

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

НОВІКОВА ОКСАНА ЮРІЇВНА

УДК 57.085.23: 576.5

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ,
ОТРИМАНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бондаренко Тетяна Петрівна,
Інститут проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України, м. Харків
головний науковий співробітник
відділу кріоендокринології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Малова Наталія Георгіївна,
Інститут проблем ендокринної патології
імені В.Я. Данилевського НАМН України, м. Харків
завідувач лабораторії фармакології;

кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник
Скоробогатова Наталія Григорівна,
Інститут медичної радіології та онкології
імені С.П. Григор'єва НАМН України,
старший науковий співробітник
лабораторії протирадіаційних засобів
і клітинних технологій.

Захист відбудеться «26» травня 2021 р. о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «25» березня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Нервовий гребінь (НГ) являє собою транзиторну ембріональну структуру, клітини якої мігрують, утворюючи багато похідних: нейрони та гліальні клітини периферичної нервової системи, хрящову та сполучну тканини, міоцити серцево-судинної системи, черепно-лицьові кістки, меланоцити та інші. Розв'язання проблем лікування патологій, що пов'язані зі порушенням нейрогуморальної регуляції, в значній мірі обумовлені недостатньою функцією клітин – похідних нервового гребеню (КПНГ). Саме тому отримання культур КПНГ є актуальним для вирішення низки практичних задач, оскільки вони мають значний регенативно-відновлювальний потенціал у лікуванні нейродегенеративних хвороб, можуть стати моделями для вивчення патологій розвитку нервової системи, процесів злоякісного росту та метастазування пухлин (Cordero D. et al., 2011; Gallik K. et al., 2017; Corallo D. et al., 2020; Quenten A. et al., 2019). Достатньо дослідженим об'єктом серед КПНГ є культура наднирників (НН), розроблені підходи до їх культивування та показана пластичність у культурі, навіть здатність заміщувати ушкоджену нервову тканину у разі трансплантації. У зв'язку з цим, перспективним є використання культур клітин даних типів для трансплантації в замісній терапії. Відомо, що КПНГ НН секретують катехоламіни, тому культура цих клітин може бути потенційним джерелом отримання даних гормонів (Marotta P. et al., 2018).

Популяція клітин дермальної папіли (ДП) вважається одним з найбільш неспеціалізованих і пластичних типів КПНГ у постанальному періоді і може генерувати як повну структуру волосяного фолікула (ВФ), так і інші типи епітеліальних та мезенхімальних тканин (Томас J. et al., 2001). Пластичність ДП потребує подальшого вивчення, для чого необхідна розробка підходів до культивування клітин, отриманих з неї.

На даний час 3D-культивування, яке реалізується за рахунок отримання мультиклітинних сфероїдів (МС), усе більше привертає увагу дослідників. Перевагами такого підходу є створення умов культивування клітин, більш подібних до умов їх перебування в складі тканини, що зумовлює краще збереження біологічних функцій та специфічні динамічні взаємодії клітин між собою та з позаклітинним матриксом (Achilli T-M. et al.; 2013; Lei Y. et al., 2013). Отже, отримання 3D-культур КПНГ є актуальною задачею.

Технологія отримання терапевтичних та біотехнологічних продуктів на основі клітинних культур, як правило, включає довгострокове зберігання, однією з сучасних технологій якого є кріоконсервування. Однак фактори кріоконсервування пошкоджують біологічні об'єкти, тому вдосконалення складу кріозахисного середовища та режимів охолодження є актуальною задачею для отримання успішного результату кріоконсервування.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в межах науково-дослідної теми «Властивості кріоконсервованих 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 – дослідити вплив кріоконсервування в кріозахисному середовищі на основі ДМСО та білково-пептидних добавок на морфологічні, функціональні, цитогенетичні властивості 2D- та 3D-культур, отриманих з наднирників та дермальних папіл неонатальних експериментальних тварин.

Для досягнення поставленої мети передбачалося розв'язати такі завдання:

1. Визначити джерело отримання неонатальних клітин наднирників та дермальних папіл, які здатні формувати мультиклітинні сфероїди за умов культивування, та провести порівняльну характеристику мультиклітинних сфероїдів, отриманих від кроликів, мишей та свиней.

2. Вивчити вплив складу поживного середовища на морфофункціональні властивості мультиклітинних сфероїдів в культурі дермальних папіл неонатальних кроликів.

3. Оцінити проліферативний і диференціювальний потенціал клітин дермальних папіл неонатальних кроликів.

4. Вивчити вплив кріоконсервування на експресію хромограніну А в культурі клітин наднирників неонатальних свиней.

5. У порівняльному аспекті вивчити вплив різних концентрацій кріопротектора ДМСО та кріоконсервування на морфофункціональні характеристики культури клітин, отриманої з дермальних папіл у вигляді моношару (2D-культура) або мультиклітинних сфероїдів (3D-культура).

6. Визначити вплив білково-пептидних добавок до кріозахисного середовища на основі ДМСО на морфофункціональні характеристики кріоконсервованої культури клітин, отриманої з дермальних папіл у вигляді моношару (2D-культура) або мультиклітинних сфероїдів (3D-культура).

Об'єкт дослідження – вплив кріоконсервування в кріозахисних середовищах на основі ДМСО та його комбінації або з білково-пептидними добавками на морфологічні, фенотипічні, цитологічні показники 2D- та 3D-культур, отриманих з НН та ДП неонатальних тварин.

Предмет дослідження – культури клітин, отримані з ДП та НН неонатальних тварин у вигляді моношару (2D-культура) або МС (3D-культура), до та після кріоконсервування.

Методи дослідження. У роботі використані методи ферментативного виділення клітин з тканини наднирників, експлантів для виділення культур клітин ДП вібриси, моношарового (2D) та об'ємного (3D) культивування, а також програмного заморожування; імуноцитохімічний, цитофлуориметричний методи – для визначення експресії молекулярних маркерів, методи цитологічного аналізу – для вивчення мітотичного режиму та патологій поділу клітин ДП, світлова та флуоресцентна мікроскопія – для дослідження морфології клітин, морфометричний аналіз – для дослідження показників культур в моно шарі та МС, клональний аналіз – для визначення здатності до клонального росту та методи статистичного аналізу – для верифікації числових даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше отримана культура ДП вібриси неонатальних кроликів у вигляді моношару та МС, описані її морфологічні, фенотипічні, проліферативні властивості. Встановлено здатність культури ДП до тривалого субкультивування зі збереженням здатності до формування МС та індукції в нейрональному та остеогенному напрямках.

У роботі вперше показана можливість формування МС у культурах ДП неонатальних кроликів шляхом вилучення ФТС із поживного середовища.

Вперше здійснено кріоконсервування МС та моношару клітин, отриманих з ДП неонатальних кроликів.

Уперше встановлено, що в кріопротекторних середовищах на основі ДМСО та після кріоконсервування в моношарі культури клітин ДП здійснюється віддалений ефект, що проявляється у збільшенні кількості патологічних поділів клітин та сповільненні росту МС. Встановлені безпечні та ефективні концентрації ДМСО (5, 7,5 %) при кріоконсервуванні даних об'єктів.

Уперше проведено аналіз впливу кріоконсервування на характер експресії хромограніну А – білка секреторних гранул хромафінних клітин до і після кріоконсервування культури клітин з НН неонатальних поросят. Встановлено перерозподіл субпопуляцій у культурі клітин НН у процесі культивування, що проявляється у відносному збільшенні кількості клітин в складі МС.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані в роботі дані вказують на наявність морфологічних та функціональних відмінностей у культурах ДП та НН, що отримані з різних біологічних видів ссавців.

Виявлені морфологічні, фенотипічні та індукційні властивості культур ДП кроликів дозволяють стандартизувати їх у якості модельного об'єкту для вивчення поведінки периферійних похідних НГ. Збереження основних характеристик культури після кріоконсервування дозволяє запропонувати цей об'єкт для використання в медико-біологічних дослідженнях.

