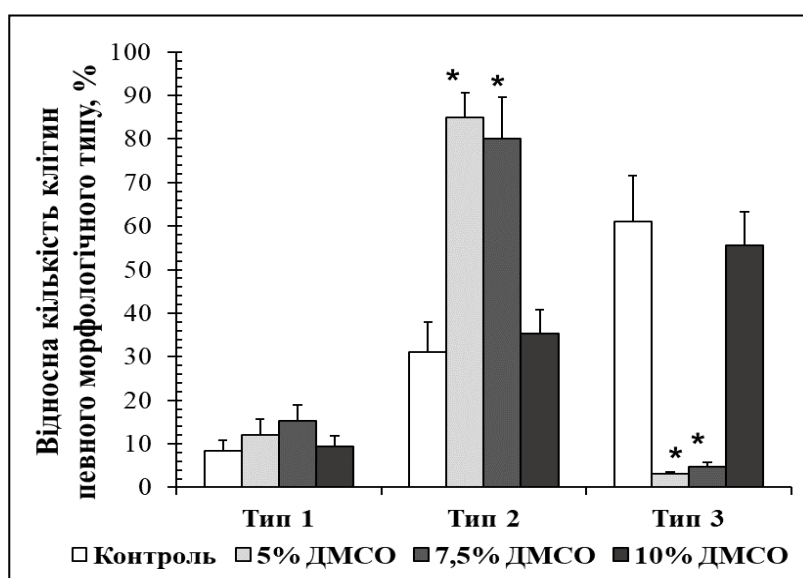
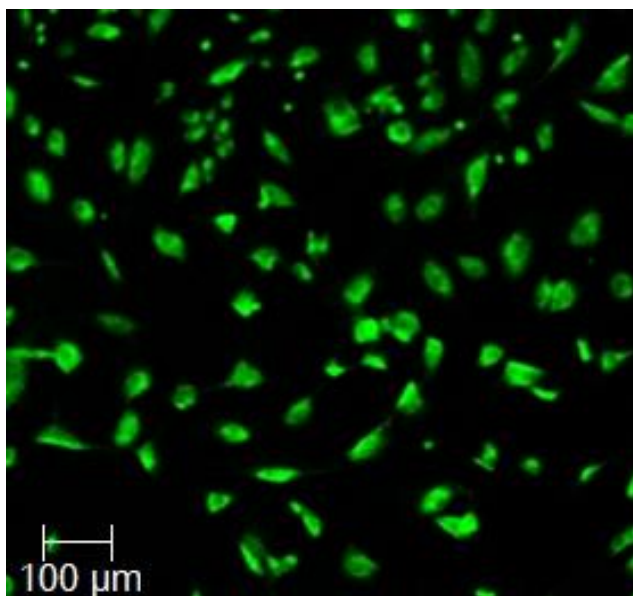


Рис. 4.15. Відносна кількість клітин різних морфологічних типів у моношарі, отриманому із контрольних та кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО МС. 10-та доба субкультивування. Примітка: * – відмінності значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються порівняно до кількості клітин відповідного типу в контролі.

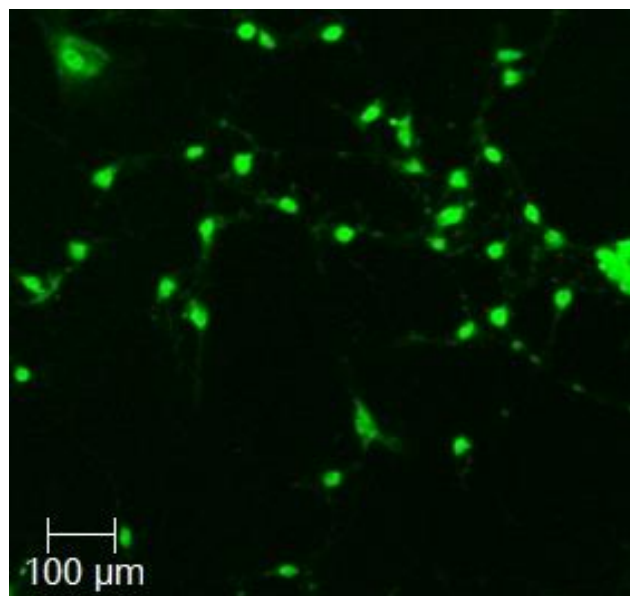
Тобто, іншими словами, вибір концентрації ДМСО у кріозахисному середовищі є важливим для отримання певного морфологічного складу ККСГ, яка була кріоконсервована у вигляді МС. При цьому, кріоконсервування у середовищі з концентрацією ДМСО 7,5% сприяє кращій збереженості клітин типів 1 та 2, з концентрацією 10% – типу 3. Зниження концентрації ДМСО до 5–7,5% призводить до зменшення відносної кількості

клітин типу 3 більше, ніж в 10 разів у порівнянні з контролем. Ці результати свідчать про те, що варіація концентрації ДМСО в кріозахисному середовищі при постійному режимі охолодження може бути способом селективної дії для отримання культури необхідного типу клітин.

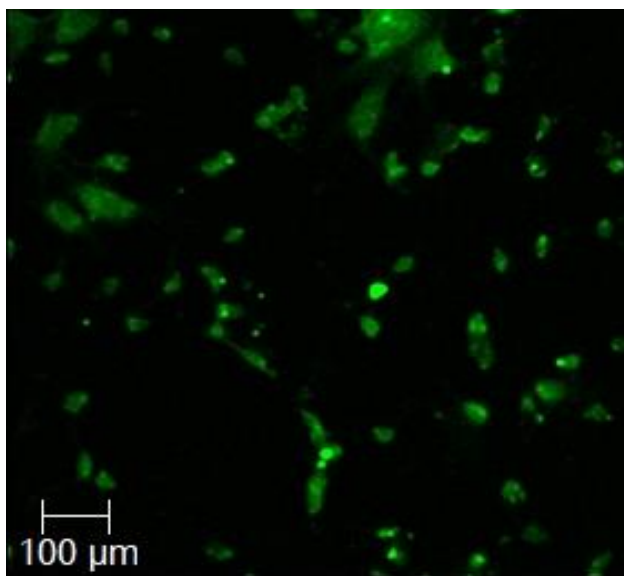
Як й у випадку отримання моношару з контрольних МС, так й з МС, кріоконсервованих при різних концентраціях ДМСО, спостерігалася експресія ГС (Рис. 4.16) та β -III-тубуліну (Рис. 4.17).



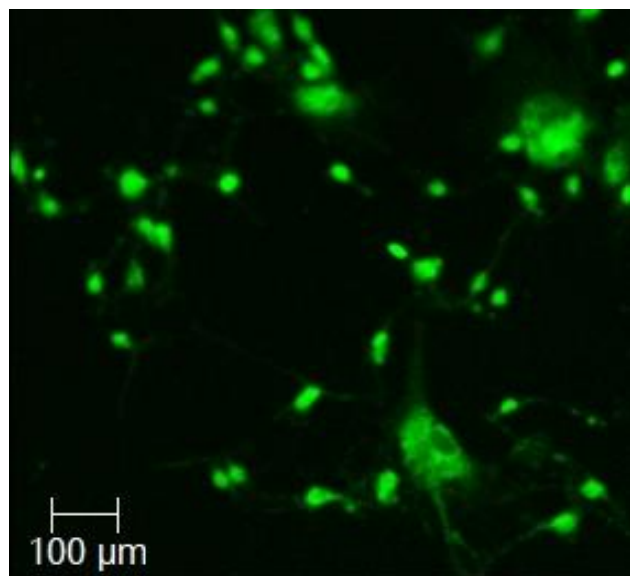
А



Б



В



Г

Рис. 4.16. Експресія ГС (зелена флуоресценція) клітинами моношару, який утворився при пересіві МС: А – контрольні МС; Б – кріоконсервування МС із 5% ДМСО; В – кріоконсервування МС із 7,5% ДМСО; Г – кріоконсервування МС із 10% ДМСО. 14-а доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна мікроскопія.

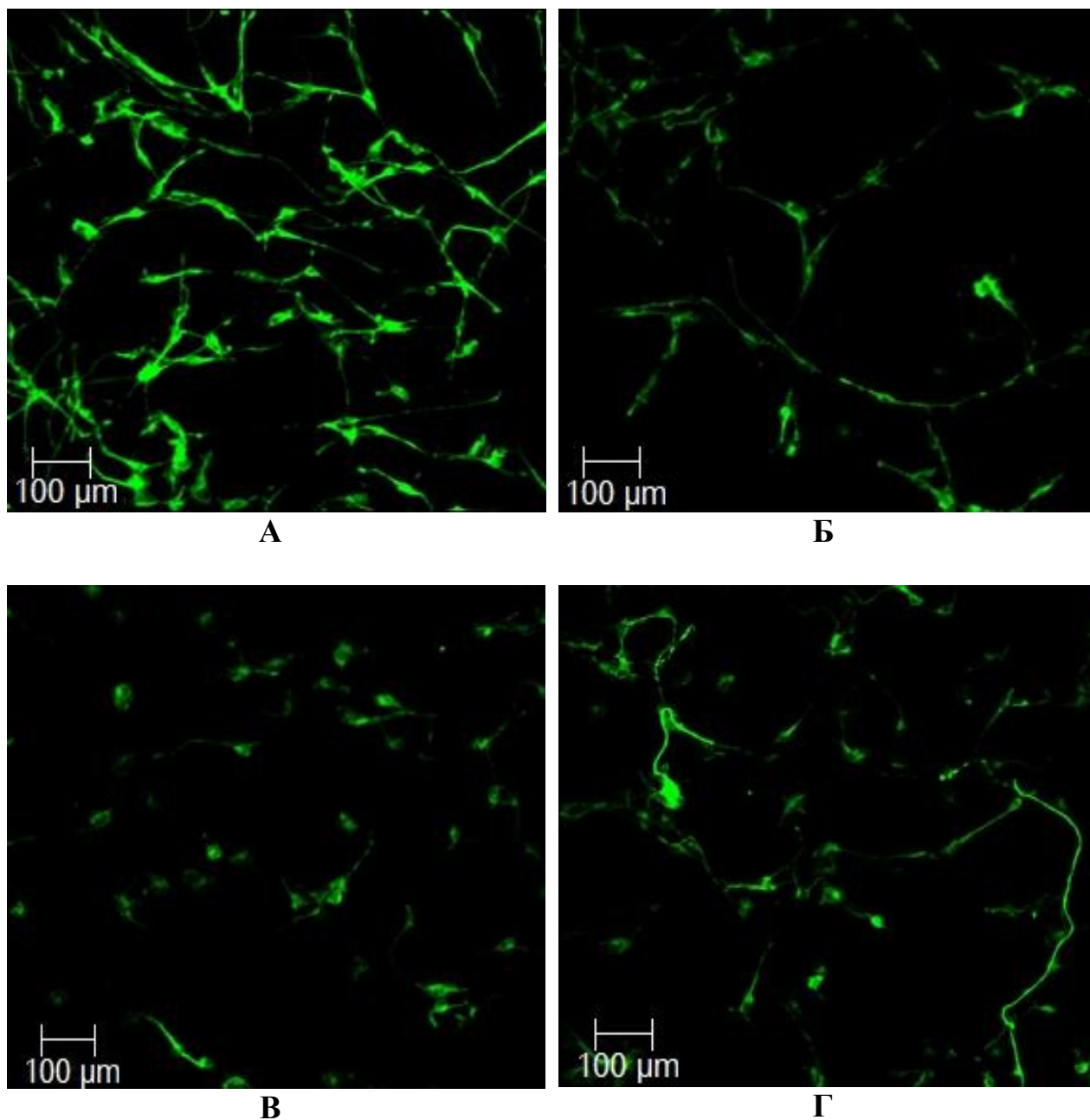


Рис. 4.17. Експресія β -III-тубуліну (зелена флуоресценція) клітинами моношару, який утворився при пересіві МС: А – контрольні МС; Б – кріоконсервування МС із 5% ДМСО; В – кріоконсервування МС із 7,5%

ДМСО; Г – кріоконсервування МС із 10% ДМСО. 14-а доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна мікроскопія.

