

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційний наукова праця
на правах рукопису

НОВІКОВА ОКСАНА ЮРІЇВНА

УДК 57.085.23: 576.5

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

03.00.19 – кріобіологія

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ (підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Бондаренко Тетяна Петрівна, доктор біологічних наук,
професор

Харків 2021

АНОТАЦІЯ

Новікова О.Ю. Вплив кріоконсервування на морфофункціональні та імунофенотипічні властивості клітин-похідних нервового гребеня, отриманих з різних джерел . – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 «Кріобіологія» – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Робота присвячена порівняльному аналізу морфологічних та функціональних властивостей культур клітин-похідних нервового гребеня, отриманих з наднирників свиней, кроликів та мишей, а також з дермальної папіли вібриси мишей та кроликів.

На першому етапі роботи проводилося порівняння морфології виділених первинних культур за показниками здатності формувати 2D та 3D культури та до повторного субкультивування і розселення. У результаті було встановлено, що КПНГ, отримані з наднирників (НН) поросят та кроликів, здатні формувати моношар та МС. КПНГ з НН мишей при культивуванні в аналогічних умовах не виявляли здатності до формування моношару чи МС, культура була представлена агрегатами з 20-30 клітин, які не набували форми сфероїда з часом. При культивуванні на поверхні зі зниженими властивостями адгезії в культурах НН поросят і кроликів клітинний моношар не утворювався, а відбувалося формування флотуючих МС, які поступово збільшувалися в розмірах. До 7-9 діб розміри МС у культурах досягали 100 – 150 мкм.

При культивуванні в безсироваткових умовах культури ДП мишей та кроликів формували МС. Ріст сфероїдів продовжувався до 12– 14 доби культивування, і вони досягали розміру 250-300 мкм. Усі культури характеризувалися дуже високою проліферативною активністю. Було встановлено, що достатньою умовою для формування МС є відсутність ФТС

у ростовому середовищі. В якості замітника ФТС для культивування культур клітин НН використовували гідролізат альбуміну та ростову добавку В27.

Було проведено цитохімічний аналіз нативної та кріоконсервованої культур ДП кроликів. У результаті встановлено, що ККДП експресують β III тубулін, віментин, глутамін-синтетазу – ранні маркери епітеліо-мезенхімальних клітин та відсутність S100 (маркер астроцитів), а також маркера C-kit. Нативні та кріоконсервовані клітини мали однаковий профіль експресії фенотипічних маркерів.

Було проведено індукцію досліджених клітин у нейрональному й остеогенному напрямках. Індукція в нейрональному напрямку була підтверджена зміною морфології клітин та посиленням синтезу β III тубуліну. Спеціалізація в остеоцити підтверджувалась накопиченням кальцію в міжклітинному просторі, що позитивно зафарбовувався алізариновим червоним.

Для вивчення впливу кріопротектора ДМСО на суспензію клітин ДП було приготовано ряд його послідовних розведень у поживному середовищі: 5; 7,5; 10; 12,5; 15 %. Було досліджено 3 варіанти кріозахисних середовищ: лише з ДМСО; з додаванням 5% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) до всіх розведень ДМСО, та з додаванням 5% гідролізату білка Албутрісан, з аналогічними розведеннями ДМСО. Проводилася експозиція суспензії досліджених клітин ДП у приготованих кріозахисних середовищах. Було показано, що високі концентрації ДМСО (7,5% та вище) призводять до значного підвищення патологій у культурі клітин. Цілісність клітин, підрахована після забарвлення трипановим синім, була досить високою: мінімальна становила $84 \pm 8\%$ - у варіанті з використанням 15% ДМСО та 5% БСА, а максимальна досягала значень контролю і становила 98% у варіантах з додаванням 5 та 7,5% ДМСО.

Після підрахунку життєздатності культури висівались у планшети для подальшого культивування. Було відзначено, що під впливом високих

концентрацій ДМСО змінюється морфологія клітин у моношарі: вони стають більш компактними, у цитоплазмі з'являються численні вакуолі, на поверхні мембрани – пухирі (явище блеббінгу). Було встановлено, що найбільш прийнятним з точки зору безпечності є ростові середовища на основі ДМСО в концентрації 7,5% і нижче з додаванням білково-пептидних добавок. При цьому високі концентрації альбуміну підвищували токсичний вплив середовища.

Кріоконсервування культур НН та ДП проводилось у двох варіантах – суспензії та МС. Режим охолодження був однаковим для обох типів культур і складався з двох етапів: охолодження зі швидкістю 1 град/хв до -80°C та подальше занурення в рідкий азот. В якості кріозахисного середовища використовувався розчин ДМСО в поживному середовищі ДМЕМ.

Кріоконсервування клітин ДП у вигляді ресуспендованого моношару здійснювалося з використанням перелыченгих вище середовищ на основі ДМСО та добавок. Після зберігання в рідкому азоті протягом 2 місяців культури деконсервували шляхом швидкого занурення у водяну баню 37°C . Одразу після відтавання підраховували цілісність клітин шляхом фарбування трипановим синім. Було встановлено, що кількість пошкоджених клітин збільшувалась пропорційно до концентрації ДМСО. Значного впливу на адгезивні властивості клітин також не виявлено. Після висіву на субстрат було здійснено аналіз морфології клітин у моношарі. У всіх варіантах використаних середовищ при збільшенні концентрації ДМСО до 7 % не відбувалось значного збільшення рівня патологій порівняно з контролем. У клітинах, які пройшли експозицію з високими концентраціями ДМСО (10 - 15%), незалежно від додавання білкових компонентів, відбувалася масова і значна вакуолізація цитоплазми. Найбільшу частину патологій становили поліплоїдні клітини (з розмірами, що перевищують нормальний в 4-10 разів), клітини з мікроядрами і з декількома ядрами. Показано, що причиною появи багатоядерних клітин, до яких належать і клітини з мікроядрами, є передчасна конденсація хромосом у

клітинах, в яких не завершився S-період. Додавання білково-пептидних добавок: 5% білкового гідролізату тканин риб (молекулярна маса ≤ 5000 Да) і БСА модифікували вплив ДМСО. Найбільш значущим ефектом добавок було збереження життєздатності культури після впливу високих – 12,5 і 15% концентрацій кріопротектора. У той же час дані культури містили значний пул клітин з патологіями.

При кріоконсервуванні культури у вигляді МС використовували 2 концентрації ДМСО – 5 та 10%, в якості критеріїв життєздатності використовували швидкість росту МС та здатність до виселення клітин при перенесенні в адгезивні умови. Встановлено, що швидкість росту сфероїда значно уповільнюється після деконсервування: в нативній культурі максимальний розмір, якого досягають МС, становив $235,00 \pm 17,78$ мкм, тоді як у кріоконсервованій – $128,25 \pm 16,5$.