На основі вдосконалення складу кріозахисного середовища шляхом введення білково-пептидних добавок покращено режим кріоконсервування культури клітин ДП, отриманої у вигляді моношару та МС.

Встановлені дані щодо наявності сублетальних порушень у клітинах ДП після впливу кріопротектора та кріоконсервування дали змогу встановити поріг безпечної концентрації кріопротектора ДМСО у складі кріозахисного середовища при низькотемпературному збереженні культури клітин ДП. Дані щодо секреції хромограніну А після кріоконсервування вказують на збереження секреторних властивостей хромафінних клітин у культурі, отже, їх придатність для використання в замісній терапії.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним оригінальним науковим дослідженням. Автором самостійно проведено патентний пошук, аналіз джерел за темою дисертаційної роботи та написані всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримані всі експериментальні результати, проведено їхній аналіз, статистична обробка і зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором були інтерпретовані результати і зроблені остаточні висновки.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на 40-й, 42 – 44-й щорічних наукових конференціях молодих учених «Холод в біології та медицині» (Харків, 2016 р.; 2017 – 2019 рр.); 3-їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Київ, 2018); Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 2018); XV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2019); 6-му Українському конгресі з клітинної біології з міжнародною участю (Яремче, 2019); IX Міжнародному симпозиумі «Біоресурси та віруси», (Київ, 2019); XXVIII науково-практичній конференції «Научный форум: Медицина, биология и химия» (Москва, РФ, 2019 р.); Міжнародній конференції молодих учених: біофізиків, біотехнологів, молекулярних біологів та вірусологів (Новосибірськ, РФ, 2020).

Публікація матеріалів. За темою дисертації опубліковано 15 робіт, з них 4 статті у фахових виданнях України (1 стаття входить у міжнародну наукометричну базу Scopus), 2 статті в зарубіжному журналі, 9 публікацій у збірках тез конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 146 сторінках друкованого тексту (з яких 102 сторінки основної частини) містить такі розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, три розділи результатів власних досліджень, висновки, список літератури. Список літератури включає 200 джерел, розміщених на 23 сторінках. Робота проілюстрована 27 рисунками, 14 мікрофотографіями і 8 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлений аналіз даних літератури стосовно проблеми вивчення формування НГ у процесі онтогенезу, шляхи міграції його похідних та фактори, що забезпечують їхню диференціацію. Детально проаналізовані структурно-функціональні характеристики його похідних, що знаходяться в постнатальному онтогенезі в НН та волосяному фолікулі. Описана здатність усіх типів КПНГ формувати 2D- та 3D-культури в умовах *in vitro*. Наведено основні етапи вивчення МС в якості моделей об'ємного культивування. Описаний світовий досвід культивування та кріоконсервування КПНГ, отриманих з НН та ДП. Аналіз цих даних дозволив виявити найменш вивчені аспекти культивування та кріоконсервування різних похідних НГ, відповідно, були сформульовані напрямки дослідження дисертаційної роботи.

Матеріали та методи дослідження. У розділі наведена характеристика об'єктів, матеріалів та методів дослідження.

ДП та НН були отримані від неонатальних кролів породи новозеландський білий, безпорідних білих мишей та поросят першого покоління гібридів порід велика біла/ландрас і макстер/дюрок. Усі експерименти з використанням неонатальних тварин були проведені у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447 – IV від 21.02.2006 р.) та при дотриманні вимог Комітету з біоетики ІПКІК НАН України, погоджених з положеннями «Європейської конвенції про підтримку хребетних тварин, що

використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Суспензію клітин НН отримували методом ферментативної дезагрегації за раніше описаним протоколом (Сидоренко ОС та соавт., 2011) шляхом механічної та ферментативної обробки. Субкультивування здійснювали шляхом ферментативної дезагрегації.

Отримання культури клітин ДП проводили методом експлантів за оригінальною методикою. Для цього отримували експланти ДП вібрис, які культивували в 6-лункових планшетах (РАА, Австрія), вкритих розчином 10%-го желатину (Генезис, Україна). Для вивчення сфероїдоутворення при субкультивуванні використовували такі ростові фактори: 1) 10% ФТС; 2) 1% ФТС; 3) 1% ростової добавки для нейрональних культур В 27 (Sigma, США); 4) 1% В27 у поєднанні з 10 нг / мл FGF, 5 нг / мл NGF (Sigma, США); 5) 1% ростової добавки для нейрональних культур Нейромакс (ПанЕко, РФ); 6) 1% розчин альбуміну ВРХ (Biowest, Франція); 7) 1% субстанції Албутрісан (Харків, Україна); 8) курячий ембріональний екстракт; 9) середовище Гібрис без додавання ростових чинників.

Кріоконсервування всіх типів культур здійснювалося зі швидкістю охолодження 1 град/хв до -80°C на програмному заморожувачі «ЗПМ-1» (НПК «Отел», Україна), потім кріопробірки занурювали в рідкий азот і зберігали до використання. Використані кріозахисні середовища склалися з DMEM («Biowest», Франція), ДМСО та білково-пептидних добавок (табл. 1).

Таблиця 1

Склад середовищ для кріоконсервування

Добавка	Концентрація ДМСО, %														
	5			7,5			10			12,5			15		
DMEM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Альбумін, 5%	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Албутрісан, 5%	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Кріоконсервовані фрагменти НН, ВФ, суспензію клітин чи МС зберігали протягом 1-1,5 місяців. Для отримання культури клітин фрагменти чи суспензію швидко розморожували на водяній бані при 37°C і відмивали від кріопротектора шляхом центрифугування у звичайному режимі. МС відмивали без центрифугування.

Конфлуентність моношару оцінювали візуально як частину поля зору мікроскопа, що заповнена клітинами. Коефіцієнт проліферації визначали як відношення концентрації клітин в момент підрахунку до початкової концентрації при посіві.

Світлову мікроскопію здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа МІБ-Р (Ломо, РФ), Leica-2000 та AmScore, модель XYL-403 (Китай) з цифровими камерами. Морфометричний аналіз проводили за мікрофотографіями з використанням програми TourView 3.7 та LAN.

Для імуноцитохімічного аналізу 2D та 3-D-культури фіксували, відмивали PBS, проводили пермеабілізацію в 0,3% розчині Triton X-100. Блокували розчином PBS з 0,1% Triton X-100 та 1% БСА. Для непрямого мічення використовували перші й другі антитіла. Для візуалізації ядер фіксовані клітини після інкубації з антитілами

фарбували розчином Hoechst 33342 (5 мкг/мл, «Sigma»). Флуоресценцію оцінювали на лазерному конфокальному мікроскопі Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Німеччина). Використовували програми для аналізу й обробки зображень AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Німеччина), LSM Examiner (Carl Zeiss, Німеччина) та LAN (Leica, Швейцарія).

З метою індукції КПНГ ДП в нейрональному напрямку було використане середовище DMEM/F12, що містило 2% ростової добавки нейромакс, 10^{-6} Ммоль ретиноєвої кислоти, 10 нг/мл NGF, 10 нг/мл EGF. Для остеοіндукції використовувалося середовище, що містить 2% ФТС, 50 мкМ аскорбату, 10 мМ β -гліцерофосфату, 0,1 мкМ дексаметазону. Остеοіндукцію підтверджували шляхом забарвлення моношару розчином AlizarinRed на 21 добу культивування. Для визначення нейрональної індукції використовували специфічні антитіла до β III-тубуліну.

Для отримання цитологічних препаратів клітини культивували на покривних скельцях (MICROmed, Україна), початкова концентрація становила 4×10^4 клітин/мл. Через 48 годин культивування скельця з моношаром клітин зневоднювали, відмивали PBS та забарвлювали гематоксиліном Караччі. Морфологію клітин вивчали на препаратах культур клітин ДП 1 та 2 пасажів. У кожному препараті підраховували 1000 клітин та виражали в проміле (‰). Визначали клітини з нормальною та патологічною морфологією. Окремо підраховували кількість клітин, що поділяються, з нормальним та патологічним перебігом мітозу.