Таким чином, у ході проведених експериментів ми з'ясували, що після кріоконсервування ККСГ у вигляді МС зберігаються основні імунофенотипові властивості культури та основні стадії її розвитку, які включають прикріплення МС, міграція клітин трьох типів та формування моношару. Однак концентрація ДМСО впливає на деякі етапи розвитку культури. Після кріоконсервування сповільнюється процес міграції клітин з МС, що співпадає з даними, отриманими для МС, які були отримані з клітин надниркових залоз [225].

При використанні 10% ДМСО кріоконсервування ККСГ у вигляді МС призводило до зниження здатності МС до адгезії. Кріоконсервування МС у присутності всіх використаних концентрацій ДМСО, ймовірно, призводило до часткового пошкодження клітин, тому ми спостерігали меншу кількість клітин, схильних до міграції, та уповільнення формування моношару.

Висновки за розділом:

1. Кріоконсервування ККСГ неонатальних поросят у вигляді клітинної суспензії в середовищах, що містили ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, при застосуванні трьохетапного режиму охолодження дозволяє досягти збереженості клітин на рівні (83–87)%, виходу клітин – на рівні (63–78)%, зберігає експресію імунофенотипових маркерів ГС та β -III-туб, проте призводить до уповільнення швидкості формування моношару та зміни співвідношення морфологічних типів клітин.
2. Оптимальною концентрацією ДМСО для кріоконсервування ККСГ, збагаченою на МГ, є 7,5%, оскільки вона дозволяє зберігати відносну кількість цих клітин на рівні 94,5% від контролю.
3. Кріоконсервування ККСГ неонатальних поросят у вигляді МС у середовищах, що містили ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, при

застосуванні трьохетапного режиму охолодження дозволяє зберегти основні морфологічні, імунофенотипові та функціональні властивості МС, однак призводить до зниження здатності МС до адгезії, а клітин у їхньому складі – до міграції та формування моношару.

4. Концентрація ДМСО впливає на тип клітин, який переважно спостерігається в ККСГ після розморожування МС та поміщення їх в умови культивування. Кріоконсервування в кріозахисному середовищі з 5 або 7,5% ДМСО дозволяє отримати культуру, збагачену клітинами типів 1 та 2, а використання 10%-й концентрації ДМСО сприяє збереженню клітин типу 3 та зберігає співвідношення клітинних типів, характерне для контрольної культури.

5. Клітини першого пасажу є більш стійкими до кріоконсервування, ніж первинна ККСГ. Максимальна кількість збережених клітин (90,6%) спостерігається при застосуванні кріозахисного середовища з 7,5% ДМСО.

Публікації за результатами розділу:

1. **Али СГ**, Божок ГА. Кріоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из первичной культуры клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(4):354–364. (Scopus)
2. **Алі СГ**, Моїсєєва НМ, Божок ГА. Кріоконсервування культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(2):158–168. (Scopus)
3. **Ali S**, Bozhok G. Effect of Cryopreservation on Different Passages of Porcine Dorsal Root Ganglion Cell Culture. Recent Advances in Biology and Medicine. 2019. pgs 5.
4. **Алі СГ**. Вплив кріоконсервування на здатність до адгезії мультиклітинних сфероїдів, отриманих зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. Молодь і поступ в біології: матеріали XV–ї Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, м. Львів, Україна, 9–11.04.2019 м. Львів, 2019. с. 86.

5. Али СГ, Божок ГА. Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток, полученной из спинальных ганглиев неонатальных поросят. 4-й Национальный конгресс по регенеративной медицине: Всероссийская науч.-практ. конф. с международным участием, г. Москва, Россия, 20-23.11. 2019 г. Гены и Клетки. Приложение. 2019 (14):21. (Scopus)

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

На теперішній час багато інноваційних підходів у медицині з'являється завдяки дослідженням, зробленим на культурах клітин, оскільки більшість клітин *in vitro* зберігає основні особливості вихідної тканини, включаючи проліферацію, дозрівання та старіння. Клітинні культури вже стали повсякденним інструментом для вивчення фізіології нормальних та пухлинних клітин, скринінгу лікарських препаратів тощо. Тому розробка способів культивування та довгострокового зберігання культур клітин є актуальним завданням.

На сьогоднішній день існує обмежена кількість робіт, в фокусі яких постають СГ неонатального віку, однак саме в них має бути великий пул низькодиференційованих КПНГ з великим потенціалом для відновлення клітин як нейронального, так й гліального типу. Етичні міркування обмежують використання органів людини неонатального віку. Отже, при отриманні культури існує необхідність коректного вибору виду тварини, яка буде найближчою за фізіологічними характеристиками до людини. Широко використовувані у біомедичних експериментах миші та щури мають ряд гістогенетичних, фізіологічних та біохімічних відмінностей від людини. Цих відмінностей набагато більше, ніж між людиною та свинею. Отже, в представлений роботі ми використовували СГ, отримані з неонатальних поросят, оскільки культури клітин з цього виду тварин потенційно є більш прийнятними для вирішення сучасних біомедичних та фармакологічних завдань.

Відомо, що отримання КПНГ із різних органів можливо при використанні 3D-культури, яка сприяє утворенню мультиклітинних сфероїдів (МС) [255]. Однак досі не існує розробок щодо отримання МС в культурі клітин СГ неонатальних поросят, а також не запропоновано режимів їхнього довготривалого зберігання.

Культури клітин зі СГ активно вивчалися, починаючи з середини 20 століття, і досі вони є зручним об'єктом завдяки простоті отримання. Однак в культурі *in vitro* в основному досліджували функціональні властивості сенсорних нейронів, в той час як гліальні клітини залишалися на периферії інтересу широкого кола дослідників.

Виходячи з вищесказаного, представлена дисертаційна робота була присвячена отриманню ККСГ з неонатальних поросят у вигляді моношару або МС, вивченні її основних структурно-функціональних характеристик при культивуванні у 2D- та 3D умовах та встановленню оптимального режиму її кріоконсервування. Відповідно до завдань дисертаційної роботи було зроблено наступне.

На першому етапі було всебічно проаналізовано морфологічні, імунофенотипові та деякі функціональні характеристики ККСГ неонатальних поросят при культивуванні у 2D (моношар) та 3D (МС) умовах. Раніше культури СГ отримували від ембріональних, неонатальних або дорослих мишей і щурів, деяких інших видів тварин (курей, мавп, собак, биків). У представлений роботі нами було вперше отримано культуру клітин зі СГ неонатальних поросят та досліджено її властивості протягом двох пасажів.

Виявилося, що додання сироватки до середовища культивування є вирішальною умовою для отримання ККСГ у вигляді моношару або МС. При цьому, культивування клітин у середовищі з 10% ФТС призводить до формування клітинного моношару, а у безсироватковому середовищі із заміниками В27 або Нейромаксом – до утворення МС. Треба підкреслити, що формування МС у ККСГ неонатальних поросят не потребує використання механічних/фізичних факторів (ротації, електромагнітного поля тощо) або спеціальної підложки/матриці, тобто цей процес відноситься до так званого спонтанного сфероїдоутворення [256].

Процес спонтанного утворення сфероїдів відрізняється від механічного тим, що він є більш вибіркоvim. При дії механічних чинників майже усі клітини культури беруть участь в утворенні сфероїду. При спонтанному

сфероїдоутворенні процес починається тільки з клітин, які можуть вижити без прикріплення, більш того, клітини повинні мати високу здатність до проліферації [256]. Відповідно, спонтанне утворення сфероїдів є не настільки ефективним, як механічне, однак дозволяє ізолювати субпопуляції з властивостями стовбурових/прогеніторних клітин.

Ефективність сфероїдоутворення у наших дослідженнях дійсно була невисокою (7–14 МС/10⁶ посіяних клітин), але здібність клітин їхнього складу до міграції та проліферації була великою (спостерігалось формування конфлуентного моношару після пересіву МС впродовж 10 діб). При цьому домішка Нейромакс забезпечувала більш інтенсивне сфероїдоутворення, ніж В27.

У деяких попередніх роботах також була показана можливість утворення флотуючих МС в культурах СГ або гангліях трійчастого нерву [2, 3, 10, 74]. Однак для цього до складу базового поживного середовища вводили різні комбінації ростових факторів (EGF/FGF, LIF/BMP2/FGF2). У нашій роботі МС утворювалися при культивуванні без спеціальних ростових добавок, що, можливо, свідчить про збереження субпопуляції КПНГ в СГ неонатальних поросят.

Отримані нами результати не узгоджуються з даними робіт [9, 131], оскільки використання схожого культурального середовища, що містить В27, але без факторів FGF і EGF, призводило до формування моношарової культури в результаті культивування клітин СГ щурів, в той час як в нашому дослідженні в аналогічних умовах відбувалося формування флотуючих МС. Можна припустити, що ці розбіжності пов'язані з різними видами тварин, які були джерелом культур. Це ще раз підкреслює видові відмінності, які потрібно враховувати при екстраполяції даних, отриманих на тваринах, на людину.

Морфологічно первинна ККСГ у вигляді моношару складалася з полігональних клітин з вираженими сплюсненими відростками (тип 1), веретеноподібних клітин з двома тонкими відростками (тип 2), великих

фібробластоїдних клітин (тип 3) та тіл ЧН. При цьому клітинні типів 1 та 2 переважали у первинній культурі (близько 40–50 %), а клітини типу 3 та тіла ЧН склали близько 3–5%.

Кількість пасажів впливала на морфологічний тип клітин ККСГ неонатальних поросят. При першому пасажі спостерігалася елімінація тіл ЧН. Обрані нами умови культивування (відсутність NGF та присутність 10% ФТС) сприяли підтриманню в культурі МГ, але не нейронів. У зв'язку з цим, закономірним виглядає результат елімінації ЧН з культури. На другому пасажі спостерігалася експансія фібробластоїдних клітин (типу 3), які становили близько 65% клітин у культурі.