Дослідження популяції попередників хромафінних клітин, що є КПНГ, у первинній культурі НН досліджувалася шляхом вивчення експресії ХрА в нативній та кріоконсервованій культурах. Фрагменти надниркових залоз новонароджених поросят були кріоконсервовані з контрольованою швидкістю 1 град/хв у кріозахисному середовищі з 10% ДМСО. Вони зберігали потенціал до формування моношару та МС у культурі, частина цих клітин були ХрА-позитивними. Кріоконсервування істотно не впливало на кількість клітин, що експресують ХрА ($32,9 \pm 3,6$)% в контрольній і ($31,1 \pm 2,7$)% в кріоконсервованій суспензіях клітин порівняно з інтактним контролем. Було показано, що в первинній культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят з сьомої доби культивування знижується кількість ХрА-позитивних клітин, імовірно, за рахунок переважного зростання інших швидко проліферуючих субпопуляцій клітин, що свідчить про те, що 3D культура є оптимальною формою для отримання попередників хромафінних клітин *in vitro*.

Ключові слова: нервовий гребінь, наднирники, дермальна папіла, культура клітин, мультиклітинні сфероїди, кріоконсервування, мітоз.

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.

The present work is devoted to the comparative analysis of morphological and functional properties of cultures of cells derived from the neural crest, obtained from the adrenal glands of pigs, rabbits and mice, as well as from the dermal papilla vibrissae of mice and rabbits.

At the first stage of the work, the morphology of the selected primary cultures was compared in terms of the ability to form 2D and 3D cultures and before re-cultivation and resettlement. As a result, it was found that neural-crest –derived cells NCDC obtained from the adrenal glands (AG) of piglets and rabbits, are able to form a monolayer and MS. KPNG with LV mice when cultured in similar conditions did not show the ability to form a monolayer or MS, the culture was represented by aggregates of 20-30 cells that did not acquire the shape of a spheroid over time. When cultured on a surface with reduced adhesion properties in cultures of hair follicle (HF) piglets and rabbits, the cell monolayer was not formed, and there was the formation of floating MS, which gradually increased in size. By 7-9 days, the size of MS in cultures reached 100 - 150 μm .

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

It was found that a sufficient condition for the formation of MS is the absence of FCS in the growth environment. Albumin hydrolyzate and growth supplement B27 were used as a substitute for FCS for culturing LV cell cultures.

Cytochemical analysis of native and cryopreserved cultures of DP rabbits was performed. As a result, it was found that DP express β III-tubulin, vimentin, glutamine synthetase are the early markers of epithelio-mesenchymal cells and the absence of S100 (a marker of astrocytes), as well as the marker C-kit. Native and cryopreserved cells had the same phenotypic marker expression profile.

Induction of the studied cells in the neuronal and osteogenic directions was performed. Induction in the neuronal direction was confirmed by changes in cell morphology and increased synthesis of β III tubulin. Specialization in osteocytes was confirmed by the accumulation of calcium in the intercellular space, which was positively stained with alizarin red.

To study the effect of DMSO cryoprotectant on the suspension of DP cells, a number of its successive dilutions in nutrient medium were prepared: 5; 7.5; 10; 12.5; 15%. 3 variants of cryoprotective media were studied: only with DMSO; with the addition of 5% bovine serum albumin (BSA) to all dilutions of DMSO, and with the addition of 5% protein hydrolyzate Albutrisan, with similar dilutions of DMSO. The suspension of the investigated DP cells was exposed in the prepared cryosurfing media. It was shown that high concentrations of DMSO (7.5% and above) lead to a significant increase in pathologies in cell culture. Cell integrity, calculated after trypan blue staining, was quite high: the minimum was $84 \pm 8\%$ - in the version using 15% DMSO and 5% BSA, and the maximum reached the control values and was 98% in the variants with the addition of 5 % and 7.5 % DMSO.

After calculating the viability of the culture was sown in tablets for further cultivation. It was noted that under the influence of high concentrations of DMSO, the morphology of cells in the monolayer changes: they become more compact, numerous vacuoles appear in the cytoplasm, and blisters appear on the surface of

the membrane (blebbing phenomenon). It was found that the most acceptable from the point of view of safety are growth media based on DMSO at a concentration of 7.5% and below with the addition of protein-peptide additives. At the same time high concentrations of albumin increased the toxic effects of the environment.

Cryopreservation of AG and DP cultures was performed in two variants - suspension and MS. The cooling regime was the same for both types of crops and consisted of two stages: cooling at a rate of 1 deg / min to - 80 ° C and subsequent immersion in liquid nitrogen. A DMSO solution in DMEM nutrient medium was used as a cryoprotective medium.

Cryopreservation of DP cells in the form of a resuspended monolayer was carried out using the above media based on DMSO and additives. After storage in liquid nitrogen for 2 months, the culture was deconserved by rapid immersion in a water bath of 37 ° C. Immediately after thawing, cell integrity was counted by trypan blue staining. It was found that the number of damaged cells increased in proportion to the concentration of DMSO. Significant effects on the adhesive properties of cells were also not detected. After seeding on the substrate, the morphology of cells in the monolayer was analyzed. In all variants of the media used with increasing the concentration of DMSO to 7% there was no significant increase in the level of pathologies compared to the control. In cells exposed to high concentrations of DMSO (10 %- 15%), regardless of the addition of protein components, there was a massive and significant vacuolation of the cytoplasm.

Most of the pathologies were polyploid cells (with sizes larger than normal by 4-10 times), cells with micronuclei and multiple nuclei. It is shown that the cause of the appearance of multinucleated cells, which include cells with micronuclei, is the premature condensation of chromosomes in cells in which the S-period has not ended. Addition of protein-peptide additives: 5% protein hydrolyzate of fish tissues (molecular weight $\leq 5000\text{Da}$) and BSA modified the effect of DMSO. The most significant effect of the additives was the preservation of the viability of the culture after exposure to high - 12.5% and 15% concentrations of cryoprotectant.

At the same time, these cultures contained a significant pool of cells with pathologies.

When cryopreserving the culture in the form of MS used 2 concentrations of DMSO - 5 and 10%, as criteria of viability used the growth rate of MS and the ability to evict cells when transferred to adhesive conditions. It was found that the growth rate of the spheroid slows down significantly after deconservation: in native culture, the maximum size reached by MS was $235.00 \pm 17.78 \mu\text{m}$, while in cryopreserved 128.25 ± 16.5 .

The study of the population of chromaffin cell precursors, which is KPNG, in the primary AG culture was studied by studying the expression of ChrA in native and cryopreserved cultures. Fragments of the adrenal glands of newborn piglets were cryopreserved at a controlled rate of 1 deg / min in a cryoprotective medium with 10% DMSO. They retained the potential for monolayer formation and MS in culture, some of these cells were ChrA-positive. Cryopreservation did not significantly affect the number of cells expressing ChrA ($32.9 \pm 3.6\%$) in the control and ($31.1 \pm 2.7\%$) in the cryopreserved cell suspensions compared to the intact control. It was shown that in the primary culture of adrenal cells of newborn piglets from the seventh day of cultivation decreases the number of ChrA-positive cells, probably due to the predominant growth of other rapidly proliferating subpopulations of cells, indicating that 3D culture is the optimal form for chromaffin precursors cells in vitro.