Метод проточної цитофлуориметрії використовували для визначення ХрА в культурі клітин НН. В якості первинних антитіл використовували кролячі антитіла до ХрА («Abcam», Великобританія), в якості вторинних - Alexa488-кон'юговані антитіла проти кролика («Abcam»). Аналіз проводили на цитофлуориметрії «FACSCalibur» («BDBioscience», США) за допомогою програм «CellQuestPro» («Becton Dickinson», США) і «WinMDI 2.8» (США).

Для статистичного аналізу даних використовували програмні додатки «Excel» («Microsoft», США) і «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Кількісні дані експериментів представлені у вигляді середнього значення $\pm$ стандартне відхилення. При підрахунку концентрацій клітин, життєздатності, морфометричних параметрів культур клітин статистичну значущість визначали, розраховуючи параметричний критерій Стюдента. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$. Відмінності між вибірками при аналізі даних цитологічних досліджень оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати власних досліджень та їх обговорення

Особливості КПНГ НН та ДП різних видів. Були досліджені 2D- та 3D-культури, отримані з ДП вібрис неонатальних кроликів та мишей, а також НН неонатальних поросят та кроликів. Обрані об'єкти порівнювали за такими показниками, як здатність формувати моношар та МС при культивуванні, морфологія клітин та здатність до субкультивування. На перших етапах росту культури клітин, отримані з НН залоз поросят і кроликів, мали однакові ростові характеристики. При культивуванні на адгезивній поверхні до субстрату

прикріплялися фібробластоподібні клітини, що формували моношар через 5-7 діб (рис. 1, а, г), на якому зустрічався інший тип клітин - дрібні веретеноподібні клітини, що мають відростки на полюсах та розташовані ланцюжками з дрібним ядром та однорідною цитоплазмою. За зовнішнім виглядом і характером росту ці клітини були віднесені до нейробластоподібних.

У культурі клітин кроликів і поросят ми виявляли прикріплені МС, що мали щільну структуру, продовжували ріст у процесі культивування. При використанні умов зі зниженою адгезією – планшети, вкриті 1% агарози та безсироватковому середовищі, культури НН поросят та кроликів являли собою МС (рис. 1, г).

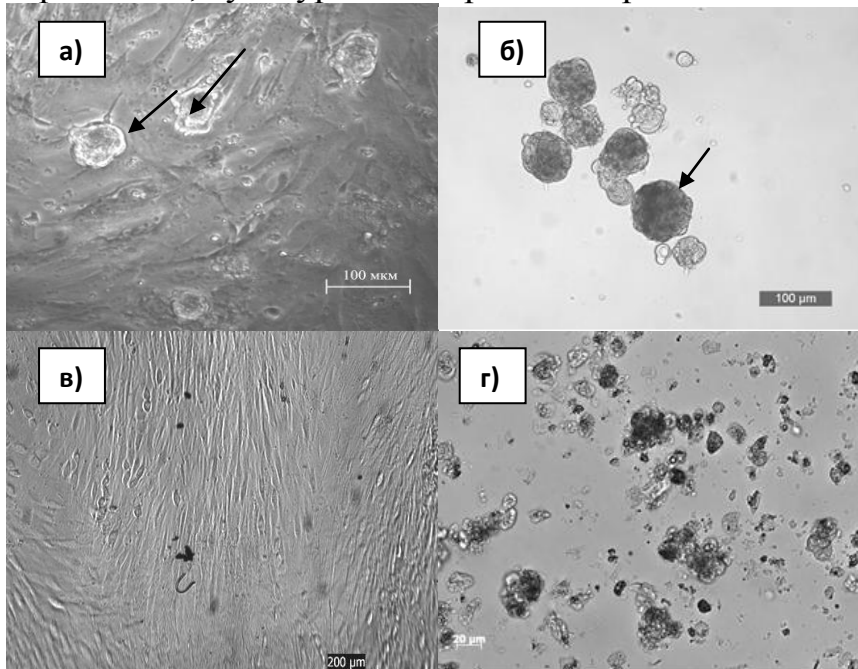


Рис. 1 Моношар первинної культури клітин НН неонатальних: поросяти (а), кролика (б, в), миші (г) на 7 добу росту (стрілками вказані МС)

Культури клітин, отримані з НН мишей, за будь-яких умов культивування не формували моношару чи класичних МС, а лише багатоклітинні агрегати та поодинокі клітини.

Таблиця 2

Типи культур, отримані з різних видів за різних умов культивування

Тварина	Порося	Кролик		Миша	
Орган	НН	НН	ДП	НН	ДП
Моношар	+	+	+	—	+
МС	+	+	+	—	+
Розселення при пересіві	+	+	+	+/-	—
Нейроноподібні клітини	+	—	+	—	—

Культури клітин, отримані з ДП кроликів та мишей в адгезивних умовах культивування, формували моношар, а в неадгезивних – МС. При цьому динаміка росту в цих культурах була подібною – на першу-другу добу формувалися агрегати, які згодом ущільнювалися та з 3 доби збільшувалися в розмірах і продовжували зростати протягом наступних 14 діб спостереження. Ростові характеристики всіх вивчених культур в залежності від умов культивування наведені в таблиці 2.

Здатність до сфероїдоутворення в культурах КПНГ різних видів використовуваних тварин оцінювали на 3 добу після висіву суспензії клітин в

неадгезивні умови. На основі отриманих даних (табл. 3) для подальшого дослідження були обрані культури НН поросят та ДП кроликів як ті, в яких формується найбільша кількість МС.

Таблиця 3

Ефективність сфероїдоутворення в культурах КПНГ різних видів на 3 добу культивування

Характеристика	Тварина				
	порося	кролик		миша	
	НН	НН	ДП	НН	ДП
Кількість МС	150±19	92±13	273±28	0	139±23

Вплив складу ростового середовища на морфологічні особливості культури клітин ДП неонатальних кроликів. Шляхом дослідження широкої панелі ростових факторів було встановлено, що достатньою умовою для формування моношару є наявність ФТС у ростовому середовищі (рис. 2, б). За відсутності ФТС формуються МС, або агрегати та поодинокі флотуючі клітини в залежності від складу середовища. Виявилося, що клітини ДП здатні підтримувати дуже високий проліферативний потенціал протягом тривалого часу (1,5 – 2 місяці, пасажування 1 раз на 7-10 діб). МС, що тривалий час культивувалися в неадгезивних умовах (відсутність ФТС), зберігали здатність до прикріплення та розселення (рис.2, б) при перенесенні в адгезивні умови (наявність 10% ФТС), при цьому, 100% МС прикріплялися. І навпаки, культури, що росли у вигляді моношару, зберігали здатність до росту у вигляді МС. Таким чином, було встановлено, що спосіб росту культур (2D- або 3D-культура) можна моделювати за рахунок введення у живильне середовище ФТС.

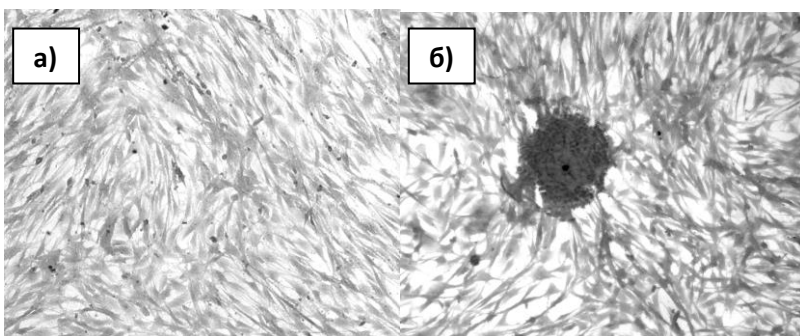


Рис. 2 Первинна культура ДП кроликів: а) моношар, сформований в адгезивних умовах (10% ФТС); б) МС, сформований після видалення з умов культивування ФТС

Фенотипічні характеристики культури клітин ДП та здатність до індукції в остеогенному та нейрональному напрямках. Було виявлено, що клітини ДП експресують β III-тубулін, в основному у вигляді філаментів, сконцентрованих головним чином в перинуклеарній області (рис. 3). Після проведення індукції в нейрональному напрямку, яка здійснювалась шляхом тривалого культивування в середовищі, що містило 10^{-6} М ретиноевої кислоти, спостерігалось значне посилення світіння. Філаменти цитоскелету клітин при цьому займали всю площу клітини, а не тільки перинуклеарний простір (рис. 3г). Таким чином, у культурі ДП відбувалися

структурні перебудови, які свідчать про накопичення тканинспецифічних філаментів за диференціювання в нейрональному напрямку.