Відомо, що пересів сфероїдів у середовище з ФТС сприяє їхньому прикріпленню і виселенню з них клітин [245]. Таким чином, оцінка сформованого при цьому моношару дозволяє з'ясувати, які типи клітин були присутні у складі МС, а також проаналізувати їх здатність до міграції та проліферації.

Цікаво, що перенесення МС до сироваткового середовища призводило до формування моношару з тих же типів клітин, які були у разі 2D-культивування (клітини типів 1–3). Однак при порівнянні культур 2D- та 3D-форматів спостерігалися розбіжності в кількості клітин різних морфологічних типів: після пересіву МС клітини типу 3 домінували (близько 60%), клітини типу 1 склали близько 8%, типу 2 – 31%. Можливо, це свідчить на користь того, що клітини 3-го типу є менш диференційованими та мають властивості прогеніторних клітин. Однак для з'ясування цього потрібні подальші дослідження.

Тривала підтримка МС у культурі (більше 20 діб) призводила до втрати їхніх морфофункціональних властивостей та деградації. Цей факт свідчить про те, що фактори, необхідні для формування МС у ККСГ, не ідентичні тим, які необхідні для їх підтримки. Цей висновок узгоджується з результатами роботи Ogawa R. та спів. [3], в якій було встановлено зменшення діаметру МС при культивуванні у відсутності ростових факторів,

і збільшення – при комбінації чинників LIF/BMP2/FGF2. Тобто для довготривалого культивування МС з ККСГ, можливо, теж потрібен «коктейль» з ростових факторів, але це є питанням подальших досліджень.

При вивченні імунофенотипу ККСГ було встановлено, що незалежно від способу отримання культури (у вигляді моношару або МС), клітини культури експресують ГС та β -III-тубулін, але не експресують S100. При цьому, експресія ГС спостерігається у клітинах типу 2, що в комплексі з морфологічними характеристиками дозволяє віднести їх до МГ. У клітинах типу 1 спостерігається експресія β -III-тубуліну, що в комплексі з морфологічними характеристиками дозволяє віднести їх до нейронів. Клітини типу 3 експресують ГС та β -III-тубулін, що може свідчити про втрату спеціалізованих властивостей МГ та переходу клітин у менш диференційований, можливо, прогеніторний стан. Для встановлення цього потрібно проводити подальші дослідження з імуноцитохімічного мічення цих клітин маркерами КПНГ HNK-1, Snail, Sox9/10, SMA [257]. З іншого боку, була встановлена морфологічна пластичність МГ при культивуванні в умовах *in vitro*. Показано, що вони можуть мати різну форму: полігональну, веретеноподібну, фібробластоїдну, округлу [8, 32, 127, 129]. Однак незалежно від морфологічних особливостей, вони мають фенотипові ознаки нейроглії, включаючи експресію GFAP і ГС [8, 32, 127]. Таким чином, клітини типів 2 та 3 в отриманій нами ККСГ можуть являти собою спеціалізовані МГ з різними функціями.

В цілому, отримана нами субкультура ККСГ неонатальних поросят при культивуванні в присутності ФТС приблизно на 80% складалася з МГ. Відомо, що МГ здатні швидко розростатися в присутності 10% ФТС. Зниження концентрації ФТС до 1–2% призводить до гальмування проліферації МГ [27]. Результати морфологічного аналізу отриманої нами ККСГ неонатальних поросят підтверджують спостереження, зроблені на культурах клітин СГ від інших видів тварин. У середовищі з 10% ФТС ми

спостерігали активну проліферацію МГ протягом 10 діб. Конфлюентний моношар формувався вже на 5–6 добу, а в подальшому клітини росли в декілька шарів.

На наступному етапі роботи нами було вивчено морфофункціональні особливості ККСГ після кріоконсервування у вигляді суспензії клітин або МС.

Встановлено, що ККСГ неонатальних поросят має досить високу стійкість до пошкоджень факторами кріоконсервування. У використаному повільному режимі охолодження збереженість ККСГ, яку було кріоконсервовано у вигляді суспензії, перебувала в межах від 83 до 87%, а вихід клітин – від 63 до 78%, варіюючи в залежності від концентрації ДМСО. Після кріоконсервування зберігалася експресія клітинами імунофенотипових маркерів ГС та β -III-туб, проте спостерігалось уповільнення швидкості формування моношару та зміна співвідношення морфологічних типів клітин.

При цьому, збереженість особисто МГ, визначених імуноцитохімічно, залежала від використаної концентрації ДМСО. Після кріоконсервування в присутності 5 та 10% ДМСО в культурах спостерігалось зменшення відносної кількості МГ на 33 та 25% відповідно в порівнянні з контролем. У зразках, кріоконсервованих з 7,5% ДМСО, кількість МГ значуще не відрізнялася від контролю (становила 94,5%). Таким чином, якщо при кріоконсервуванні ККСГ клітинною «субпопуляцією інтересу» є МГ, доцільно використовувати ДМСО у концентрації 7,5%.

Клітини першого пасажу ККСГ виявилися більш стійкими до кріоконсервування в порівнянні з первинною культурою. Найкращий результат був досягнутий при кріоконсервуванні клітин першого пасажу в захисному середовищі на основі 7,5% ДМСО. Це дозволило зберегти 90,6% життєздатних клітин після відігрівання.

Спостерігалася зміна співвідношення морфологічних типів клітин в ККСГ, яку заморожували у вигляді суспензії. Клітини типу 3 виявилися найбільш стійкими до кріоконсервування, що може бути обумовлено

морфофункціональними властивостями різних типів клітин, для яких характерною є різна проникність мембрани як для води, так і кріопротектора, а відповідно й різна оптимальна швидкість охолодження. На користь цієї теорії також свідчать результати робіт, в яких показано, що кріоконсервування може надавати селективний вплив на субпопуляційний склад клітин ембріонального мозку [258] або кісткового мозку [259].

Кріоконсервування ККСГ неонатальних поросят у вигляді МС у захисних середовищах, що містили ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, при застосуванні трьохетапного режиму охолодження дозволяло зберегти основні морфологічні, імунофенотипові та функціональні властивості МС, однак призводило до зниження здатності МС до адгезії, а клітин у їхньому складі – до міграції (на 22–25% у порівнянні з контролем) та формування моношару (на 50–65% у порівнянні з контролем).

Це є цілком закономірним, як і в разі кріоконсервування ККСГ у вигляді суспензії. Гальмування ряду клітинних функцій (проліферації, експресії рецепторів, міграції тощо) спостерігається після циклу «замороження-відігрів» [260–262]. Це узгоджується з результатами роботи Terry C et.al., в якій було встановлено, що кріоконсервування призводить до пригнічення молекул клітинної адгезії $\beta 1$ -інтегрину та Е-кадгерину на генному рівні, що супроводжувалось зниженням здатності до адгезії гепатоцитів людини після кріоконсервування [260]. У роботі Cai G et.al. також було показано зниження функцій ендотеліальних клітин пупкової вени, а саме здатності до секреції та адгезії, після кріоконсервування [261]. Подібна тенденція, а саме зниження проліферації клітин, експресії поверхневих маркерів CD44 та CD105 та здатності клітин до секреції, також спостерігалась при кріоконсервуванні суспензії мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини [262].

Кріоконсервування надавало кріоселективний вплив й у разі використання МС. Домінуючий тип клітин, який спостерігався у ККСГ за умов її кріоконсервування у вигляді МС, залежав від концентрації ДМСО.

Кріоконсервування в кріозахисному середовищі з 5 або 7,5% ДМСО дозволяло отримати культуру, збагачену клітинами типів 1 та 2, а використання 10%-й концентрації ДМСО сприяло збереженню клітин типу 3.

Таким чином, використаний режим кріоконсервування у середовищі, що містило ДМСО, при застосуванні трьохетапного режиму охолодження (І етап – зі швидкістю 0,5 °C/хв до –20°C; II етап – зі швидкістю 1 °C/хв до –80°C; III етап – занурення в рідкий азот) виявився прийнятним для кріоконсервування ККСГ як у вигляді суспензії клітин, так й МС. Цей режим забезпечує досить високий рівень збереженості клітин, наявність їх імунофенотипових та функціональних властивостей. Варіації концентрації ДМСО у складі захисного середовища можуть чинити кріоселективний вплив та призводити до вибіркового збереження певного морфологічного типу клітини у ККСГ неонатальних поросят. Встановлений режим може бути рекомендований для використання з метою низькотемпературного зберігання ККСГ для подальшого культивування як у 2D- так й 3D-форматі.

ВИСНОВКИ

Дисертація містить теоретичне обґрунтування й експериментальне рішення задачі отримання культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді моношару (2D-культивування) та мультиклітинних сфероїдів (3D-культивування), а також її довгострокового зберігання шляхом кріоконсервування у вигляді клітинної суспензії та мультиклітинних сфероїдів.

1. Присутність у середовищі культивування ФТС визначає основні властивості культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. У середовищі із 10% ФТС утворюється моношарова культура, в той самий час як у присутності замінників сироватки B27 або Нейромаксу – мультиклітинні сфероїди. При цьому клітинний склад моношару, який формується у процесі культивування в присутності ФТС або після пересіву мультиклітинних сфероїдів, є подібним і містить три основних морфологічних типи клітин: полігональні клітини з вираженими сплосченими відростками (тип 1); веретеноподібні клітини з двома тонкими відростками (тип 2); великі розпластані фібробластоїдні клітини (тип 3).

2. Визначено умови, що впливають на сфероїдоутворення в культурі клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Для отримання мультиклітинних сфероїдів можливо використовувати живильні домішки B27 і Нейромакс, при цьому остання забезпечує більш ефективне сфероїдоутворення. Час перебування в умовах культивування є критичним для збереження морфофункціональних властивостей мультиклітинних сфероїдів: після 20 діб культивування спостерігається руйнування МС і зниження їхньої здатності до адгезії, а також зниження здатності клітин у їхньому складі до міграції та формування моношару.

3. Імунофенотиповий склад клітин культури, незалежно від способу її отримання у вигляді моношару або мультиклітинних сфероїдів, включає клітини, які експресують глутамінсинтетазу і β -III-тубулін, але не експресують S100.

4. Кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді клітинної суспензії в середовищах, що містять ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10% за трьохетапним режимом охолодження дозволяє зберегти життєздатність клітин на рівні 83–87%, вихід клітин на рівні 63–78% від контролю, а також характерні морфологічні типи клітин і експресію імунофенотипових маркерів глутамінсинтетази і β -III-тубуліну. При цьому після розморожування та рекультивування спостерігаються уповільнення формування моношару (від 15 до 55%) і зміна співвідношення морфологічних типів клітин у бік збільшення кількості клітин типу 1.

5. Кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді мультиклітинних сфероїдів у середовищах, які містять ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10% за трьохетапним режимом охолодження дозволяє зберегти здатність МС до адгезії, усі морфологічні типи клітин і експресію глутамінсинтетази і β -III-тубуліну, проте призводить до зниження здатності клітин МС до міграції на 22–25% і швидкості формування моношару на 50–65% в порівнянні з контролем. Окрім цього, після розморожування та рекультивування спостерігається зміна співвідношення морфологічних типів клітин у бік збільшення кількості клітин типу 2.

6. Клітини першого пасажу є більш стійкими до кріоконсервування, ніж первинна культура клітин, отримана зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Кріоконсервування культури клітин на першому пасажі в захисному середовищі з 7,5% ДМСО за трьохетапним режимом охолодження забезпечує збереження клітин на рівні 90,6% від контролю.

7. Культура клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят, отримана під час культивування в присутності 10% ФТС, містить близько 80% мантійних гліоцитів, що було визначено шляхом імуноцитохімічного фарбування з ГС. Кріоконсервування культури клітин у вигляді суспензії в захисному середовищі з 7,5% ДМСО з використанням трьохетапного режиму охолодження дозволяє зберегти відносну кількість МГ на рівні 94,5% від контролю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Melli G, Höke A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discov.* 2009; 4(10):1035–45.DOI: 10.1517/17460440903266829.
2. Singh RP, Cheng YH, Nelson P, Zhou FC. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells. *Cell Transplant.* 2009; 18(1):55–68.DOI: 10.3727/096368909788237177.
3. Ogawa R, Fujita K, Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Biol Open.* 2017; 6(5):602–18. doi: 10.1242/bio.021758.
4. Lo Furno D, Mannino G, Pellitteri R, Zappalà A, Parenti R, Gili E, Vancheri C, Giuffrida R. Conditioned Media From Glial Cells Promote a Neural-Like Connexin Expression in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Front Physiol.* 2018; 9:1742. doi: 10.3389/fphys.2018.01742.
5. Feldman-Goriachnik R, Wu B, Hanani M. Cholinergic responses of satellite glial cells in the superior cervical ganglia. *Neurosci Lett.* 2018; 671:19-24. doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.051.
6. Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, Romero M, Sundberg C, Charles AC, Jasmin L. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist.* 2009; 15(5):450–63.doi: 10.1177/1073858409336094.
7. Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33(6):784–92.doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.12.005.
8. Poulsen JN, Larsen F, Duroux M et al. Primary culture of trigeminal satellite glial cells: a cell-based platform to study morphology and function of peripheral glia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014; 6(1):1–12.

9. Wang XB, Ma W, Luo T, et al. A novel primary culture method for high-purity satellite glial cells derived from rat dorsal root ganglion. *Neural Regen Res.* 2019; 14(2):339–45.doi: 10.4103/1673-5374.244797.
10. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells.* 2007; 25(8):2053–65. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0080.
11. Svenningsen AF, Colman DR, Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors. *Fex Neuron Glia Biol.* 2004; 1(1):85–93.doi: 10.1017/S1740925X04000110.
12. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир. 1983. 263 с.
13. Petrenko YA, Syková E, KubinováŠ. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):94. doi: 10.1186/s13287-017-0558-6.
14. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda).* 2017; 32(4):266–277.doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
15. Byun YS, Tibrewal S, Kim E, Yco L, Sarkar J, Ivanir Y, et al. Keratocytes derived from spheroid culture of corneal stromal cells resemble tissue resident keratocytes. *PLoS One.* 2014; 9(11):e112781. doi: 10.1371/journal.pone.0112781.
16. Li H, Dai Y, Shu J et al. Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *TissueCell.* 2015; 47(1): 39–48.doi: 10.1016/j.tice.2014.10.008.
17. Резніков О.Г. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних та біологічних досліджень на тваринах України. Перший національний конгрес з біоетики. Тези доповідей. – К., 2001. с. 10.

18. Fernandes MR, Pedroso AR. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2017; 63(11):923–28. doi: 10.1590/1806-9282.63.11.923.
19. Петренко АЮ, ПетренкоЮА, Сукач АН, Волкова НА, Скоробогатова НГ, Тарасова АИ, Труфанова НА, Мазур СП. Криоконсервирование стволовых/прогениторных клеток фетальных тканей. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2012. С295–336;
20. Труфанова НА, Петренко АЮ. Влияние криоконсервирования на жизнеспособность, иммунофенотип и дифференцировочные свойства мезенхимальных стромальных клеток ранних стадий органогенеза. *Проблемы криобиологии*, 2010; 20(2):135–144.
21. Yang J, Gao L, Liu M. et al. Advanced Biotechnology for Cell Cryopreservation. *Trans. Tianjin Univ.* 2019. DOI: 10.1007/s12209-019-00227-6.
22. Schwarz S, Spitzbarth I, Baumgärtner W, Lehmbecker A. Cryopreservation of canine primary dorsal root ganglion neurons and its impact upon susceptibility to paramyxovirus infection. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(5):1058; doi:10.3390/ijms20051058.
23. Kawamoto JC, Barrett JN. Cryopreservation of primary neurons for tissue culture. *Brain Res.* 1986; 384(1):84–93. DOI: 10.1016/0006-8993(86)91222-9.
24. Humphray SJ, Scott CE, Retal C. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biology*. 2007; 8(7), R139. DOI: 10.1186/gb-2007-8-7-r139.
25. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabrià J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin. Appl.* 2014; 8(9):715–31. DOI: 10.1002/prca.201300099.
26. Mudge AW. Effect of non-neuronal cells on peptide content of cultured sensory neurones. *J Exp Biol.* 1981;95:195–203.
27. de Luca AC, Faroni A, Reid AJ. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study

peripheral nerve regeneration. *J Vis Exp*. 2015;96: e52543. [Cited 28.07.2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354675/>.doi: 10.3791/52543.

28. Huang T, Cherkas P, Rosenthal D. Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 1036(1–2):42–9. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.12.021.

29. Gerhauser I, Hahn K, Baumgärtner W, Wewetzer K. Culturing adult canine sensory neurons to optimise neural repair. *Vet Rec*. 2012;170(4):102. DOI: 10.1136/vr.100255.

30. Morgan BR, Coates JR, Johnson GC, et al. Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy, a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 2014;92(4):531–41. doi: 10.1002/jnr.23332.

31. Fadda A, Bärtschi M, Hemphill A, Widmer HR, Zurbriggen A, Perona P, Vidondo B, Oevermann A. Primary postnatal dorsal root ganglion culture from conventionally slaughtered calves. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168228. doi: 10.1371/journal.pone.0168228.

32. Tongtako W, Lehmbecker A, Wang Y, Hahn K, Baumgärtner W, Gerhauser I. Canine dorsal root ganglia satellite glial cells represent an exceptional cell population with astrocytic and oligodendrocytic properties. *Sci Rep*. 2017;7(1):13915. doi: 10.1038/s41598-017-14246-7.

33. Али СГ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Серія «Біологія»*. 2018; (30):49–59. doi:10.26565/2075-5457-2018-30-6.

34. Али СГ, Божок ГА. Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из первичной культуры клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2019; 29(4):354–364. doi:10.15407/cryo29.04.354 (Scopus)

35. Алі СГ, Моїсєєва НМ, Божок ГА. Кріоконсервування культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30(2):158–168. doi: 10.15407/cryo30.02.158 (Scopus)

36. Али СГ, Коваленко ИФ, Божок ГА. Некоторые фенотипические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 3(152):46–50. doi:10.29254/2077-4214-2019-3-152-46-50.

37. Ali S, BozhokG. Effect of Cryopreservation on Different Passages of Porcine Dorsal Root Ganglion Cell Culture. Recent Advances in Biology and Medicine. 2019. pgs 5. doi:10.18639/RABM.2019.941755.

38. Али СГ, Лаврик АА, Божок ГА. Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 40-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 23–24.05.2016 г. Харків, 2016. с. 29.

39. Али СГ. Влияние условий культивирования на некоторые морфофункциональные характеристики первичных культур клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Научные исследования и разработки 2018 года: материалы Международной научно–практической конференции, г. Москва, Россия, 15–31.10.2018 г. Москва, 2018. с. 303–7.

40. Али СГ, Божок ГА. Экспрессия нейрональных маркеров в культуре клеток, полученной из нативных и криоконсервированных мультиклеточных сфероидов из спинальных ганглиев неонатальных поросят. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 43-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 27–29.05.2019 г. Харків, 2019. с. 27.

41. Алі СГ. Вплив кріоконсервування на здатність до адгезії мультиклітинних сфероїдів, отриманих зі спінальних гангліїв неонатальних

свиней. Молодь і поступ в біології: матеріали XV-ї Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, м. Львів, Україна, 9–11.04.2019 м. Львів, 2019. с. 86.

42. Алі СГ, Божок ГА. Експресія нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18–21.2019 Yaremche, 2019. p. 163.

43. Али СГ, Божок ГА. Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток, полученной из спинальных ганглиев неонатальных поросят. 4-й Национальный конгресс по регенеративной медицине: материалы Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием (г. Москва, 20–23 ноября 2019 г.). Гены и Клетки. Приложение. 2019; (14):21. (Scopus)

44. Shakhova O, Sommer L. Neural crest-derived stem cells. StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 doi: 10.3824/stembook.1.51.1.

45. Graham A. The neural crest. *Current Biology*. 2003; 13(10):381–4. doi:10.1016/S0960-9822(03)00315-4.

46. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y. et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(4):392-403. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.005.

47. Kim SU, Nakagawa E, Hatori K. et al. Production of immortalized human neural crest stem cells. *Methods Mol Biol*. 2002; 198:55–65. doi: 10.1385/1-59259-186-8:055.

48. Teng L, Labosky PA. Neural crest stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 589:206–12. doi: 10.1007/978-0-387-46954-6_13.

49. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem

cell in the mammalian heart. *J Cell Biol.* 2005 26; 170(7):1135–46. DOI: 10.1083/jcb.200504061.

50. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N. et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells.* 2006; 24(12):2714–22. doi: 10.1634/stemcells.2006-0156.

51. le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E. The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle.* 2008; 7(8):1013–19. DOI: 10.4161/cc.7.8.5641.

52. Krispin S, Nitzan E, Kassem Y, Kalcheim C. Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. *Development.* 2010; 137(4):585–95. doi: 10.1242/dev.041509.

53. McKinney MC, Fukatsu K, Morrison J, McLennan R, Bronner ME, Kulesa PM. Evidence for dynamic rearrangements but lack of fate or position restrictions in premigratory avian trunk neural crest. *Development.* 2013; 140(4):820–30. doi: 10.1242/dev.083725.

54. Bronner-Fraser M, Fraser S. Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ. *Neuron.* 1989; 3(6):755–66. DOI: 10.1016/0896-6273(89)90244-4.

55. Frank E, Sanes JR. Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis in vivo with a recombinant retrovirus. *Development.* 1991;111(4):895–908.

56. Baroffio A, Dupin E, Le Douarin NM. Common precursors for neural and mesectodermal derivatives in the cephalic neural crest. *Development.* 1991;112(1):301–5.