Key words: neural crest, adrenal glands, dermal papilla, cell culture, multicellular spheroids, cryopreservation, mitosis.

ЗМІСТ

Анотація	2
Annotation	6
ЗМІСТ	10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	13
ВСТУП	15
Огляд літератури	22
1.1 Сучасні уявлення про формування нервового гребеня та його регіональних похідних: характеристика, формування, міграція.....	22
1. 2. КПНГ наднирників у період постнатального онтогенезу.....	24
1.2.1 Кріоконсервування КПНГ наднирників	27
1.3 КПНГ з дермальної папіли волосяного фолікула	28
1.3.1 Кріоконсервування клітин ДП.....	29
1.4 Формування та організація МС	31
1. 5. Фізичні та біохімічні аспекти впливу ДМСО в якості кріопротектора на культури клітин	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	39
2.1. Тварини	39
2.2. Виділення первинних культур КПНГ	39
2.2.1. Отримання культур клітин наднирників неонатальних тварин	39
2.2.2. Отримання культур клітин дермальних папіл вібрис неонатальних тварин.	40
2.3. Визначення життєздатності клітин	42
2.4. Субкультивування МС з культур КПНГ	42
2.5. Визначення коефіцієнту проліферації культури клітин	42
2.6. Визначення здатності до клонального росту	43
2.7. Кріоконсервування тканин НП, ВФ і культур КПНГ	44
2.8. Визначення здатності МС до адгезії	45
2.9. Визначення здатності клітин МС до міграції.....	45

2.10. Світлова мікроскопія	45
2.11. Забарвлення гематоксиліном і еозином.....	46
2.12 Імуноцитохімічний аналіз	46
2. 13. флуоресцентна мікроскопія	47
2.14. Індукція клітин ДП кроликів у нейрональному і остеогенному напрямках.....	48
2. 15. Цитологічний аналіз культур клітин ДП.....	48
2.16 Оцінка впливу кріопротектора на цитологічні характеристики культур клітин ДП	50
2.17. Проточна флуориметрія	50
2.18. Статистичний аналіз результатів.....	51
РОЗДІЛ III. Морфологічні та функціональні особливості КПНГ різних видів	53
3.1 Вибір об'єктів за морфологічними та функціональними особливостями культур, що формуються.....	53
3.2. Характеристики КПНГ при культивуванні у вигляді моношару та МС	63
3.2. Аналіз клоногенної здатності КПНГ з ДП	68
3.3. Фенотипічний аналіз КПНГ ДП	69
3.4. Здатність до індукції в остеогенному та нейрональному напрямках... ..	73
Розділ 4. вплив кріопротекторів та кріоконсервування на кпнГ дп	77
4.1 Вплив інкубації з кріопротекторами та кріоконсервування на морфологію та життєздатність ДП при культивуванні у вигляді моношару	77
4.2 Вплив інкубації з кріопротекторами на формування патологій поділу в КПНГ ДП при культивуванні у вигляді моношару	86
4.2.1 Вплив кріоконсервування на формування патологій поділу в культурах КПНГ ДП неонатальних кроликів	93
4.3 Вплив кріоконсервування на характер росту та розселення КПНГ ДП у вигляді МС	98

5. ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ПОПУЛЯЦІЮ ХРОМОГРАНІН-А ПОЗИТИВНИХ КЛІТИН В КУЛЬТУРІ КПІНГ НН ПОРОСЯТ	102
ЗАКЛЮЧЕННЯ	109
ВИСНОВКИ.....	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	121
ДОДАТОК А. Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації	144
Додаток Б. Апробація результатів роботи.....	145

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ПКМ – позаклітинний матрикс

ВФ – волосяний фолікул

ГС – глутамінсинтетаза

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ДП – дермальна папіла

КП – коефіцієнт проліферації

КПНГ – культура похідних нервового гребеня

МІ – мітотичний індекс

МКА – молекули клітинної адгезії

МС – мультиклітинні сфероїди

НН – наднирники

НГ – нервовий гребінь

ПФА – параформальдегід

РК – ретиноєва кислота

ФТС – фетальна теляча сироватка

ХрА – хромогранін А

ЦНС – центральна нервова система

В27 – добавка у живильне середовище для культивування

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

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

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

FBS (*fetal bovine sera*) – сироватка крові великої рогатої худоби

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

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

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

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Нервовий гребінь являє собою транзиторну ембріональну структуру, яка виділяється в процесі нейруляції з країв вздовж складки ектодерми, що утворює нервову трубку [1]. Потім клітини НГ мігрують, утворюючи багато похідних (нейрони ПНС та багато інших типів, включаючи клітини гладенької мускулатури серцево-судинної системи, пігментні клітини шкіри та черепно-лицьові кістки, хрящі та сполучну тканину). Частина цих клітин залишається мультипотентною і в період постнатального онтогенезу та забезпечує підтримку й самовідновлення регіональних клітинних субпопуляцій [2, 3].

Розв'язання проблем лікування патологій, що пов'язані зі збоєм нейрогуморальної регуляції, у значній мірі обумовлені недостатньою функцією клітин-похідних нервового гребеня (КПНГ). Саме тому технологія отримання терапевтичних продуктів на основі клітин НГ є актуальною проблемою для сучасної біології. Висока пластичність КПНГ показана в культурах, у багатьох роботах продемонстровано, що вони можуть спеціалізуватися як ортодоксально в похідні ектодерми (нейрональні та епідерміс), так і в похідні мезодерми у м'язи, хрящі, сполучну тканину [4, 5, 6]. Неодноразово була показана здатність КПНГ сприяти регенерації нервової та гліальної тканини в експериментах на тваринах [7, 8].

Саме тому культивування клітин НГ може допомогти у розв'язанні ряду практичних задач. Культури клітин з КПНГ мають значний регенеративно-відновлювальний потенціал у лікуванні нейродегенеративних захворювань периферичної нервової системи (ПНС) [9].

Культури клітин НГ можуть стати моделями для вивчення патологій розвитку НГ, зокрема процесу їх злоякісної трансформації та метастазування пухлин [10, 11].

Перспективним є використання 3D-культур, серед яких мультиклітинні сфероїди (МС), умови в яких більш подібні до умов в складі

тканини, що зумовлює збереження біологічних функцій. У ряді робіт показано, що в МС відбуваються специфічні для тканини динамічні взаємодії клітин між собою та з клітинним матриксом [12, 13]. Отже, більш доцільно використовувати МС в якості моделей патологій чи для замісної терапії при патологічних порушеннях тканин при розробці альтернативних способів лікування різноманітних патологій, пов'язаних із порушенням КПНГ.

Технологія отримання терапевтичних продуктів на основі клітин, як правило, включає культивування та кріоконсервування. Використання клітин після тривалого низькотемпературного зберігання потребує ретельного контролю матеріалу, оскільки кріопротектори та фазові переходи під час охолодження можуть пошкоджувати генетичний матеріал клітин [14].