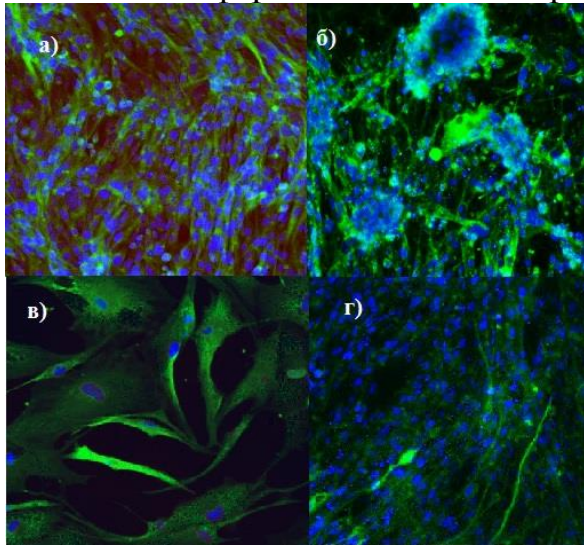


Рис. 3 Експресія β III-тубуліну в культурах ДП: а) конфлуентний моношар неіндукованої культури; б) МС в неіндукованій культурі, в) клітини культури після нейрональної індукції - 21 доба; г) моношар культури після нейрональної індукції - 21 доба (видно довгі пофарбовані відростки)

У неіндукованій культурі ДП було відзначено позитивне забарвлення на віментин (рис. 4). Проте вміст віментину був значно вище в клітинах, що входять до складу МС (рис. 4, б) в порівнянні з моношаром. Це може бути пов'язано з участю віментину в агрегації клітин і підтримці міжклітинних зв'язків, які виникають при формуванні МС. Забарвлення антитілами до глутамінсинтази показало наявність експресії даного білка в нативній культурі (рис. 4, в), що свідчило про протікання глутаматного циклу в даних клітинах.

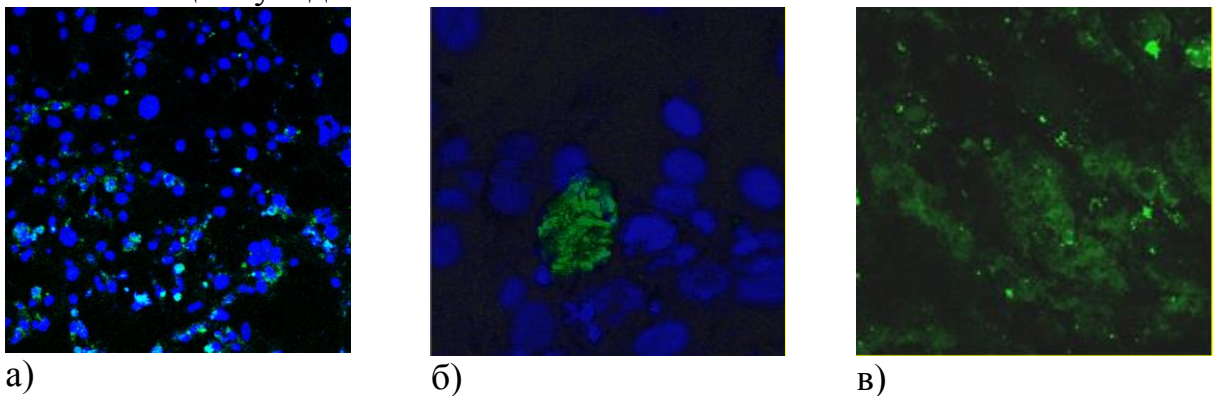


Рис. 4 Забарвлення антитілами: а та б – до віментину у моношарі (а) та у МС (б); в – до глутамінсинтази

Можливість індукції в остеогенному напрямку була підтверджена шляхом забарвлення моношару клітин алізариновим червоним після культивування в середовищі для індукції протягом 21 доби (рис. 5).

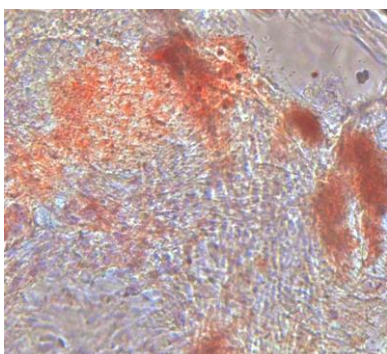


Рис.5 Забарвлення позаклітинного мінералізованого матриксу в культурі клітин ДП, індукованих в остеогенному напрямку (21 доба культивування, забарвлення Алізариновим червоним)

Негативним виявилось забарвлення на маркер астрогліальних клітин - білок S100, який в шкірі є також

маркером. Також маркер мантийних гліоцитів, а в шкірі - маркер меланоцитарної лінії прогеніторних клітин C-kit (CD117).

Вплив інкубації з кріопротекторами та кріоконсервування на морфологію та життєздатність культури клітин ДП при культивуванні у вигляді моношару. На першому етапі дослідження було вивчено вплив кріозахисних середовищ на життєздатність та адгезивні властивості 2D-культури клітин ДП кролика. Життєздатність клітин у всіх варіантах дослідження була досить високою, при цьому кількість пошкоджених клітин збільшувалась пропорційно до концентрації ДМСО. Найвища життєздатність клітин спостерігалася після інкубації в кріозахисному середовищі з додаванням 5% ДМСО – $(99,0 \pm 1)\%$, а найнижчою – при використанні середовищ на основі 15% ДМСО – $(84 \pm 3,1)\%$.

Значного впливу на адгезивні властивості клітин також не виявлено: через добу після висіву у стандартне ростове середовище, після експозиції в усіх вивчених кріозахисних середовищах (табл.1), прикріпилося більше 97% клітин.

Цитоморфологічний аналіз показав, що в інтактній культурі клітин ДП присутня незначна частина клітин з патологією – поодинокі поліплоїди та клітини з двома ядрами. У всіх варіантах використаних середовищ при збільшенні концентрації ДМСО до 7% не відбувалося значного збільшення рівня клітин з патологічною морфологією порівняно з контролем (рис. 6, а). У клітинах, які пройшли експозицію з концентраціями ДМСО 10-15%, незалежно від додавання білкових компонентів, відбувалася масова і значна вакуолізація цитоплазми. Найбільшу частину патологій становили поліплоїдні клітини, клітини з мікроядрами і з декількома ядрами. Відомо, що причиною появи багатоядерних клітин, до яких належать і клітини з мікроядрами, є передчасна конденсація хромосом, в клітинах, у яких не завершився S-період. У концентраціях 12,5 та 15% після пасивування відсутні життєздатні клітини, тому не формувалася моношар на другому пасажі.