57. Sieber-Blum M, Cohen AM. Clonal analysis of quail neural crest cells: they are pluripotent and differentiate in vitro in the absence of noncrest cells. *DevBiol.* 1980;80(1):96–106. DOI: 10.1016/0012-1606(80)90501-1.

58. Сосунов АА. Нервный гребень и его нейральные производные. *Соросовский образовательный журнал.* 1999; 5:14–21.

59. Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development.* 2013; 140(11):2247–51; doi: 10.1242/dev.091751.

60. Kelsh RN, Harris ML, Colanesi S, Erickson CA. Stripes and belly-spots – a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009;20(1):90-104. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.10.001
61. Kuo BR, Erickson CA. Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adh. Migr.* 2010; 4(4):567–85. DOI: 10.4161/cam.4.4.12890.
62. Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 115 (3rd series) *Peripheral Nerve Disorders* Said G and Krarup C.
63. Le Douarin NM, Dupin E. Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(5):529–36. DOI: 10.1016/j.gde.2003.08.002
64. Duband JL. Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell Adh. Migr.* 2010; 4(3):458–82. doi: 10.4161/cam.4.3.12501.
65. Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev. Biol.* 2012; 366(1):34-54. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.041.
66. Perris R, Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* 2000; 95(1), 3-21. DOI: 10.1016/s0925-4773(00)00365-8.
67. Alfandari D, Cousin H, Marsden M. Mechanism of *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Cell Adh. Migr.* 2010; 4(4):553-60. DOI: 10.4161/cam.4.4.12202.
68. Kirby ML, Hutson MR. Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell Adh. Migr.* 2010; 4(4), 609–21. DOI: 10.4161/cam.4.4.13489.
69. Kulesa PM, Bailey CM, Kasemeier-Kulesa JC, McLennan R. Cranial neural crest migration: new rules for an old road. *Dev. Biol.* 2010; 344(2):543–54. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.010.
70. Kuriyama S, Mayor R. Molecular analysis of neural crest migration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363 (1495):1349–62. doi: 10.1098/rstb.2007.2252.

71. Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. The enteric nervous system. *Dev. Biol.* 2012; 366(1):64–73. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.012.
72. Lawson SN. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons, in: A.S. Scott (Ed.), *Sensory Neurons, Diversity, Development and Plasticity*, Oxford University Press, New York, 1992, 27– 59.
73. Ciaroni S, Cecchini T, Cuppini R, Ferri P, Ambrogini P, Bruno C, Del Grande P. Are there proliferating neuronal precursors in adult rat dorsal root ganglia? *Neurosci Lett.* 2000; 281(1):69–71. DOI: 10.1016/s0304-3940(00)00785-0.
74. Lagares A, Li HY, Zhou XF, Avendano C. Primary sensory neuron addition in the adult rat trigeminal ganglion: Evidence for neural crest glioneuronal precursor maturation. *J Neurosci.* 2007; 27(30):7939–53. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1203-07.2007.
75. Farel PB. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;144(1):91–98. doi: 10.1016/s0165-3806(03)00163-9.
76. George D, Ahrens P, Lambert S. Satellite glial cells represent a population of developmentally arrested Schwann cells. *Glia.* 2018; 66(7):1496–1506. doi: 10.1002/glia.23320.
77. Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci.* 2004;7(9):930–8. DOI: 10.1038/nn1299.
78. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005; 48(3), 457–476. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.09.001.
79. Gu Y, Chen Y, Zhang X, Li GW, Wang C and Huang LY. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. *Neuron Glia Biol.* 2010; 6(1): 53–62. doi: 10.1017/S1740925X10000116.

80. Hanani M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain Res Rev.* 2010; 64(2): 304–27. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.04.009.
81. Pannese E. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 1981; 65:1–111. DOI: 10.1007/978-3-642-67750-2.
82. Jager SB, Pallesen LT, Vaegter CB. Isolation of satellite glial cells for high-quality RNA purification *Journal of Neuroscience Methods.* 2018; 297:1–8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.01.001.
83. Pannese E, Ledda M, Arcidiacono G, Rigamonti L. Clusters of nerve cells bodies enclosed within a common connective tissue envelope in the spinal ganglia of the lizard and rat. *Cell Tissue Res.* 1991; 264(2):209–14. doi: 10.1007/bf00313957.
84. Fornaro M, Sharthiya H, Tiwari V. Adult mouse DRG explant and dissociated cell models to investigate neuroplasticity and responses to environmental insults including viral infection. *J Vis Exp.* 2018; 133. doi: 10.3791/56757.
85. Yamakita S, Horii Y, Takemura H, Matsuoka Y, Yamashita A, Yamaguchi Y, Matsuda M, Sawa T, Amaya F. Synergistic activation of ERK1/2 between A-fiber neurons and glial cells in the DRG contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. *Mol Pain.* 2018;14:1744806918767508. doi: 10.1177/1744806918767508.
86. Retamal MA, Riquelme MA, Stehberg J, Alcayaga J. Connexin43 hemichannels in satellite glial cells, can they influence sensory neuron activity? *Front Mol Neurosci.* 2017;10:374. doi: 10.3389/fnmol.2017.00374.
87. Spray DC, Hanani M. Gap junctions, pannexins and pain. *Neurosci Lett.* 2019; 695:46–52. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.035.
88. Komiya H, Shimizu K, Noma N, Tsuboi Y, Honda K, Kanno K, Ohara K, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K. Role of neuron-glial interaction mediated by IL-1 β in ectopic tooth pain. *J Dent Res.* 2018;97(4):467–75. doi: 10.1177/0022034517741253.

89. Suadicanì SO, Cherkas PS, Zuckerman J, Smith DN, Spray DC, Hanani M. Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia. *Neuron Glia Biology*. 2010;6(1):43–51. doi: 10.1017/S1740925X09990408.
90. Goto T, Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A. Neuropeptides and ATP signaling in the trigeminal ganglion. *Jpn Dent Sci Rev*. 2017; 53(4):117–124. doi: 10.1016/j.jdsr.2017.01.003.
91. Yi Z, Xie L, Zhou C, Yuan H, Ouyang S, Fang Z, Zhao S, Jia T, Zou L, Wang S, Xue Y, Wu B, Gao Y, Li G, Liu S, Xu H, Xu C, Zhang C, Liang S. P2Y₁₂ receptor upregulation in satellite glial cells is involved in neuropathic pain induced by HIV glycoprotein 120 and 2',3'-dideoxycytidine. *Purinergic Signal*. 2018;14(1):47–58. doi: 10.1007/s11302-017-9594-z.
92. Ledda M, De Palo S, Pannese E. Ratios between number of neuroglial cells and number and volume of nerve cells in the spinal ganglia of two species of reptiles and three species of mammals. *Tissue Cell*. 2004;36(1):55–62. doi: 10.1016/j.tice.2003.09.001.
93. Ohara TP, Vit JP, Bhargava A, Jasmin L. Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *Journal of Neurophysiology*. 2008;100(6):3064–73. doi: 10.1152/jn.90722.2008.
94. Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, Bubb V, Quinn JP, Thippeswamy T. Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2007; 32(2):97–107. doi: 10.1007/s12031-007-0014-7.
95. Czaja K, Burns G.A, Ritter R.C. Capsaicin-induced neuronal death and proliferation of the primary sensory neurons located in the nodose ganglia of adult rats. *Neuroscience*. 2008;154(2):621–30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.055.
96. Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P and Dello Russo C. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal

sensitization: relevance for migraine pathology. *Mol Pain*.2009; 5: 43. doi: 10.1186/1744-8069-5-43.

97. Hanani M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: implications for chronic pain. *Brain Res*. 2012; 1487:183–91. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.070.

98. Warwick RA, Hanani M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain*.2013; 17(4): 571–80doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00219.x.

99. Elson K, Simmons A, Speck P. Satellite cell proliferation in murine sensory ganglia in response to scarification of the skin. *Glia*. 2004; 45(1): 105–9. doi: 10.1002/glia.10294.

100. Humbertson AJr, Zimmermann E., Leedy M. A chronological study of mitotic activity in satellite cell hyperplasia associated with chromatolytic neurons. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat*. 1969;100(4):507–15. doi: 10.1007/bf00344371.

101. Hanani M, Huang TY, Cherkas PS, Ledda M, Pannese E. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience*. 2002; 114(2): 279–83. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00279-8.

102. Vit JP, Jasmin L, Bhargava A, Ohara PT. Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neuron Glia Biol*. 2006;2(4): 247–57. doi: 10.1017/s1740925x07000427.

103. Donegan M, Kernisant M, Cua C, Jasmin L, Ohara PT. Satellite glial cell proliferation in the trigeminal ganglia after chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *Glia*. 2013; 61(12): 2000–8.doi: 10.1002/glia.22571.

104. Hanani M, Blum E, Liu S, Peng L, Liang S. Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. *J. Cell. Mol. Med*. 2014; 18(12), 2367–71. doi: 10.1111/jcmm.12406.

105. Liu S, Zou L, Xie J, Xie W, Wen S, Xie Q, Gao Y, Li G, Zhang C, Xu C, Xu H, Wu B, Lv Q, Zhang X, Wang S, Xue Y, Liang S. LncRNA NONRATT021972 siRNA regulates neuropathic pain behaviors in type 2 diabetic

rats through the P2X7 receptor in dorsal root ganglia. *Mol. Brain*. 2016; 9:44. doi: 10.1186/s13041-016-0226-2.

106. Rahman MH, Jha MK, Kim JH, Nam Y, Lee MG, Go Y, Harris RA, Park DH, Kook H, Lee IK, Suk K. Pyruvate dehydrogenase kinase-mediated glycolytic metabolic shift in the dorsal root ganglion drives painful diabetic neuropathy. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(11):6011–25. doi: 10.1074/jbc.M115.699215.

107. Warwick RA, Hanani M. Involvement of aberrant calcium signalling in herpetic neuralgia. *Exp. Neurol.* 2016; 277, 10–18. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.12.002.

108. Nascimento DS, Castro-Lopes JM, Moreira Neto FL. Satellite glial cells surrounding primary afferent neurons are activated and proliferate during monoarthritis in rats: is there a role for ATF3? *PLoS One*. 2014; 9(9), e108152. doi: 10.1371/journal.pone.0108152.

109. Blum E, Procacci P, Conte V, Sartori P, Hanani M. Long term effects of lipopolysaccharide on satellite glial cells in mouse dorsal root ganglia. *Exp. Cell Res.* 2017; 350(1), 236–41. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.11.026.

110. Zhang H, Mei X, Zhang P, Ma C, White FA, et al. Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. *Glia*. 2009; 57(15): 1588–99. doi: 10.1002/glia.20872.

111. Gunjigake KK, Goto T, Nakao K, Kobayashi S, Yamaguchi K (2009) Activation of satellite glial cells in rat trigeminal ganglion after upper molar extraction. *Acta Histochem Cytochem.* 2009; 42(5):143–9. doi: 10.1267/ahc.09017

112. Nascimento RS, Santiago MF, Marques SA, Allodi S, Martinez AM. Diversity among satellite glial cells in dorsal root ganglia of the rat. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(11):1011-7. DOI: 10.1590/s0100-879x2008005000051.