Кріоконсервування є одним з найпоширеніших у практиці клітинного культивування методом, який дозволяє накопичувати і зберігати культури клітин протягом тривалого часу зі збереженням їхніх основних властивостей. Особливі переваги цей метод має при збереженні культур, отриманих від унікальних об'єктів (носіїв мутацій, рідкісних патологій, цінних видів). Він дозволяє створювати джерело стандартизованих клітин для дослідницьких і прикладних цілей. Метод кріоконсервування надає унікальні можливості, а саме: можливість синхронізації клітинних циклів об'єктів, отриманих в різний час, та масштабування і тривалого субкультивування клітин з метою клінічного застосування.

НГ є еволюційно консервативним утворенням, шляхи його міграції та сигналінгу показані для багатьох таксономічних груп хребетних [15, 16]. У той же час, етапи міграції і реакції на сигнали оточення, пов'язані з різними планами будови, можуть відрізнятись навіть у близьких таксономічних групах. Саме тому є актуальним порівняльний аналіз даних, отриманий на культурах клітин віддалених таксономічних груп. В якості об'єктів для отримання культур було вибрано кілька видів модельних тварин.

Хромафінні клітини мозкової речовини наднирників (НН) є однією з найбільш досліджених моделей КПНГ [17]. Накопичено достатній матеріал щодо властивостей культур цих КПНГ симпато-адреналової лінії [18]. Зокрема встановлено, що клітини, здатні до тривалого росту в умовах *in vitro*, здійснюють секрецію нейропептидів та катехоламінів, а також здатні набувати нейроноподібного фенотипу шляхом спрямованої індукції [19].

Підходи до культивування ліній клітин НН можна застосувати до менш вивченого типу КПНГ – клітин дермальної папіли (ДП). Клітини ДП є одним із двох типів стовбурових КПНГ, які зберігаються в постнатальному онтогенезі [20]. *In vivo* ці клітини формують усі структури вібриси та забезпечують ріст волосяного стрижня. При культивуванні поза організмом був показаний широкий потенціал до індукції в різних напрямках. Важливо, що отримання культур з цього типу клітин є малоінвазивним. До сьогодні достатньо не вивчений вплив кріоконсервування на ріст культур у вигляді 3D-сфероїдів.

З огляду на все сказане вище, вивчення морфофункціональних та імунофенотипових властивостей культур КПНГ отриманих з ДП та НН є актуальним як у нативній, так і в кріоконсервованій культурах.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріоендокрінології 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 - вивчення впливу кріоконсервування на морфологічні, функціональні, цитогенетичні властивості 2D- та 3D-культур, отриманих з НН та ДП неонатальних експериментальних тварин.

Для досягнення поставленої мети передбачалося розв'язати такі **задачі**:

1. Визначити джерело отримання неонатальних клітин НН та ДП, які здатні формувати МС за умов культивування, та провести порівняльну характеристику МС, отриманих з різних джерел.
2. Вивчити вплив складу живильного середовища на морфофункціональні властивості МС у культурі ДП неонатальних кроликів.
3. Оцінити проліферативний і диференціювальний потенціал клітин ДП неонатальних кроликів.
4. Вивчити вплив кріоконсервування на експресію хромограніна А в культурі клітин НН неонатальних свиней.
5. У порівняльному аспекті вивчити вплив різних концентрацій кріопротектора ДМСО та кріоконсервування на морфофункціональні характеристики культури клітин, отриманої з ДП у вигляді моношару (2D-культура) або МС (3D-культура).
6. Визначити вплив білково-пептидних добавок до кріозахисного середовища на основі ДМСО на морфофункціональні характеристики кріоконсервованої культури клітин, отриманої з ДП у вигляді моношару (2D-культура) або МС (3D-культура).

Об'єкт дослідження - вплив кріоконсервування у кріозахисних середовищах на основі ДМСО соло 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 були використані методи: ферментативного виділення клітин з наднирників, експлантів для виділення культур клітин ДП вібриси, моношарового (2D) та об'ємного (3D) культивування, програмного заморожування; імуноцитохімічний та цитофлуориметричний методи; цитологічного аналізу, світлової та

флуоресцентної мікроскопії, морфометричного аналізу, клонального аналізу та методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше отримана та культивована 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 з поживного середовища.

Уперше проведено успішне 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 прерозподіл субпопуляцій у культурі клітин НН в 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 в 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'єкта 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, розроблено та оптимізовано кріозахисне середовище для 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 літературний пошук, аналіз джерел з теми дисертаційної роботи та написані всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримані всі експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистичну обробку й зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором були інтерпретовані результати й зроблені остаточні висновки.

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

Особистий внесок здобувача в опублікованих роботах:

- у роботах [24, 25, 26, 31, 32] отримана первинна культура з дермальних папіл вібриси кроликів та мишей;

- у роботах [22, 23, 27, 32] отримана первинна культура з наднирників поросят, кроликів, мишей;
- у роботах [23, 24, 29,30] проведено експерименти з вивчення впливу ростових середовищ на морфологію культур клітин ДП новонароджених кроликів;
- у роботах [24, 25] проведено підготовку культур, приготування постійних цитологічних препаратів з культур клітин ДП новонароджених кроликів, здійснено підрахунок та аналіз патологий поділу;
- у роботах [22, 25] вивчення цитохімічних маркерів Хромограніна А, β -ІІІ-тубуліну, глутамінсинтетази, віментину, білка S100 в культурах досліджених клітин;
- у роботах [22, 30, 32, 34] проведено кріоконсервування культур клітин ДП та НН тварин.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасні уявлення про формування нервового гребеня та його регіональних похідних: характеристика, формування, міграція

Нервовий гребінь (НГ) - транзиторна ембріональна структура білатерально-симетричних організмів, яка мігрує з країв нервового жолобка, що зходяться при формуванні нервової трубки на всій його довжині. Хоча сам нервовий гребінь є тимчасовою структурою, мультипотентні клітини, які з нього мігрують, зберігаються в дорослому організмі в некомітованому вигляді [36, 20]. Популяція клітин НГ виникла і диференціювалася поступово в процесі еволюції хордових. Вважається, що поява популяції мультипотентних клітин НГ зіграла важливу роль у прогресивній еволюції черепних хребетних. Багато структур, які дозволили отримати еволюційну перевагу хребетним, виникли з НГ (включаючи формування черепа, залоз, периферійної нервової системи, похідних шкіри). На сьогодні відомо принаймні 21 тип клітин, що походять з НГ [37].

Початок міграції клітин НГ пов'язаний із так званою епітеліо-мезенхімальною трансформацією клітин, коли вони виділяються з пласту нейроепітелію нервової трубки, що замикаються і набувають зовнішніх ознак мезенхімальних клітин. [38].