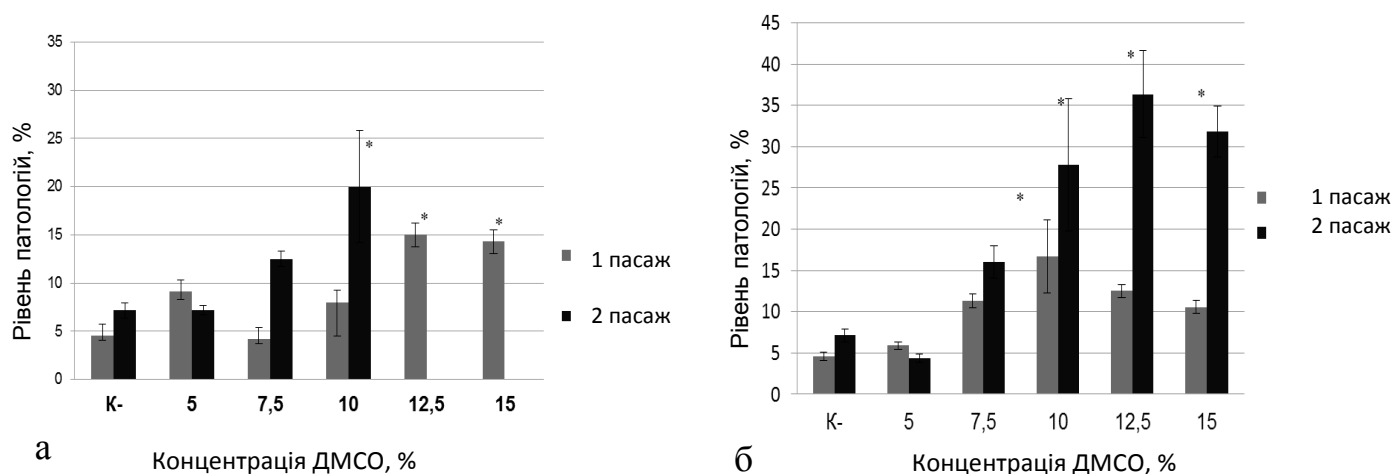


Рис. 6 Відносна кількість клітин з патологічною морфологією в культурі ДП на 1-му та 2-му пасажі після інкубації в кріозахисних середовищах: а – інкубація в кріозахисному середовищі з різними концентраціями ДМСО; б - інкубація в кріозахисному середовищі з різними концентраціями ДМСО та 5% альбуміну. * – дані достовірні в порівнянні з контролем

Додавання альбуміну мало протективний вплив на тлі дії ДМСО, що проявлялося у зниженні загальної кількості клітин з патологіями та виживанні клітин на тлі дії високих концентрацій ДМСО. Схожий ефект чинив Албутрісан, у присутності якого спостерігалось зменшення рівня клітин з патологічною морфологією та підвищення виживаності клітин на другому пасажі при використанні концентрацій ДМСО 12,5 та 15% (рис. 6, б).

Також показано вплив інкубації з кріопротекторними середовищами на формування патологій поділу в культурах ДП (Рис. 7). Основні патології поділу включали колхіциноподібний (К-)мітоз, порушення сегрегації хромосом та формування аномального веретена поділу.

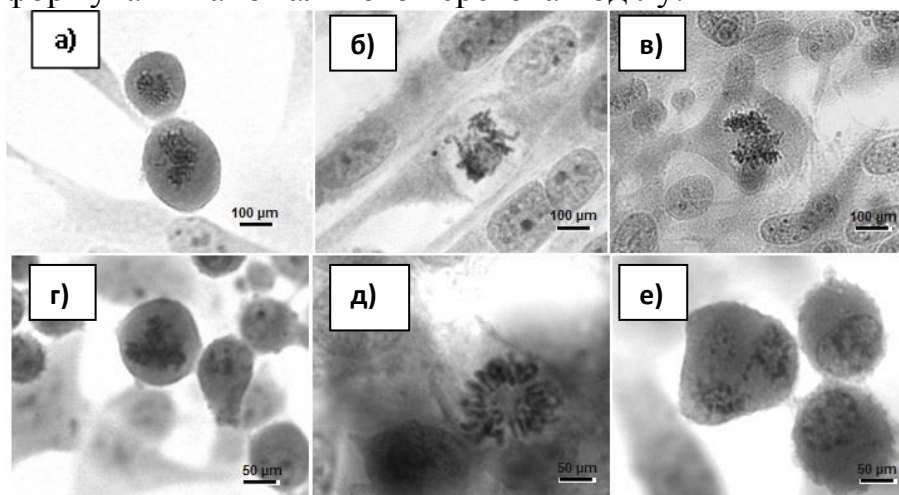


Рис. 7 Патології мітозу в культурі клітин ДП (1 пасаж, 2 добу росту): а) нерівна телофаза і хромосоми, що відстали; б) К-мітоз; в) відставання хромосом в анафазі; г) триполюсна метафаза; д) кільцева метафаза; е) триполюсна анафаза

При використанні кріозахисних середовищ на основі 5-10% ДМСО, рівень патологій у культурі на першому пасажі після деконсервування знаходився в межах 10%, що відповідає такому в нативному контролі (рис. 8, А).

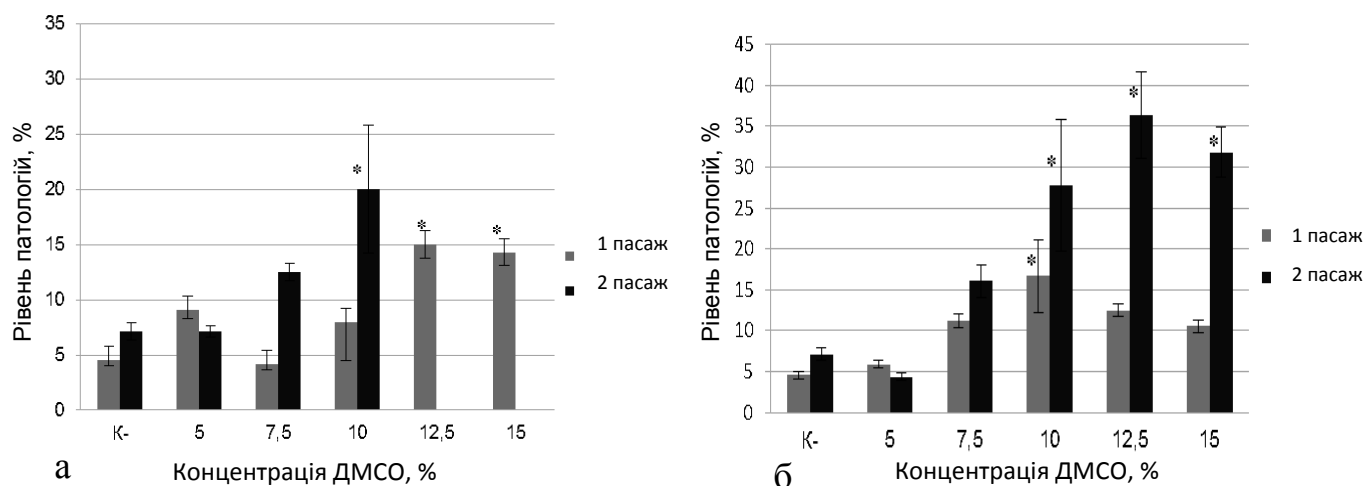


Рис. 8 Відносна кількість клітин з патологією мітозу в культурі ДП на 1-му та 2-му пасажі після деконсервування: а – інкубація в кріозахисному середовищі з різними концентраціями ДМСО; б – інкубація в кріозахисному середовищі з різними концентраціями ДМСО та 5% альбуміну. * – дані достовірні в порівнянні з контролем

Проте вже на другому пасажі в усіх концентраціях, за винятком 5%, відбувався суттєвий ріст числа патологій. У концентраціях 12,5 та 15% після пересіву відсутні життєздатні клітини. Додавання 5% альбуміну призводило до значного зниження патологій мітозу на тлі використання концентрацій ДМСО 12,5 та 15%. (рис. 8, б). Співставний вплив, включаючи виживання культури на 2 пасажі, мав Албутрісан.

Після кріоконсервування життєздатність клітин залишалась на досить високому рівні і становила $96 \pm 2,00$ % в контрольному варіанті (10% ДМСО та 5% ФТС), і найнижчою була при використанні 15% ДМСО без білкових добавок ($84,67 \pm 3,51$ %). Виявилося, що сумарний показник клітин з патологічною морфологією та патологіями поділу після відігрівання і 3 діб культивування зростав пропорційно до концентрації ДМСО (рис. 9, а). Значуще зростання рівня патологій в порівнянні з контролем відбувалося при використанні концентрацій ДМСО 12,5 і 15%. Додавання альбуміну призводило до деякого зниження загального рівня патологій у культурі клітин ДП (рис. 9, б). Схожий ефект спостерігався при використанні Албутрісану.