113. Siemionow K, Weinstein JN, McLain RF. Support and satellite cells within the rabbit dorsal root ganglion: ultrastructure of a perineuronal support cell. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006; 31(17):1882–7. doi:10.1097/01.brs.0000228721.18242.42.

114. Flipa A, Fani L. Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2015; 65(1):73–81. doi: 10.1016/j.bjan.2013.07.013.
115. Miller KE, Richards BA, Kriebel RM., Glutamine-, glutaminyl synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve, *Brain Res.* 2002; 945(2):202–11. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)02802-0.
116. Zhu G, Chen Z, Dai B, Zheng C, Jiang H, Xu Y, Sheng X, Guo J, Dan Y, Liang S, Li G. Chronic lead exposure enhances the sympathoexcitatory response associated with P2X4 receptor in rat stellate ganglia. *Environ Toxicol.* 2018;33(6):631–39. doi: 10.1002/tox.22547.
117. Kolos EA, Korzhevskii DE. Glutamine Synthetase-Containing Cells of the Dorsal Root Ganglion at Different Stages of Rat Ontogeny. *Russian Journal of Developmental Biology.* 2018; 49(3), 179–83. doi:10.1134/s1062360418030049.
118. Liu FY, Sun YN, Wang FT, Li Q, Su L, Zhao ZF, Meng XL, Zhao H, Wu X, Sun Q, Xing GG, Wan Y. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Res.* 2012;1427:65–77. doi: 10.1016/j.brainres.2011.10.016.
119. Kalous A, Nangle MR, Anastasia A, Hempstead BL, Keast JR. Neurotrophic actions initiated by proNGF in adult sensory neurons may require peri-somatic glia to drive local cleavage to NGF. *J Neurochem.* 2012;122:523–536. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07799.x.
120. Hu P, McLachlan EM. Distinct sprouting responses of sympathetic and peptidergic sensory axons proximal to a sciatic nerve transection in guinea pigs and rats. *Neuroscience letters.* 2000;295:59–63. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01583-4.
121. Liu H, Zhao L, Gu W, Liu Q, Gao Z, Zhu X, Wu Z, He H, Huang F, Fan W. Activation of satellite glial cells in trigeminal ganglion following dental injury and inflammation. *J Mol Histol.* 2018;49(3):257–263. doi: 10.1007/s10735-018-9765-4.

122. Li HY, Zhou XF. Potential conversion of adult clavicle-derived chondrocytes into neural lineage cells in vitro. *J Cell Physiol.* 2008; 214(3):630–44. DOI: 10.1002/jcp.21251.
123. Piñero G, Usach V, Soto PA, Monje PV, Setton-Avruj P. EGFP transgene: a useful tool to track transplanted bone marrow mononuclear cell contribution to peripheral remyelination. *Transgenic Res.* 2018; 27(2):135–153. doi: 10.1007/s11248-018-0062-5.
124. Cavanaugh MW. Neuron development from trypsin-dissociated cells of differentiated spinal cord of the chick embryo. *Exp. Cell Res.* 1955; 9(1):42–8. DOI: 10.1016/0014-4827(55)90159-2.
125. Walker TL, Kempermann G. One mouse, two cultures: isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. *J Vis Exp.* 2014; (84): e51225. doi: 10.3791/51225.
126. Bondarenko TP, Legach EI, Kiroshka VV, et al. [Cultivation, cryopreservation and transplantation of the tissue of the endocrine glands]. In: Goltsev AN, editor. *Actual problems of cryobiology and cryomedicine.* Kharkov: IPC&C NASU; 2012. p. 361–401. Russian.
127. Backström E, Chambers BJ, Kristensson K, Ljunggren HG. Direct NK cell-mediated lysis of syngenic dorsal root ganglia neurons in vitro. *J Immunol.* 2000; 165(9):4895–900. DOI: 10.4049/jimmunol.165.9.4895.
128. Meller K. The reaggregation of neurons and their satellite cells in cultures of trypsin-dissociated spinal ganglia. *Cell Tiss. Res.* 1974; 152(2), 175–83. DOI: 10.1007/bf00224693.
129. Belzer V, Shraer N, Hanani M. Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia. *Neuron Glia Biology.* 2010;6(4):237–43. doi: 10.1017/S1740925X1100007X.
130. Laursen JC, Cairns BE, Dong XD, Kumar U, Somvanshi RK, Arendt-Nielsen L, Gazerani P. Glutamate dysregulation in the trigeminal ganglion: a novel mechanism for peripheral sensitization of the craniofacial region. *Neuroscience.* 2014;256:23–35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.009.

131. Castillo C, Norcini M, Martin Hernandez LA, Correa G, Blanck TJ, Recio-Pinto E. Satellite glia cells in dorsal root ganglia express functional NMDA receptors. *Neuroscience*. 2013; 240: 135–46. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.02.031.
132. Bottenstein JE, Sato GH. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76(1):514–7. DOI: 10.1073/pnas.76.1.514.
133. Webster H, Astrom KE. Gliogenesis: historical perspectives, 1839–1985. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2009; 202:1–109. doi: 10.1007/978-3-540-87534-5_1.
134. Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 2010;468(7321):214–22. doi: 10.1038/nature09611.
135. de Vries GH, Boullerne AI. Glial cell lines: an overview. *Neurochemical research*. 2010;35(12):1978–2000. doi: 10.1007/s11064-010-0318-9.
136. Ulrich R, Imbschweiler I, Kalkuhl A, Lehmbecker A, Ziege S, Kegler K, Becker K, Deschl U, Wewetzer K, Baumgärtner W. Transcriptional profiling predicts overwhelming homology of Schwann cells, olfactory ensheathing cells, and Schwann cell-like glia. *Glia*. 2014;62(10):1559–81. doi: 10.1002/glia.22700.
137. Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F. Development and homeostasis of “resident” myeloid cells: the case of the microglia. *Glia*. 2013;61(1):112–20. doi: 10.1002/glia.22393.
138. Prinz M, Tay TL, Wolf Y, Jung S. Microglia: unique and common features with other tissue macrophages. *Acta neuropathologica*. 2014;128(3):319–31. doi: 10.1007/s00401-014-1267-1.
139. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol. Ther.* 2012;12(10):1347–60. doi: 10.1517/14712598.2012.707181.

140. Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.* 1952;86(3):287–301.
141. Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK, Hu W-S. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Exp. Cell Res.* 2002; 274(1):56–67. doi: 10.1006/excr.2001.5467.
142. Kelm JM, Djonov V, Ittner LM, Fluri D, Born W, Hoerstrup SP, Fussenegger M. Design of custom-shaped vascularized tissues using microtissue spheroids as minimal building units. *Tissue Eng.* 2006; 12(8), 2151–60. doi: 10.1089/ten.2006.12.2151.
143. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface.* 2017; 14(127):20160877. doi: 10.1098/rsif.2016.0877.
144. Сукач АН, Иванов ЭН. Образование сферических колоний как свойство стволовых клеток. *Цитология.* 2007;49(11):916–22.
145. Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RF, Pagano SF, Parati EA. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.* 2003;993(1-2):18–29.DOI: 10.1016/j.brainres.2003.08.061.
146. Jessberger S, Clemenson GD, Gage FH. Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells. *Stem Cells.* 2007;25(4):871–4. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0620.
147. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 1992;12(11):4565–74.
148. Lee BH, Kim MH, Lee JH, Seliktar D, Cho N-J, Tan LP. 2015. Modulation of Huh7.5 spheroid formation and functionality using modified peg-based hydrogels of different stiffness. *PLoS One.* 2015; 10(2):e0118123. doi: 10.1371/journal.pone.0118123.

149. Lin R-Z, Chou L-F, Chien C-CM, Chang H-Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin. *Cell Tissue Res.* 2006;324(3):411–22. DOI: 10.1007/s00441-005-0148-2.
150. Tzanakakis ES, Hansen LK, Hu W-S. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2001; 48(3):175–89. DOI: 10.1002/1097-0169(200103)48:3<175:AID-CM1007>3.0.CO;2-2.
151. Curcio E., Salerno S, Barbieri G et.al. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultures in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials.* 2007, 28(36):5287-97. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Molecular Cell Biology.* 2006; 7:211-24.
152. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in 3-D-multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology.* 2008, 3:1172-84.
153. Azari H, Sharififar S, Rahman M, et al. Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. *J Vis Exp.* 2011; 47:2457. doi: 10.3791/2457.
154. Ladiwala U, Basu H, Mathur D. Assembling neurospheres: dynamics of neural progenitor/stem cell aggregation probed using an optical trap. *PLoS One.* 2012; 7(6):e38613. doi: 10.1371/journal.pone.0038613.
155. Diensthuber M, Zecha V, Wagenblast J, Arnhold S, Edge A, Stöver T. Spiral ganglion stem cells can be propagated and differentiated into neurons and glia. *Biores Open Access.* 2014; 3(3): 88–97. doi: 10.1089/biores.2014.0016.
156. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A. 2007. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials.* 2007; 28(36):5487–97. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.033.
157. Mueller-Klieser W. Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophys. J.* 1984;46(3):343–8. DOI: 10.1016/S0006-3495(84)84030-8.

158. Alvarez-Pérez J, Ballesteros P, Cerdán S. Microscopic images of intraspheroidal pH by ¹H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* 2005; 18(6), 293–301. DOI: 10.1007/s10334-005-0013-z.
159. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*. 2009;30(12):2164–74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.084.
160. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen.* 2006; 11(8):922–32. DOI: 10.1177/1087057106292763.
161. Ma HL, Jiang Q, Han S, Wu Y, Cui Tomshine J, Wang D, Gan Y, Zou G, Liang XJ. Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol. Imaging*. 2012; 11(6), 487–98.
162. Cui X, Dini S, Dai S, Bi J, Binder BJ, Green JEF, Zhang H. A mechanistic study on tumour spheroid formation in thermosensitive hydrogels: experiments and mathematical modelling. *RSC Adv.* 2016; 6, 73282–91. DOI: 10.1039/C6RA11699J.
163. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1977;37(10):3639–43.
164. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 83(2):173–80. DOI: 10.1002/bit.10655.
165. Oliveira MB, Neto AI, Correia CR, Rial-Hermida MI, Alvarez-Lorenzo C, Mano JF. Superhydrophobic chips for cell spheroids high-throughput generation and drug screening. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014; 6(12):9488–95. doi: 10.1021/am5018607.

166. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in cancer biology*. *Semin Cancer Biol*. 2005; 15(5):365–77. DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.05.002.
167. Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol. Related Stud. Phys. Chem. Med*. 1970; 18(5):491–5. DOI: 10.1080/09553007014551401.
168. Ingram M, Techy GB, Saroufeem R, Yazan O, Narayan KS, Goodwin TJ, Spaulding GF. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim*. 1997; 33(6):459–66. DOI: 10.1007/s11626-997-0064-8.
169. Alhasan L, Qi A, Al-Abboodi A, Rezk A, Chan PPY, Iliescu C, Yeo LY. Rapid enhancement of cellular spheroid assembly by acoustically driven microcentrifugation. *ACS Biomater. Sci. Eng*. 2016; 2(6):1013–22. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00144.
170. Ino K, Ito A, Honda H. Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol. Bioeng*. 2007; 97(5):1309–17. DOI: 10.1002/bit.21322.
171. Bae JE, Huh MI, Ryu BK, Do JY, Jin SU, Moon MJ, Jung JC, Chang Y, Kim E, Chi SG, Lee GH, Chae KS. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2011; 32(35):9401–14. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.075.
172. Sebastian A, Buckle A-M, Marx GH. Formation of multilayer aggregates of mammalian cells by dielectrophoresis. *J. Micromech. Microeng*. 2006; 16:1769–77. DOI: 10.1088/0960-1317/16/9/003.
173. Sebastian A, Buckle AM, Marx GH. Tissue engineering with electric fields: Immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnol. Bioeng*. 2007; 98(3):694–700. DOI: 10.1002/bit.21416.

174. Chen K, Wu M, Guo F, Li P, Chan CY, Mao Z, Li S, Ren L, Zhang R, Huang TJ. Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab. Chip.* 2016; 16(14):2636–43. doi: 10.1039/c6lc00444j.
175. Amano S, Yamagami S, Mimura T, Uchida S, Yokoo S. Corneal stromal and endothelial cell precursors. *Cornea.* 2006; 25(10 Suppl 1):73–7. DOI: 10.1097/01.ico.0000247218.10672.7e.
176. Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Denef C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology.* 2005; 146(9):3985–98. DOI: 10.1210/en.2005-0185.
177. Sanie-Jahromi F, Ahmadi H, Soheili ZS, Davari M, Ghaderi S, Kanavi MR, Samiei S, Deezagi A, Pakravesh J, Bagheri A. Enhanced generation of retinal progenitor cells from human retinal pigment epithelial cells induced by amniotic fluid. *BMC Res Notes.* 2012; 5:182. doi: 10.1186/1756-0500-5-182.
178. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, Stadel D, Braubach P, Debatin KM, Beltinger C. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS One.* 2013; 8(5):e64454. doi: 10.1371/journal.pone.0064454. Print 2013.
179. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 2005; 23(6):727–37. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0134.
180. Kim TH, Choi JH, Jun Y, Lim SM, Park S, Paek JY, Lee SH, Hwang JY, Kim GJ. 3D-cultured human placenta-derived mesenchymal stem cell spheroids enhance ovary function by inducing folliculogenesis. *Sci Rep.* 2018; 8(1):15313. doi: 10.1038/s41598-018-33575-9.
181. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroidbased drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 2009; 4(3):309–24. doi: 10.1038/nprot.2008.226.
182. Su GH. *Pancreatic cancer: Methods and protocols.* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2005. – 352 p.

183. Dagalakis N, Flink J, Stasikelis P, Burke J, Yannas I. Design of an artificial skin. III. Control of pore structure. *J. Biomed. Mater. Res. J Biomed Mater Res.* 1980; 14(4):511–28. DOI: 10.1002/jbm.820140417.
184. Liu J, Tan Y, Zhang H, Zhang Y, Xu P, Chen J, Poh YC, Tang K, Wang N, Huang B. Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nat. Mater.* 2012; 11(8):734–41. doi: 10.1038/nmat3361.
185. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 2016; 163:94–108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
186. Gu J, Zhao Y, Guan Y, Zhang Y. Effect of particle size in a colloidal hydrogel scaffold for 3D cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015; 136:1139–47. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.021.
187. Ruedinger F, Lavrentieva A, Blume C, Pepelanova I, Scheper T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(2):623–36. doi: 10.1007/s00253-014-6253-y.
188. Gao D, Liu H, Jiang Y, Lin J-M. Recent developments in microfluidic devices for in vitro cell culture for cell-biology research. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2012; 35, 150–64. doi: 10.1016/j.trac.2012.02.008.
189. Wang Y, Wang J. Mixed hydrogel bead-based tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *Analyst.* 2014; 139(10):2449–58. doi: 10.1039/c4an00015c.
190. Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, Ramírez M, García-Belda P, García-Verdugo JM. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken).* 2013; 296(9):1435–52. doi: 10.1002/ar.22746.
191. Кувачева НВ, Моргун АВ, Комлева ЮК и др. Влияние обогащенной среды на ранние этапы развития прогениторных клеток головного мозга у молодых и стареющих крыс. *Сибирский медицинский журнал.* 2013;5:47–51.

192. Сукач АН, Ляшенко ТД. Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования. Проблемы криобиологии. 2011; 21(4):395–405.
193. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci*. 1996; 16(8):2649–58.
194. Dayer AG, Jenny B, Sauvain MO, Potter G, Salmon P, Zraggen E, Kanemitsu M, Gascon E, Sizonenko S, Trono D, Kiss JZ. Expression of FGF-2 in neural progenitor cells enhances their potential for cellular brain repair in the rodent cortex. *Brain*. 2007; 130(Pt 11):2962–76. DOI: 10.1093/brain/awm200.
195. Сукач АН. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом. *Цитология*. 2005; 47(3):207–13.
196. Моргун АВ, Кувачева НВ, Комлева ЮК и др. Дифференцировка эмбриональных прогениторных клеток мозга крыс в астроциты и нейроны. *Сибирское медицинское обозрение*. 2013; 6:9–12.
197. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009; 5(3):119–26. DOI: 10.4161/org.5.3.9583.
198. Фрешни РЯ. Культура животных клеток. Практическое руководство / Фрешни Р. Я.; пер. с 5-го англ. изд. Ю. Н. Хомякова, Т. И. Хомяковой. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.
199. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2007; 368:39–57. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_3.
200. Fahy GM, Wowk B. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol*. 2015; 1257:21–82. doi: 10.1007/978-1-4939-2193-5_2.
201. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*. 2004; 25(6):375–88.

202. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996; 17(3):243–56. DOI: 10.1016/0142-9612(96)85562-1.
203. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells*. 2005; 23(5):681–8. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0135.
204. Negishi T, Ishii Y, Kawamura S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Cryopreservation of brain tissue for primary culture. *Exp Anim*. 2002; 51(4):383–90. DOI: 10.1538/expanim.51.383.
205. Petite D, Calvet MC. Cryopreserved neuronal cells in long-term cultures of dissociated rat cerebral cortex: survival and morphometric characteristics as revealed by immunocytochemistry. *Brain Res*. 1995; 669(2):263–74. DOI: 10.1016/0006-8993(94)01269-n.
206. Petite D, Calvet MC. Cryopreserved GABAergic neurons in cultures of rat cerebral cortex and mesencephalon: a comparative morphometric study with anti-GABA antibodies. *Brain Res*. 1997; 747(2):279–89. DOI: 10.1016/S0006-8993(96)01287-5.
207. Silani V, Pizzuti A, Strada O, Falini A, Buscaglia M, Scarlato G. Human neuronal cell viability demonstrated in culture after cryopreservation. *Brain Res*. 1988; 473(1):169–74. DOI: 10.1016/0006-8993(88)90331-9.
208. Malinin TI, Perry VP Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells. *Cryobiology*. 1967; 4(2):90–6. DOI: 10.1016/S0011-2240(67)80216-5.
209. Tomford WW, Fredericks GR, Mankin HJ. Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am*. 198; 66(2):253–9.
210. Ma XH, Shi Y, Hou Y, Liu Y, Zhang L, Fan WX, Ge D, Liu TQ, Cui ZF. Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. *Cryobiology*. 2010;60(2):184–91. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.10.013.
211. Пушкаръ Н. С. Криопротекторы / Пушкаръ Н. С., Шпаго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В. - Киев: Наук. думка, 1978. – 204 с

212. Chong YK, Toh TB, Zaiden N, Poonepalli A, Leong SH, Ong CE, Yu Y, Tan PB, See SJ, Ng WH, Ng I, Hande MP, Kon OL, Ang BT, Tang C. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem Cells*. 2009; 27(1):29–39. doi: 10.1634/stemcells.2008-0009.
213. Kuleshova LL, Tan FC, Magalhaes R, Gouk SS, Lee KH, Dawe GS. Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification. *Cell Transplant*. 2009; 18(2):135–144.
214. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9(5):701–6. DOI: 10.1016/s0955-0674(97)80124-x.
215. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2001; 13(5):555–62. DOI: 10.1016/s0955-0674(00)00251-9.
216. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984; 247(3 Pt 1):125–42. DOI: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
217. Paynter SJ, Andrews KJ, Vinh NN, Kelly CM, Rosser AE, Amso NN, Dunnett SB. Membrane permeability coefficients of murine primary neural brain cells in the presence of cryoprotectant. *Cryobiology*. 2009; 58(3):308–14. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.02.008.
218. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*. 1986; 23(1):1–13. DOI: 10.1016/0011-2240(86)90013-1.
219. Parker SS, Moutal A, Cai S, Chandrasekaran S, Roman MR, Koshy AA, Khanna R, Zinsmaier KE, Mouneimne G. High fidelity cryopreservation and recovery of primary rodent cortical neurons. *eNeuro*. 2018; 5(5). pii: ENEURO.0135–18.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0135-18.2018.
220. Ляшенко ТД, Сукач АН. Влияние различных концентраций ДМСО и замораживания-отогрева на сохранность нервных клеток новорожденных крыс. *Проблемы криобиологии*. 2011; 21(3):263–72.
221. Seggio AM, Ellison KS, Hynd MR, Shain W, Thompson DM. Cryopreservation of transfected primary dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci Methods*. 2008; 173(1):67–73. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.05.017.

222. Nishiyama Y, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Sugai K, Nishimura S, Kashiwagi R, Yasutake K, Isoda M, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Safe and efficient method for cryopreservation of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem and progenitor cells by a programmed freezer with a magnetic field. *Neurosci Res.* 2016; 107:20–9. doi: 10.1016/j.neures.2015.11.011.
223. Rodríguez-Martínez D, Martínez-Losa MM, Alvarez-Dolado M. Cryopreservation of GABAergic Neuronal Precursors for Cell-Based Therapy. *PLoS One.* 2017; 12(1):e0170776. doi: 10.1371/journal.pone.0170776.
224. Marchenko S. Counting human neural stem cells. *J Vis Exp.* 2007; 7: 262–4. doi: 10.3791/262.
225. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из надпочечников новорожденных поросят. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2017; 27(4):322–33. doi:10.15407/cryo27.04.322.
226. Delree P, Leprince P, Schoenen J, Moonen G. Purification and culture of adult rat dorsal root ganglioneurons. *J Neurosci Res.* 1989; 23(2):198–206. DOI: 10.1002/jnr.490230210.
227. Liu R, Lin G, Xu H. An efficient method for dorsal root ganglia neurons purification with a one-time anti-mitotic reagent treatment. *PLoS One.* 2013; 8(4):e60558. doi: 10.1371/journal.pone.0060558.
228. Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol.* 2003; 163(4):889–99. DOI: 10.1083/jcb.200307068.
229. Haastert K, Mauritz C, Chaturvedi S, Grothe C. Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective non-viral transfection protocol. *Nat Protoc.* 2007;2(1):99–104. DOI: 10.1038/nprot.2006.486.
230. Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells.