Показано, що основне значення в ініціації міграції має втрата клітинами контактної зв'язки одна з одною, яка визначається молекулами клітинної адгезії (МКА) [39]. Відомі два типи МКА: Са-залежні МКА, так звані кадгерини, і Са-незалежні МКА, до яких належить, зокрема, нейрональна форма МКА (N-МКА). Міграція клітин визначається не тільки наявністю вільного міжклітинного простору й відсутністю механічних перешкод на шляху переміщення, але і взаємодією клітин з міжклітинною речовиною – позаклітинним матриксом (ПКМ). Глікопротеїди фібронектин і ламінін є основними компонентами ПКМ, які беруть участь у міграції клітин

НГ. У культурі клітин проявляється така їхня властивість, як здатність поширюватись лише по тих ділянках матриксу, що вкриті глікопротеїдами. Зв'язок клітин з компонентами ПКМ здійснюється особливим видом клітинних рецепторів - субстрат- зв'язуючими білковими молекулами, серед яких найбільш вивченими є так звані інтегрини [40].

Залежно від того, до якого відділу тіла належить, НГ розділяється на відділи і дає різні похідні в кожному відділі. У головному відділі з клітин НГ утворюються нейрони й гліальні клітини нервових гангліїв (черепно-мозкових нервів, слуховий, вестибулярний і циліарний ганглії) голови, кістки лицьового черепа, залози і лицьові та очні м'язи, одонтобласти [40, 41,42]. На рівні грудного відділу клітини НГ дають початок вегетативним гангліям внутрішніх органів, зокрема кишківника, серця, легенів, крім того похідними НГ цього рівня є деякі сполучнотканинні утворення серця. З тулубного відділу НГ утворюються чутливі спинномозкові ганглії і симпатичні пара- і превертебральні ганглії, мозкову речовину надниркових залоз, меланоцити шкіри. Сакральний відділ НГ бере участь в утворенні вегетативних гангліїв дистальних відділів кишківника і тазових органів [41].

Питання про рівень спеціалізації регіональних клітин залишалось відкритим до проведення експериментів з гетеротопічною трансплантацією фрагментів ембріонального НГ від перепелів до курчат. На прикладі формування холінергічних нейронів було показано, що розвиток клітин у певний тип визначається оточенням, але не задано топографічним положенням. [42]. Після цього здатність до направленої спеціалізації клітин НГ була доведена в умовах диференціації *in vitro*, шляхом індукції їх в меланоцити і нейрональні клітини [43]. Сьогодні мультипотентність клітин НГ показана в багатьох експериментах як *in vivo*, так і *in vitro*. Досліджено шляхи міграції та індукційний потенціал, у тому числі виявлена епітеліально-мезенхімальна трансформація в умовах нормального розвитку організму (при формуванні хрящів, кісток, сполучної тканини). Було показано існування

популяцій некомпітованих клітин, що мають характерний для НГ профіль маркерів у багатьох тканинах і органах, таких, як: міокард, шкіра, глія периферійної нервової системи, кишківник.

1. 2. КПНГ наднирників у період постнатального онтогенезу

НН - це залоза внутрішньої секреції, гормони якої підтримують гомеостаз організму, постійно й оперативно реагуючи на зміну умов зовнішнього та внутрішнього середовищ. Анатомічно й функціонально НН розділений на 2 шари - мозковий та кірковий. У кірковому шарі синтезуються кортикостероїди, що знаходяться в складі гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи, тоді як у мозковій речовині переважно синтезуються катехоламіни [44, 45]. У ссавців НН становить один єдиний орган, що формується з двох різних типів зародкової тканини - кіркова речовина походить з мезодерми, а мозкова речовина має спільне з периферійною нервовою системою походження і розвивається з симпато-адреналових похідних НГ [46].

Проблема формування такого складного органу, як НН не зрозуміла до кінця, оскільки механізми, що змушують об'єднуватися різні за походженням типи клітин, шляхи міграції та клітинні взаємодії досі не з'ясовані повністю. У той же час будь-які порушення складної системи міжклітинних взаємодій спричиняють розвиток великої кількості патологій - від психозів до синдромів, які зачіпають багато життєво важливих функцій (хвороба Аддісона, синдром Кушинга, адрено-генітальний синдром тощо). Крім того, передбачається, що деякі похідні симпатoadреналової лінії відповідальні за виникнення нейробластом, оскільки в більшості випадків локалізація пухлини знаходиться в мозковій речовині надниркових залоз [47].

У зв'язку з цим необхідні адекватні моделі для вивчення чинників, що впливають на формування нормальної клітинної архітектури як базису функціональної активності. Однією з таких моделей є культура клітин.

Останнім часом виявлено значну пластичність мозкових клітин надниркових залоз, зокрема їх здатність до трансформації в нейрональному напрямку і здатність до формування МС [48, 49, 50].

Хромафінні клітини мозкової речовини надниркових залоз разом з симпатичними нейронами спінальних гангліїв і дрібними гранулярними клітинами становлять симпато-адреналову (СА) лінію похідних НГ. На ембріонах мишей було показано, що мозкові клітини мігрують з групи хромафінних клітин, розташованих дорсально до зачатку надниркової залози, через медіальний краніальний кінець до зачатка надниркової залози починаючи з 13 доби гестації. Ці результати дозволили припустити, що клітини нервового гребеня використовують один і той же шлях для міграції до симпатичних дорсальних гангліїв, наднирковим і преаортальному ганглію, наднирковим залозам [51]. Можливо, ці клітини можуть здійснювати перехід між близькими в онтогенетичному відношенні лініями. Сьогодні відомо, що мігруючи, попередники катехоламінергічних клітин, агрегують в дорсальній аорті, а потім мігрують у вторинні симпатичні ганглії і мозкову речовину надниркових залоз, де вони диференціюються в зрілі симпатичні нейрони і хромафінні клітини [52, 53, 54]. Хромафінні клітини є найбільш інтенсивно вивченими похідними нервового гребеня. Хромафінні клітини мають багато спільних рис з нейронами: 1) отримують вхідні дані електричної та хімічної природи; 2) здатні розпізнавати ці сигнали; 3) мають механізм для генерації схеми реакцій вивільнення катехоламінів інших месенджерів, які здійснюють ефекти у віддалених частинах тіла [55, 56, 57].

Основними функціями хромафінних клітин є синтез і секреція катехоламінів та виділення нейропептидів, цитокінів, енкефалінів і нейротрофічних факторів. Крім того, хромафінні клітини також характеризуються пластичними властивостями, які включають здатність до проліферації протягом усього життя і здатність набувати нейроноподобний фенотип у відповідь на нейрогенну стимуляцію [19, 58].