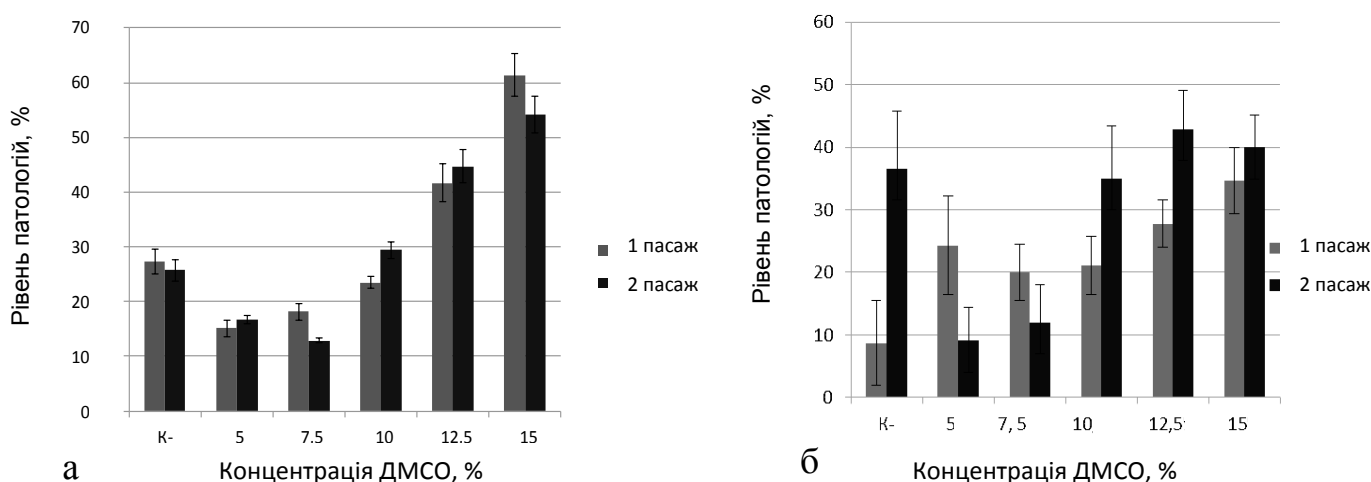


Рис. 9 Відносна кількість клітин з патологічною морфологією та патологією мітозу на 1-му та 2-му пасажі культури клітин ДП: а – кріоконсервування в кріозахисному середовищі з різними концентраціями ДМСО; б – кріоконсервування в кріозахисному середовищі з різними концентраціями ДМСО та 5% альбуміну

Вплив кріоконсервування на характер росту та розселення КПНГ ДП у вигляді МС. Для кріоконсервування МС, отриманих у культурі клітин ДП, використовували концентрації ДМСО 5% та 10% з додаванням 10% ФТС, базуючись на попередніх даних щодо кріоконсервування МС, отриманих з НН (Плаксина та ін, 2017). В якості критеріїв ефективності кріоконсервування використовувалися такі показники, як швидкість росту МС та відносна швидкість формування моношару після перенесення МС в адгезивні умови. Виявилось, що збільшення розмірів МС після деконсервування уповільнюється порівняно з нативним контролем (рис. 10, а). Однак максимальні розміри МС не відрізняються від контролю на прикінцевих термінах культивування. Процес формування моношару (рис. 10, б) уповільнювався в кріоконсервованих культурах, проте

продовжувався до формування конфлуентного моношару клітин з нормальною морфологією.

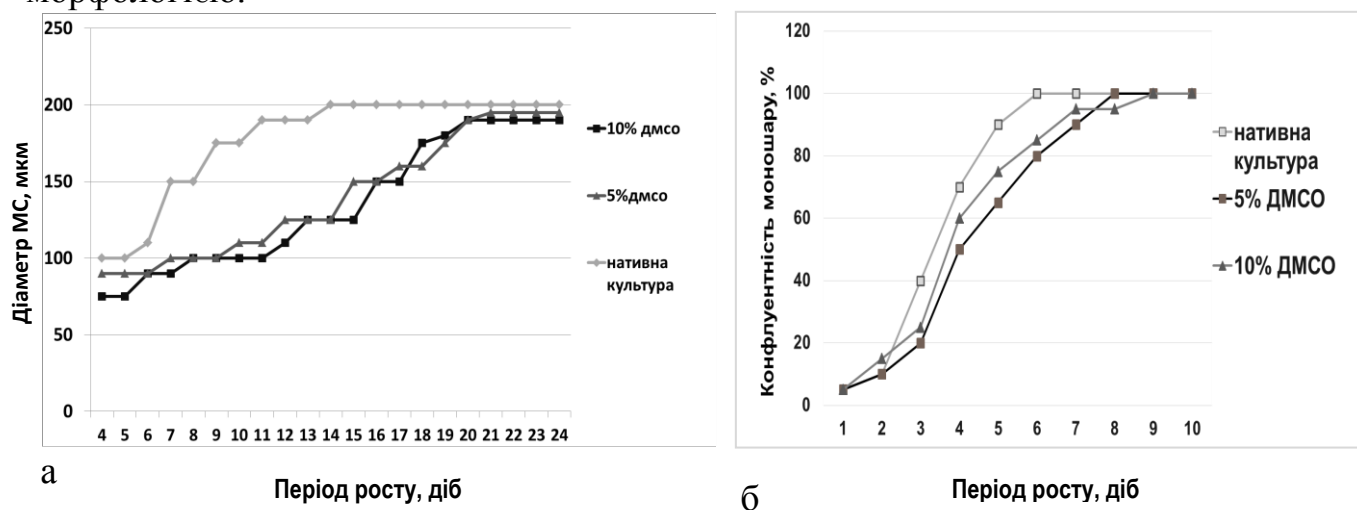


Рис. 10 Середній розмір МС, отриманих в культурі клітин ДП, до та після кріоконсервування (а) та швидкість формування моношару з клітин, які мігрують з МС (б)

Вплив кріоконсервування на популяцію Хромогранін-А позитивних клітин в культурі НН неонатальних поросят. Раніше була показана наявність у культурі НН неонатальних поросят популяції ХрА-позитивних клітин (Сидоренко, 2012). Нами здійснювалося дослідження ХрА-експресуючих клітин у культурах, отриманих з нативних та кріоконсервованих НН. Шляхом цитофлуориметричного аналізу встановлено, що клітини, які експресують ХрА, зберігаються в культурі НН після кріоконсервування та беруть участь у формуванні моношару та МС. При цьому, у процесі культивування виявлено зміну розподілу ХрА-позитивних клітин: зниження їх відносної кількості в складі моношару і підвищення в МС (табл. 4). Таким чином, 3D культивування сприяє збереженню популяції ХрА-продукуючих клітин.

Таблиця 4

Відносна кількість ХрА-позитивних клітин в культурах клітин, отриманих з нативних та кріоконсервованих НН

Доба	% ХрА-позитивних клітин, нативні НН		% ХрА-позитивних клітин, кріоконсервовані НН	
	флотуючі	адгезивні	флотуючі	адгезивні
2	9,2±3,2	21,8±3,1	10,7±4,1	26,5±4,4
7	10,4±2,1	24,6±4,0	15,1±2,9	18,2±4,2
12	14,3±2,8	16,7±2,2	11,2±2,2	21,7±1,1
15	11,1±2,2	13,0±1,5*	12,9±2,0	17,2±1,2*

Примітка: відмінності статистично значущі порівняно з 2 добою культивування, $p < 0,05$.

ВИСНОВКИ

Дисертація містить теоретичне обґрунтування й експериментальне вирішення задачі отримання культур клітин з похідних НГ (ДП, НН) неонатальних тварин у вигляді моношару (2D-культивування) та МС (3D-культивування), а також встановлення оптимальних умов їх довгострокового зберігання шляхом кріоконсервування.

1. Адгезивні властивості поверхні та склад живильного середовища визначають морфологію і динаміку росту клітин наднирників неонатальних поросят та дермальних папіл неонатальних кроликів *in vitro*. Вони здатні формувати 2D-культури у вигляді моношару та 3D-культури у вигляді МС залежно від присутності ФТС. У культурах клітин наднирників неонатальних мишей не відбувається формування моношару та МС.