Journal of Immunological Methods. 2001; 254(1-2):183–190. doi:10.1016/s0022-1759(01)00408-2.

231. Hayden S.M., Seeds N.W. Modulated expression of plasminogen activator system components in cultured cells from dissociated mouse dorsal root ganglia. *J Neurosci.* 1996; 16(7):2307–17.

232. Smith RA, McInnes IB. Phase contrast and electron microscopical observations of adult mouse dorsal root ganglion cells maintained in primary culture. *J Anat.* 1986; 145:1–12.

233. Svendsen CN, Bhattacharyya A, and Tai YT. Neurons from stem cells: Preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(11):831–4. DOI: 10.1038/35097581.

234. Bierlein De la Rosa M, Sharma AD, Mallapragada SK, Sakaguchi DS. Transdifferentiation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-secreting mesenchymal stem cells significantly enhance BDNF secretion and Schwann cell marker proteins. *J Biosci Bioeng.* 2017; 124(5):572–582. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.05.014.

235. Touitou Y, Lambrozo J, Mauvieux B, Riedel M. Evaluation in humans of ELF-EMF exposure on chromogranin A, a marker of neuroendocrine tumors and stress. *Chronobiol Int.* 2019; 1–8. doi: 10.1080/07420528.2019.1683857.

236. Locher H, de Rooij KE, de Groot JC, van Doorn R, Gruis NA, Löwik CW, Chuva de Sousa Lopes SM, Frijns JH, Huisman MA. Class III β -tubulin, a novel biomarker in the human melanocyte lineage. *Differentiation.* 2013;85(4-5):173–181. doi: 10.1016/j.diff.2013.05.003.

237. Locher H, Saadah N, de Groot S, de Groot JC, Frijns JH, Huisman MA. Hair follicle bulge cultures yield class III- β -tubulin-positive melanoglia cells. *Histochem Cell Biol.* 2015; 144(1):87–91. doi: 10.1007/s00418-015-1312-8.

238. Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Smejkalová B, Bertrand L, de Chadarévian JP, Agamanolis DP, Legido A, Khalili K, Dráber P, Katsetos CD. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes:

implications for phenotypic identity. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(4):341–54. doi: 10.1097/NEN.0b013e31816a686d.

239. Schafer MK, Mahata SK, Stroth N, Eiden LE, Weihe E. Cellular distribution of chromogranin A in excitatory, inhibitory, aminergic and peptidergic neurons of the rodent central nervous system. *Regul Pept.* 2010; 165(1):36–44. doi: 10.1016/j.regpep.2009.11.021.

240. Xue ZG, Smith J, Le Douarin NM. Expression of the adrenergic phenotype by dorsal root ganglion cells of the quail in culture in vitro. *C R Acad Sci III.* 1985;300(13):483–8.

241. Furlan A, Dyachuk V, Kastriti ME, Calvo-Enrique L, Abdo H, Hadjab S, Chontorotzea T, Akkuratova N, Usoskin D, Kamenev D, Petersen J, Sunadome K, Memic F, Marklund U, Fried K, Topilko P, Lallemand F, Kharchenko PV, Ernfors P, Adameyko I. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science.* 2017; 357(6346):eaal3753. DOI: 10.1126/science.aal375.

242. Supotnitskiy MV, Elapov AA, Merkulov VA, et al. Common technological processes used in manufacture of biomedical cell culture products. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)* 2015; 2:36–45.

243. Silva Filho OF, Argôlo Neto NM, Carvalho MA, Carvalho YK, Diniz Ad, Moura Lda S, Ambrósio CE, Monteiro JM, Almeida HM, Miglino MA, Alves Jde J, Macedo KV, Rocha AR, Feitosa ML, Alves FR. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. *Acta Cir Bras.* 2014; 29(8):478–84. DOI: 10.1590/s0102-86502014000800001.

244. Кузнецов СЛ, Мушкамбаров НН. Гистология, цитология и эмбриология. Учебник для медицинских вузов. Москва: МИА; 2007. 600 с.

245. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, и др. Экспрессия β -III-тубулина в культуре клеток неонатальных надпочечников: сравнение монослойного и 3D-культивирования. *Вестник Харьковского национального*

университета имени В. Н. Каразина, Серия «Биология». 2017; 28:76–86. [doi:10.26565/2075-5457-2017-28-9](https://doi.org/10.26565/2075-5457-2017-28-9).

246. Hubel A. *Preservation of Cells: A Practical Manual*, Wiley-Blackwell, 2018, 216 p.

247. Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46(3):188–196. doi: 10.1159/000496068.

248. Сидоренко ОС, Легач ЕИ, Бондаренко ТП, Божок ГА. Характеристика культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, полученной из криоконсервированных фрагментов ткани. *Вісник проблем біології і медицини*. – 2013; 1(4):95–9.

249. Боценовский ВА, Барышников АЮ. Молекулы клеточной адгезии человека. *Успехи современной биологии*. 1994; 114(6):741–53.

250. Massie I, Selden C, Hodgson H, Fuller B. Cryopreservation of encapsulated liver spheroids for a bioartificial liver: reducing cryoinjury using an ice nucleating agent. *Tissue Eng*. – 2011; 17(7):765-74.

251. Fedoroff S, Richardson A. *Protocols for Neural Cell Culture*. 3rd Ed.// Ed. Fedoroff S, Richardson A. // Humana press, Inc., Totowa, NjSpringer Science & Business Media, June 29, 2008. Pps: 262. Gritti A, Galli R, Vescovi AL, chapter 14, Culture of stem cells of the Central Nervous System, p192

252. Порожан ЕА, Останков МВ, Бабенко НН, Гольцев АН. Оценка фенотипических характеристик фетальных нервных клеток после криоконсервирования с использованием различных режимов замораживания. *Проблемы криобиологии*. 2012, 22(1):39-48

253. Polchow B, Kebbel K, Schmiedeknecht G, et al. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *J Transl Med*. 2012; 10:98.

254. Magalhães LC, Bhat MH, Freitas JLS, Melo LM, Teixeira DIA, Pinto LCA, Câmara LMC, Duarte JMB, Freitas VJF. The Effects of Cryopreservation on Different Passages of Fibroblast Cell Culture in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*). *Biopreserv Biobank*. 2017 Oct, 15 (5): 463-468
255. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011 May 6;8(5):486–98.
256. Li N, Li X, Chen K, Dong H, Kagami H. Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):184. Published 2019 Jun 24. doi:10.1186/s13287-019-1283-0
257. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res*. 2012;22(2):288-304.
258. Гольцев АН, Гурина ТМ, Бабенко НН, Останков МВ. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток. *Проблемы криобиологии*. 2003;1:46–50.
259. Гольцев АН, Луценко ЕД, Останкова ЛВ. и др. Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга. *Пробл. криобиологии*. 1996;2:3–10.
260. Terry C, Hughes RD, Mitry RR, Lehec SC, Dhawan A. Cryopreservation-Induced Nonattachment of Human Hepatocytes: Role of Adhesion Molecules. *Cell Transplantation*. 2007;16(6):639–647. doi:10.3727/000000007783465000.
261. Cai G, Lai B, Hong H, Lin P, Chen W, Zho Z, Chen H. Effects of cryopreservation on excretory function, cellular adhesion molecules and vessel lumen formation in human umbilical vein endothelial cells. *Molecular Medicine Reports*. 2017; 16(1):547–552. doi:10.3892/mmr.2017.6664.
262. Antebi B, Asher AM, Rodriguez LA, Moore RK, Mohammadipoor A, Cancio LC. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *J Transl Med*. 2019; 17:297. doi: 10.1186/s12967-019-2038-5.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

1. Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у фахових журналах України

1. Али СГ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Серія «Біологія». 2018; (30):49–59.
2. Али СГ, Божок ГА. Крיוконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из первичной культуры клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят. Проблеми крiобіології і крiомедицини. 2019; 29(4):354–364. (Scopus)
3. Али СГ, Коваленко ИФ, Божок ГА. Некоторые фенотипические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 3(152):46–50.
4. Алi СГ, Моїсєєва НМ, Божок ГА. Крiоконсервування культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Проблеми крiобіології і крiомедицини. 2020; 30(2):158–168. (Scopus)

Статті у фахових зарубіжних журналах

5. Ali S, Bozhok G. Effect of Cryopreservation on Different Passages of Porcine Dorsal Root Ganglion Cell Culture. Recent Advances in Biology and Medicine. 2019. pgs 5.

2. Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Тези наукових доповідей конференцій

6. Али СГ, Лаврик АА, Божок ГА. Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов.

Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 40-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 23–24.05.2016 м. Харків, 2016. С. 29.

7. Али СГ. Влияние условий культивирования на некоторые морфофункциональные характеристики первичных культур клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Научные исследования и разработки 2018 года: материалы Международной научно–практической конференции, г. Москва, Россия, 15–31.10.2018 г. Москва, 2018. с. 303–7.

8. Али СГ, Божок ГА. Экспрессия нейрональных маркеров в культуре клеток, полученной из нативных и криоконсервированных мультиклеточных сфероидов из спинальных ганглиев неонатальных поросят. Холод в біології та медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології: матеріали 43-ї щорічної конференції молодих учених, м. Харків, Україна, 27–29.05.2019 г. Харків, 2019. с. 27.

9. Алі СГ. Вплив кріоконсервування на здатність до адгезії мультиклітинних сфероїдів, отриманих зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. Молодь і поступ в біології: матеріали XV-ї Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, м. Львів, Україна, 9–11.04.2019 м. Львів, 2019. с. 86.

10. Алі СГ, Божок ГА. Експресія нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Yaremche, Ukraine, 18–21.2019 Yaremche, 2019. p. 163.

11. Али СГ, Божок ГА. Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток, полученной из спинальных ганглиев неонатальных поросят. 4-й Национальный конгресс по регенеративной медицине: Всероссийская науч.-практ. конф. с международным участием, г. Москва, Россия, 20-23.11. 2019 г. Гены и Клетки. Приложение. 2019 (14):21. (Scopus).

ДОДАТОК Б

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

«Холод в біології та медицині» 40-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків 23–24.05.2016р.;

«Наукові дослідження і розробки 2018 року». Тези. Росія, м. Москва, 15–31.10.2018р.;

«Холод в біології та медицині» 43-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків, 27–29.05.2019р.;

«Молодь і поступ в біології» XV-а Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів. Тези. Україні, Львів, 9–11.04.2019 г. Львів, 2019р.;

The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, Тези. Yaremche, Ukraine, 18–21.2019р.;

«4-й Національний конгрес з регенеративної медицини» всеросійська науково-практична конференція з міжнародною участю. Постерна доповідь. Росія, м. Москва, 20-23.11.2019р.;