Відомо, що катехоламіни, що синтезуються та секретуються нейроендокринними клітинами мозкового шару НН, входять до складу секреторних гранул та можуть бути візуалізовані шляхом мікроскопії. Одним зі структурних білків цих гранул є хромогранін А (ХрА) – білок, що характерний для клітин з високою секреторною активністю. Експресія хромограніну А корелює з кількістю секреторних гранул у нейроендокринних клітинах та є маркером їхнього нейроендокринного диференціювання, а також інколи свідчить про протікання неопластичних процесів у нейроендокринній системі [59]. ХрА – термостабільний гідрофільний кислий білок сімейства Гранінів, що входять до складу секреторних гранул [19]. Вивчення динаміки експресії ХрА в онтогенезі важливе для розуміння причин фізіологічних і патологічних збоїв в нейроендокринній системі. Даний білок включається в багато процесів біосинтезу на рівні апарату Гольджі, він вибірково перетворюється на пептиди, що регулюють рівень деяких біологічних функцій, включаючи клітинну проліферацію, ангіогенез і секрецію гормонів [60]. Крім того, він відіграє важливу роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію, оскільки має високу Са-зв'язуючу здатність. Завдяки цьому великі секреторні гранули з оптично щільними ядрами (large dense-core granules) фактично являють собою основний резервуар кальцію в нейроендокринних клітинах [61]. Експресія ХрА в клітинах НН на різних етапах культивування та при кріоконсервуванні може відображати зміни функціонального стану цих клітин та слугувати підтвердженням протікання характерних біосинтетичних процесів.

В процесі заморожування-відігріву будь-яка клітина зазнає трансформації, пов'язаної з порушеннях проникності мембрани, флуктуаціями об'єму, кількісними і якісними змінами внутрішньоклітинного вмісту. Важливим є вивчення динаміки експресії ХрА в клітинах мозкової речовини надніркових залоз та вивчення впливу факторів кріоконсервування на

біогенез секреторних гранул, в якому беруть участь практично всі компоненти ендомембранної системи [62]. Культура клітин наднирників неонатальних свиней є зручною моделлю, оскільки для неї розроблені способи культивування *in vitro* і кріоконсервування [63, 64].

1.2.1 Кріоконсервування КПНГ наднирників

На культурі фетальних клітин надниркової залози людини була показана можливість кріоконсервування мозкових клітин надниркових залоз, при цьому вони зберігають свої властивості. Було показано, що клітини після відтавання мали високу життєздатність і характерний для нативної культури фенотип [65]. При кріоконсервуванні у вигляді агрегатів відбувається міграція і зростання відростків, які можна порівняти за швидкістю з нативним контролем. Також у даному дослідженні була показана токсичність ДМСО при порівнянні виживання і ростових показників культур з відмиванням від ДМСО і без неї. [66].

На надниркових неонатальних свиней була показана можливість отримання і кріоконсервування культури клітин мозкового шару НН зі збереженням життєздатності і адезійних властивостей [67]. Кріоконсервування у вигляді мультклітинних сфероїдів і збереження нейронального індукційного потенціалу також було показано на культурах неонатальних НН свиней. [68].

Накопичено ряд даних, що стосуються трансплантації кріоконсервованих клітин НН. Можливість індукції в нейрональної напрямку і трансплантації мозкових клітин наднирників була показана для мозкових клітин надниркових залоз. Була зроблена трансплантація графтів, що містять дані клітини, у хвостаті ядро пацієнтів з хворобою Паркінсона, показана ефективність застосування як нативних, так і кріоконсервованих клітин [69]. При трансплантації кріоконсервованих фрагментів тканини наднирників

було показано, що кріоконсервування знижувало імуногенність і підвищувало приживлення алотрансплантантів у мишей з адреноектомією. [70]. Таким чином, застосування кріоконсервованих культур клітин медулярного шару НП має перспективи в трансплантології.

1.3 КПНГ з дермальної папіли волосяного фолікула

Пулуяція клітин шкіри, відома як клітини шкірного сосочка або дермальної папіли (ДП), є предметом великого наукового інтересу, оскільки ДП не тільки регулює розвиток і ріст волосяних фолікулів, але також вважається резервуаром поліпотентних стовбурових клітин.

Попередником волосяного фолікула є місцеве потовщення, також відоме як плакод, ембріонального епідермісу, яке виявляється в 14 - 15 день ембріонального розвитку миші та кролика. Незабаром після цього під плакодом утворюється локальна конденсація (шкірний конденсат) фібробластів. Взаємна передача сигналу між конденсатом і плакодом призводить до проліферації верхнього епітелію і розширення нового фолікула вниз в дерму. Після початкового зростання вниз клітини епітелію огортають шкірний конденсат, утворюючи тим самим зрілу ДП. Потім клітини волосяного сосочка дають сигнали навколишнім епітеліальним клітинам, які тепер є матриксними клітинами, проліферувати, рухатися вгору та диференціюватись у багат шаровий волосяний стрижень та каналу, що оточує волосяний стрижень, та каналу, що має назву канал волосяного кореня [71].

Про існування в шкірі клітин-попередників, здатних відновлювати шкірний та волосяний покрив, було відомо досить давно. Дослідження природи цих попередників показали, що вони тісно пов'язані в онтогенезі з волосяним фолікулом та походять з НГ. При відділенні їх в культуру була показана здатність до індукції в нейрони, глію, м'язи й адипоцити. Також була показана здатність до формування сфер, що містять до 1000 клітин і

тривалого (5 місяців) культивування в умовах *in vitro* зі збереженням індукційного потенціалу [71, 72]. Пізніше було показано, що клітини-попередники лицьової частини голови походять з нервового гребеня. Була показана їхня локалізація в дермальних папілах ВФ волосистої частини голови та вібрис як в ембріональному стані, так і в дорослих мишей [72]. Було показано, що клітини-попередники ДП і чохла кореня волосся походять з популяції Sox-позитивних клітин епітелію, що мають властивості стовбурових клітин. Слід уточнити, що тільки клітини ДП голови й обличчя походять із нервового гребеня, тоді як фібробласти спинного і вентрального стовбура - з дермоміотома сомітного і латерального походження. [73-76].

Були досліджені шляхи міграції похідних НГ в область ДП. Попередником волосяного фолікула є потовщення ембріонального епідермісу - зачаток, з якого під плакодою утворюється шкірний конденсат фібробластів. Взаємна передача сигналів між конденсатом і плакодою призводить до проліферації вищележачого епітелію й опускання фолікула в дерму [77]. Після первинного проростання вниз епітеліальні клітини обволікають дермальний конденсат, тим самим формуючи ДП. Дослідження рекомбінації тканин показали: клітини в дермі миші мають потенціал до формування фолікула задовго до формування дермального конденсату.

1.3.1 Кріоконсервування клітин ДП

Інтерес до кріоконсервування клітин ДП виник разом із відкриттям їхнього індукційного потенціалу, оскільки кріоконсервовані клітини можуть бути використані як для регенерації волосяних фолікулів, так і для отримання інших типів тканин шляхом індукції [78, 79]. Існує відносно мало даних про кріоконсервування клітин ДП (ВФ). Найчастіше метод кріоконсервування застосовується до культури клітин з метою тривалого зберігання, а в зв'язку з широким потенціалом до диференціації розглядається можливість терапевтичного клінічного застосування даного

типу клітин. Для цього недостатньо контролю життєздатності та збереження основних біохімічних маркерів культури, необхідно бути впевненим у відсутності генетичних і метаболічних змін. Морфологічний аналіз культури, що несе пошкодження клітин, може вказувати на процеси, що ведуть до накопичення патологій і загибелі клітин.