2. Етапи розвитку МС, отриманих з НН неонатальних кроликів і поросят та ДП неонатальних кроликів і мишей, є подібними. Вони полягають у агрегації клітин, ущільненні їх та набутті сферичної форми, збільшенні у розмірі.

3. Фенотиповими ознаками клітин дермальної папіли неонатальних кроликів за умов культивування є експресія нейральних маркерів β III-тубуліну та глутамінсинтетази, а також віментину як маркеру епітеліально-мезенхімального переходу. Клітини культури здатні до спрямованої індукції в нейрональному і остеогенному напрямках. Отримана пластичність клітин та набір фенотипових маркерів є характерними для клітин-похідних нервового гребеня.

4. Після інкубації клітин ДП кролика, на першому пасажі після інкубації в кріозахисних середовищах з концентраціями ДМСО вище 10% призводить до дозозалежного зростання кількості клітин з патологічним перебігом мітозу (на $10 \pm 3\%$ в порівнянні з інтактним контролем) та аномальною морфологією на $30 \pm 5\%$ в порівнянні з контролем. Ця тенденція не змінюється при додаванні білково-пептидних добавок альбуміну та альбутрисану. На другому пасажі кількість вищезначених аномалій клітин підвищувалася у культурах, інкубованих у кріозахисному середовищі з білково-пептидними добавками, або наставала загибель клітин у культурах, інкубованих у їх відсутності.

5. Кріоконсервування клітин ДП кролика, отриманих на першому пасажі після відігріву, з використанням кріозахисного середовища на основі 5% ДМСО та білково-пептидними добавками, та режиму охолодження 1 град/хв до -80°C із подальшим зануренням в рідкий азот, дозволяє отримати $98 \pm 1\%$ життєздатних клітин. При цьому сумарна кількість клітин з патологічним перебігом мітозу та аномальною морфологією складає $15 \pm 3\%$ в порівнянні з інтактним контролем. Кріоконсервовані клітин зберігають властивості експресії встановлених фенотипових маркерів та індукції в нейрональному і остеогенному напрямках. При застосуванні кріозахисних середовищ з концентраціями ДМСО вище 10% спостерігається збереження $90 \pm 2,5\%$ клітин, але на 20% підвищується кількість клітин з аномаліями морфології та мітозу. Додавання альбуміну та альбутрисану до кріозахисного середовища значуще не впливає на цей результат.

6. Кріоконсервування культур ДП у вигляді МС у кріозахисних середовищах з 5 та 10% ДМСО дозволяє зберегти адгезивність МС та здатність їх до розселення. В кріоконсервованих культурах спостерігалась тенденція до сповільнення процесів росту МС та міграції клітин з них в порівнянні з інтактним контролем. При цьому,

кріоконсервовані МС досягали контрольних розмірів на $5 \pm 0,5$ діб пізніше, тоді як моношар клітин, що виселялися з кріоконсервованих МС, досягав конфлуентності на $3 \pm 0,5$ діб пізніше, ніж в інтактному контролі.

7. Кріоконсервування фрагментів НН неонатальних поросят у режимі 1 град/хв до -80°C із подальшим зануренням в рідкий азот, дозволяє зберегти популяцію клітин, що експресують ХрА. Загальна кількість ХрА-позитивних клітин не змінюється після кріоконсервування, проте змінюється їх локалізація в процесі культивування. Кількість ХрА-позитивних клітин у складі моношару знижується з 13% (1 доба) до 2% (15 доба), проте збільшується в складі МС. Це свідчить про те, що 3D-культура є оптимальною формою для отримання попередників хромафінних клітин *in vitro*.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах України

1. **Новікова О.Ю.**, Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Морфологические особенности первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных разных видов. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Серія «Біологія». 2019. №33. С. 49–59. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2019-33-9>. (Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання первинної культури клітин з НН неонатальних свиней та кроликів, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).
2. **Новікова О.Ю.**, Сидоренко О.С., Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Влияние криоконсервирования на экспрессию хромогранина-А в культуре клеток надпочечников неонатальных свиней. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019. Т. 29, № 4. С. 344–353. <https://doi.org/10.15407/cryo29.04.344>. (Внесок здобувача: проведення експериментів з кріоконсервування моношару та МС з НН неонатальних свиней, аналіз мікрофотографій, отриманих за допомогою конфокального мікроскопа, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).
3. **Новікова О.Ю.**, Бондаренко Т.П. Характеристики нативной и криоконсервированной культур клеток дермальной папиллы вибрисс новорожденных кроликов. Вісник проблем біології та медицини. 2019. Т 3, № 1 (152). С. 54–57. (Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання та кріоконсервування первинної культури клітин ДП вібрис неонатальних кроликів, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).
4. **Новікова О.Ю.**, Бондаренко Т.П. Цитоморфологические нарушения в культуре клеток дермальной папиллы кролика после инкубации с диметилсульфоксидом. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019. Т 4 (6). С. 185–191. (Внесок здобувача: культивування клітин ДП вібрис неонатальних кроликів, приготування цитологічних препаратів, аналіз препаратів та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

Статті у фахових зарубіжних журналах

5. **Novikova O.**, Bozhok G., Bondarenko T. Effect of Incubation with Dimethyl Sulfoxide on the Mitotic Cycle of Cell Culture of Rabbit Dermal Papilla.

Recent Advances in Biology and Medicine. 2019. Vol. 5. P.6. <https://doi.org/10.18639/RABM.2019.882649>. (Внесок здобувача: проведення експерименту з інкубації клітин ДП вібрис неонатальних кроликів з ДМСО, приготування цитологічних препаратів, аналіз препаратів та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

6. **Novikova O.** Effect of Low-Molecular Fraction of Fish Peptide Albutrisan-Nr on In Vitro Neurogenesis. *Recent Advances in Biology and Medicine*. 2020. Vol. 6. P.5. <https://doi.org/10.18639/RABM.2020.1101035>. (Внесок здобувача: проведення експерименту з інкубації клітин ДП вібрис неонатальних кроликів з препаратом Албутрісан, підготовка препаратів до імуноцитохімічного аналізу, узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

Тези наукових конференцій

7. **Новикова О.Ю.**, Плаксина Е.М., Божок Г.А., Лаврик А.А., Бондаренко Т.П. Сравнительная морфологическая характеристика первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных. *Холод в біології та медицині – 2016: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та кріобіології*: мат. 40-ї щорічн. міжнар. конф. Молодих учених (м. Харків, 23–24 черв. 2016 р.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 178.
8. **Новикова О.Ю.**, Сидоренко О.С., Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Изучение экспрессии Хромогранина А в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят. *Холод в біології та медицині – 2018: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та кріобіології*: мат. 42-ї щорічн. міжнар. конф. Молодих учених (м. Харків, 23–24 трав. 2018 р.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018. Т. 28, № 2. С. 179.
9. **Новікова О.Ю.**, Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Культивування клітин дермальної папіли кролика in vitro в середовищах різного складу. *З'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнар. участю*: мат. з'їзду Київ, Україна, 26–28.05. 2019. С.101-102.
10. **Новікова О.Ю.**, Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Життєздатність та ростовий потенціал кріоконсервованої культури клітин дермальної папіли кролика. *The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation*, Yaremche, Ukraine, 18–21.2019. P. 163.
11. **Новікова О.Ю.** Cultivation of newborn rabbit vibrissa dermal papilla cells in vitro *XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України*: мат. всеукр. конф., м., Київ, Україна, 22-25 травня 2019. С. 15 – 16.
12. **Новікова О.Ю.**, Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из дермальной папиллы кролика. *Холод в біології та медицині – 2019: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та кріобіології*: мат. 42-ї щорічн. міжнар. конф. Молодих учених (м. Харків, 27–29 трав. 2019 р.). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019. Т. 29, № 2. С. 177.
13. **Новікова О.Ю.**, Г.А.Божок, Т.П. Бондаренко Cultivation of rabies virus in rabbit vibrissa dermal papilla cell culture. *Біоресурси та віруси*: мат. IX між нар. Симпозіуму, м. Київ, Україна, 09. – 11. 09. 2019. С.54.