Спочатку була показана можливість кріоконсервування клітин ДП без введення їх у культуру *in vitro*, при цьому показана більш висока життєздатність клітин ДП у порівнянні з іншими типами епідермальних клітин. На підставі аналізу 9 фенотипових маркерів було продемонстровано, що співвідношення клітин ДП до епідермальних клітин шкіри в нативної культури тканини дерми після тріпсінізації складає 1:10, тоді як після кріоконсервування - 10:1. [80].

Пізніше були вивчені можливості отримання мультипотентних клітин з ДП при субкультивуванні. Показана можливість отримання мультипотентних клітин із кріоконсервованих волосяних фолікулів зі збереженням експресії нестін та індукційного потенціалу в нейрональному, м'язовому напрямках та кератиноцити [81, 82]. При порівнянні традиційного методу повільного охолодження з вітрифікацією показано перевагу поступового охолодження в збереженні життєздатності та експресії маркерів стовбурових клітин (нестін, Sox2, SSEA1) [83].

Показано також збереження потенціалу до формування волосся після кріоконсервування при трансплантації голим мишам. Відбувається деяке уповільнення експресії маркерів *in vitro* й відставання у формуванні судинної мережі та зростанні стрижня волосся при трансплантації, однак усі фолікули були життєздатні й показали високе приживлення після кріоконсервування. Дослідження кріоконсервування фолікулів у різних кріозахисних середовищах - з використанням ДМСО і гліцерину - показало краще зберігання й приживлюваність при трансплантації клітин з використанням ДМСО [84].

1.4 Формування та організація МС

Моношарове (2D) клітинне культивування є традиційною моделлю для дослідження поведінки клітин тих чи інших органів і тканин *in vitro*. При цьому можливо отримати відомості про швидкість проліферації клітин, їх метаболічну активність, гормональну продукцію, диференціювання і т.д [85, 86]. Однак для багатьох клітин організму моношарове культивування не є цілком адекватною моделлю, оскільки в складі тканини клітини знаходяться в певному мікрооточенні, яке створює специфічні умови їх функціонування. З огляду на це, останнім часом розробляються умови для 3D-культивування, що дозволяють отримувати багатоклітинні сферичні утворення [87]. У різних наукових джерелах автори називають їх по-різному: агрегатами, мультиклітинними сфероїдами (МС) або цитосферами [88-91]. Структура і розмір багатоклітинних утворень залежать від типу клітин, складу живильного середовища, адгезивності поверхні для культивування, використання спеціальних прийомів (культивування у висячій краплі, ротаційне культивування, тривимірні поверхні із заданою мікроструктурою) [92-94].

Здатність формувати багатоклітинні утворення властива багатьом типам прогеніторних клітин, у тому числі нейрональних. МС можуть містити у своєму складі різні типи клітин та міжклітинного матриксу і являють собою по суті 3D-моделі, що імітують умови формування тканини *in vivo* [95, 96]. Показана перебудова ультраструктури клітин при переході від моно шарового культивування до росту в складі МС. При цьому, при цьому ущільнюється цитоплазма, фрагментується ендоплазматична сітка, зменшується апарат Гольджі. Ознаки клітин в складі МС нагадують повернення до менш комутованого стану культури [97].

Через описані особливості, первинні культури МС стали широко використовувати для вивчення процесів нейрогенезу *in vitro*, а також для трансплантації тваринам з модельними патологіями нервової системи [19,

98]. На сьогодні можливість отримання МС - тривимірних однорідних утворень сферичної форми показана для багатьох типів клітин. Хоча вперше можливість отримання даних структур описана на ембріональних клітинах Holftreter (1944), Moscona (1952), пізніше стало відомо, що подібні структури формують і більш коммітовані лінії клітин.

Тривалий час культивування клітин *in vitro* здійснювалося на твердих субстратах, на яких клітини ростуть у вигляді 2D моношару. Проте було продемонстровано, що за відсутності поверхні прикріплення або каркаса клітини будуть агрегувати і піддаватися процесу самоорганізації у тривимірні МС [99, 100]. Така самоорганізація імітує природні процеси, які відбуваються під час раннього ембріогенезу, морфогенезу. З цим пов'язана здатність МС імітувати архітектурні та функціональні характеристики нативної тканини такі, як: МС кардіоміоцитів (що відтворюють серцевий ритм) [101], МС гепатоцитів (які мають метаболічні особливості печінки) [102], а також ендотеліальні клітини, фібробласти, що здатні здійснювати васкуляризацію [103].

На сьогодні панують уявлення, згідно з якими процес формування МС включає 3 основних етапи: 1) агрегація клітин, що знаходяться в близькому контакті – зближення і взаємодія через молекули позаклітинного матриксу (ПКМ); 2) швидка експресія E - кадгеринів на поверхні мембрани клітин у результаті міжклітинних контактів, що сприяє утриманню та з'єднанню клітин; 3) утворення щільних МС за рахунок встановлення зв'язків «кадгерин-кадгерин» між клітинами [105, 106]. Існують два основні способи збірки сфероїдів із суспензії : 1) на основі кластера; 2) самозбірки на основі зіткнення. При самозбірці на основі кластера дисперсні клітини розділяються на відсіки, осідають та агрегуються, утворюючи сфероїди. При самозбірці на основі зіткнення флотуючі клітини стикаються, утворюючи сфероїди [104]. Коли певні змішані клітинні популяції самостійно збираються, специфічна картина сегрегації, що відбувається, називається самосортуванням.

Розміри МС обмежуються можливостями пасивної дифузії та транспорту речовин через міжклітинні контакти. Встановлено, що коли діаметр сфероїда досягає 250 мкм, виникає градієнт концентрації кисню з найменшою його кількістю в центрі сфероїда [107]. Іншою проблемою, окрім дихання, є виведення продуктів обміну, які накопичуються всередині сфероїда, тому великі сфероїди розмірами близько 500 мкм розшаровуються на кілька функціональних зон, які відрізняються за активністю обмінних процесів та життєздатністю [105]. Клітини, що розташовані на периферії, активно діляться. Вони мають нормальну морфологію та активність обмінних та синтетичних процесів. Клітини проміжного шару знаходяться в стані зниженого метаболізму, не діляться, але можуть активуватися при високому вмісті поживних речовин у середовищі. У центрі МС знаходиться група мертвих клітин, які називаються некротичним ядром сфероїда. Таким чином, розміри МС та товщина шарів залежить від складу середовища, інтенсивності аерації (руху середовища), а також метаболічних і синтетичних характеристик самих клітин [105, 108].

1. 5. Фізичні та біохімічні аспекти впливу ДМСО в якості кріопротектора на культури клітин

Кріоконсервування є загальноприйнятим способом, що дозволяє зберігати культури рослинних або тваринних клітин у замороженому стані, щоб уникнути багаторазових пасажів для їх підтримки. Життєздатність та проліферативна активність клітинних культур зберігається на високому рівні після розморожування завдяки використанню спеціальних кріопротекторних середовищ, що дозволяють знизити пошкоджуючий вплив осмотичного стресу та кристалоутворення на клітинні структури [109, 110].