14. **Новікова О.Ю.** Патологии деления в культуре дермальной папиллы кролика после криоконсервирования. *Научный форум: Медицина, биология и химия*: зб. ст. по мат. XXVIII міжнар. наук.-практ. конф. № 10(28), МЦНО, Москва, РФ, 2019. С.112.
15. **Новікова О.Ю.,** Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Влияние криоконсервирования на способность клеток-производных нервного гребня из дермальной папиллы вибриссы кролика индуцироваться в нейрональном направлении. *VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов*: зб. тез. АНО Іннов. центр Кольцово, Новосибірськ, 2020. С 642.

АНОТАЦІЯ

Новікова О.Ю. Морфофункціональні характеристики кріоконсервованих похідних нервного гребеня, отриманих з різних джерел. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Робота присвячена вивченню впливу кріоконсервування на клітини - похідні нервного гребеня (КПНГ), отримані з надниркових залоз (НН) поросят і кроликів, а також дермальних папілл (ДП) вібрис мишей і кроликів. Отримано первинні культури КПНГ у вигляді моношару (2D культура) і мультиклітинних сферідів (МС, 3D-культура).

Охарактеризований імунотип та потенціал до індукції нативної і кріоконсервованої КК ДП вібриси кролика. Після кріоконсервування ДП кролика показано збереження функціональних, фенотипичних властивостей і потенціалу до диференціювання. Після кріоконсервування у вигляді МС дещо сповільнюються ростові показники культур. Концентрації ДМСО понад 7,5% призводять до значного зростання числа цитологічних порушень в культурі. Білково-пептидні добавки дещо знижують пошкодження культури, тому їх використання в складі середовищ для кріоконсервування бажано.

Показано, що кріоконсервування зберігає популяцію ХрА-позитивних клітин в складі культури, особливо в складі МС.

Ключові слова: дермальна папіла, наднирники, нервовий гребінь, кріоконсервування, диметилсульфоксид.

АННОТАЦИЯ

Новикова О.Ю. Морфофункциональные характеристики кріоконсервированных производных нервного гребня, полученных из разных источников. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и кріомедицины НАН Украины, Харьков, 2021.

Работа посвящена изучению влияния кріоконсервирования на клетки – производные нервного гребня (КПНГ), полученных из надпочечников (НП) поросят

и кроликов, а также дермальных папилл (ДП) вибрисс мышей и кроликов. Получены первичные культуры КПНГ в виде монослоя (2D культура) и мультиклеточных сферидов (МС, 3D-культура).

Охарактеризован иммунофенотип и потенциал индукции нативной и криоконсервированной КК ДП вибриссы кролика. После криоконсервирования ДП кролика показано сохранение функциональных, фенотипических свойств и потенциала к дифференцировке. После криоконсервирования в виде МС, несколько замедляются показатели роста культур. Концентрации криопротектора ДМСО свыше 7,5% приводят к значительному возрастанию числа цитологических нарушений в культуре. Белково-пептидные добавки несколько снижают повреждение культуры, потому их использование в составе сред для криоконсервирования желательно.

Показано, что криоконсервирование сохраняет популяцию ХрА-положительных клеток в составе культуры, особенно в составе МС.

Ключевые слова: дермальная папилла, надпочечники, нервный гребень, криоконсервирование, диметилсульфоксид.

ANNOTATION

Novikova O.Yu. Morphofunctional properties of cryopreserved neural crest derived cells obtained from different sources. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences in specialty of 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

Morphological and functional properties of neural crest derived cell cultures (NCDC) were comparatively analyzed. Cell cultures isolated from the adrenal glands (AG) of pigs, rabbits and mice, as well as from the dermal papilla (DP) of mice and rabbits vibrissae form a monolayer and MS. While cultivation on a surface with reduced adhesion cell cultures no monolayer was formed but there were formed the floating MS. Cultures of mice AG under similar conditions did not form a monolayer or MS, the culture consisted of unstructured aggregates.

DP cell cultures of mice and rabbits formed MS when they were cultured in serum-free medium. The growth of spheroids lasted up to 12-14 days of cultivation, and they reached a size of 250-300 μm . All cultures had a high proliferative activity.

Cytochemical analysis of intact and cryopreserved cultures of rabbit DP showed expression of β III tubulin, vimentin, glutamine synthetase, i.e. early markers of epithelio-mesenchymal cells and the absence of S100 and C-kit. DP cells were induced to neuronal and osteogenic directions. Induction to the neuronal direction was confirmed by the changes in cell morphology and increased synthesis of β III tubulin. Specialization to osteocytes was verified an accumulation of calcium in the intercellular space, which was positively stained with alizarin red.

DP cells were exposed to DMSO-based media containing 5; 7.5; 10; 12.5; 15% cryoprotectant without supplements and with adding 5% bovine serum albumin (BSA), or 5%

Albutrisan (protein hydrolyzate, $\leq 5000\text{Da}$). It was found that DMSO concentrations above 7.5% did not disrupt cell integrity, but lead to a significant increase in pathologies in cell culture.

AG and DP cultures were cryopreserved with organ fragments, suspension and MS. The cooling mode consisted of two stages: cooling at a rate of 1 deg / min to -80°C and subsequent immersion into liquid nitrogen. DMSO solution in DMEM nutrient medium was used as a cryoprotective medium. After cryopreservation of AG and HF fragments, they retained the potential to form cell cultures *in vitro*. DP cells as re-suspended monolayer were cryopreserved using the above DMSO-based media and supplements. According to the results of staining with trypan blue, it was found that the number of damaged cells increased in proportion to the DMSO concentration. After seeding on the substrate, the morphology of cells in the monolayer was analyzed. In all variants of the used media with increasing the concentration of DMSO to 7% there was no significant rise in the level of pathologies compared to the control. In cells exposed to DMSO concentrations of 10 – 15 %, without protein components, there was a massive and significant vacuolation of the cytoplasm. Addition of protein-peptide supplements: 5% Albutrisan and BSA allowed the maintenance of the culture viability after exposure to high concentrations of cryoprotectant (12.5 and 15%).

When cultures were cryopreserved as MS, we used 5 and 10% DMSO, and the growth rate of MS and ability of the cells to migrate when transferred to adhesive conditions as was used as criteria for viability. It was revealed that the growth rate of the spheroid slowed down significantly after thawing: in native culture, the maximum size reached by MS was $235.00 \pm 17.78\ \mu\text{m}$, while in cryopreserved one it made 128.25 ± 16.5 .

The population of chromaffin cell precursors in primary AG was studied by expression of Chromogranin A (ChrA) in the intact and cryopreserved cultures. After cryopreservation of AG, they retained the potential for monolayer and MS formation *in vitro*, some cells were ChrA-positive. Cryopreservation did not significantly affect the number of cells expressing ChrA (32.9 ± 3.6 % in control and 31.1 ± 2.7 % in cryopreserved cultures). The number of ChrA-positive cells in the monolayer decreased during cultivation, probably due to the predominant growth of other faster proliferating subpopulations of cells. Evidence suggests that 3D culture is the optimal form for producing chromaffin cell precursors *in vitro*.

Key words: dermal papilla, adrenal glands, neural crest, multicellular spheroids , cryopreservation, dimethyl sulfoxide

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

КК – культура клітин; НН – наднирники; ДП – дермальна папіла; ГС – глутамінсинтетаза; МС – мультиклітинні сфероїди; ДМСО – диметилсульфоксид; ФТС – фетальна теляча сироватка; PBS (англ. *phosphate buffered saline*) – фосфатно-сольовий буфер; В27 – домішка до живильного середовища для культивування; КПНГ – клітини-похідні нервового гребеня.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 02.03.21

Формат 60 x 84 1/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.

Друк ксерографічний. Ум. друк. арк. 0,9.

Наклад 100 прим.Зам.№