У більшості сучасних протоколів кріоконсервування клітин ссавців застосовуються кріозахисні розчини на основі ендоцелюлярного кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) [111, 112].

Диметилсульфоксид (ДМСО, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) - це високополярна речовина, що містить сульфанільну групу і дві неполярні метильні групи. Такі характеристики забезпечують амфіпатичні властивості молекули. ДМСО здатні розчиняти полярні й неполярні речовини та перебудовувати гідрофобні бар'єри, такі як плазматична мембрана [113,114]. У зв'язку з цим розчини ДМСО є гіперосмотичними і здатні викликати дегідратацію при зануренні в них клітин. Вакуолізація цитоплазми – явище, пов'язане з набуханням структур ЕПС, при масовому розвитку патологія може призводити до загибелі клітин. Осмотичний стрес, викликаний високими концентраціями ДМСО, може мати подібні наслідки. Якщо розглядати процес пошкодження мембранних структур у більш широкому інтервалі часу – години і доби, пошкодження також може бути викликано окисним форфорилуванням ліпідів мембран і зниженням їх загального вмісту [115]. У ряді робіт показано, що на противагу низьким дозам ДМСО у високих дозах відіграє роль прооксиданту, він значно посилює окиснювальну здатність комплексних сполук [116].

Хоча ефекти впливу ДМСО на структуру мембрани і дегідратацію були ретельно вивчені, сам механізм впливу ДМСО на ліпідні мембрани і роль води в цьому процесі тривалий час не була зрозумілою. Шляхом безпосереднього дослідження трансляційної дифузії води поблизу необмежених поверхонь ліпідних везикул було виявлено, що ДМСО послаблює поверхневу водну сітку поблизу ліпідної мембрани, знижує адгезію ліпідів до води й мінімізує пошкодження мембрани, спричинені фазовим переходом [117]. Однак при підвищенні концентрації зневоднення посилюється, оскільки вода спрямовується з клітини в простір, що утворився.

Показано, що механізмом, що захищає клітину від осмотичного стресу, є формування мікровезикул на клітинній мембрані. Гіперосмотичний стрес призводить до руйнування кортикального цитоскелету і відриву клітинної мембрани від кортикального цитоскелету, спричиняючи утворення клітинних

бульбашок. Множинні бульбашки знижують внутрішньоклітинний гідростатичний тиск, викликаний позаклітинним гіперосмотичним шоком, і послаблюють осмотичне пошкодження клітин, що знижує рівень смертності клітин [117]. До певних концентрацій клітинні бульбашки можуть ефективно захищати клітину [118].

ДМСО є активною в біологічному відношенні речовиною, яка взаємодіє з фосфоліпідами, що робить її ефективною для полегшення переміщення молекул, особливо ліків, через біологічні мембрани [119]. Кріозахисна дія ДМСО також ґрунтується на високій швидкості проникнення через біологічні мембрани і здатності утворювати множинні водневі зв'язки з молекулами рідкої фази клітини. Це призводить до зменшення ймовірності утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду, а також до зниження ефекту концентрування внутрішньоклітинних солей при негативних температурах, що зменшує ступінь кріоушкоджень клітини.

Однак ДМСО є агентом, який впливає на стан білків і нуклеїнових кислот у клітині, він здатний індукувати патологічні зміни в апараті ділення. Вплив ДМСО на клітку має кілька точок прикладання - це зміна проникності мембран для макромолекул, зміна осмотичного потенціалу цитоплазми, ремоделювання молекул біополімерів, у зв'язку з чим він має широке поширення в медицині та біології, у тому числі як кріопротектор. У численних роботах встановлена залежність характеру впливу ДМСО на клітину в залежності від його концентрації [120, 121]. При цьому поріг чутливості до впливу може бути різним для різних клітинних систем, у залежності від їх метаболічних особливостей. Показано, що ДМСО може безпосередньо підвищувати проникність мембрани та знижувати життєздатність клітин фетальної печінки та нервової тканини навіть після короткочасного впливу [90].

Вважається, що патологічний мітоз клітин є джерелом злоякісних пухлин і патологій розвитку [122]. При цьому згідно з сучасними

уявленнями, зміна нормального ходу мітозу і його зупинка є одним з варіантів програмованої клітинної загибелі, яку ініціює в мітохондріях каскадом реакцій у відповідь на стимули різного характеру [123]. Однак навіть при відсутності стимуляції мутагенезу в культурі *in vitro* можлива поява анеуплоїдії, особливо при множинних пасажах клітин [124]. Наприклад, показано, що при довгостроковому культивуванні плюрипотентні стовбурові клітини набувають кількісні і якісні хромосомні аберації [125], що є серйозним обмеженням для їх терапевтичного використання.

У літературі також є дані про здатність ДМСО знижувати проліферацію та індукувати апоптоз у культурі клітин за рахунок індукції синтезу про-апоптотичних білків [126, 127].

На культурі клітин лімфоцитів показано, що 1,5% ДМСО може інгібувати формування клітинного контакту і оборотно затримати клітини на початку G1 клітинного циклу, викликаючи затримку поділу і швидкості росту культури [124]. На культурі клітин гібридами мишей показано, що ДМСО впливає на синтез про-апоптотичного білка p53, модулюючи активність про-апоптотичних кіназ і регулюючи синтез циклонів. [124]. Можна припустити, що цей механізм є універсальним і вплив на перебіг мітотичного циклу в культурі ДП аналогічний наведеному. У нашій роботі встановлено, що в культурі ДП кролика відбувається повна зупинка поділу на 2 пасажі, в разі інкубації з ДМСО в концентраціях 12,5-15%.

ДМСО також впливає на цитоскелет на етапі формування мікротрубочок, шляхом зменшення ефективної концентрації води навколо мономерів тубуліну, що сприяє утворенню центрів нуклеації [128]. Внаслідок того, що полімери білка мають атипову структуру, вони утворюють коротші фібрили [129]. У зв'язку з цим, крім описаних ефектів на цитоскелет, важливою мішенню впливу ДМСО на клітину є центріолі. Зміни фібрил мікротрубочок можуть призводити до формування аномалій метафазної пластинки.

Імовірним наслідком порушень веретена є також формування мікроядер (МЯ), які ми також реєстрували в культурі. Слід розрізняти різні типи МЯ, оскільки механізми, що ведуть до їх формування, різні. МЯ формуються за двома основними механізмами – ацентричних фрагментів, що відстали при розриві хромосом – це МЯ «стандартного» типу, значно менші за розміром, ніж основне. Другий варіант – МЯ «основного» типу, однакового з ядром розміру, що формуються внаслідок утворення багатополюсного веретена поділу, відставання груп хромосом або відсутності цитокенезу.

Наслідком порушення веретена поділу є формування поліплоїдних клітин. У разі подальшого поділу поліплоїдних клітин, при нормальному перебігу процесів дуплікації, відбувається накопичення поліплоїдів у культурі і багатоядерних клітин, що й спостерігалось на другому пасажі. Виникнення багатополюсного веретена призводить до порушення сегрегації хромосом і виникнення анеуплоїдних клітин. Анеуплоїдія може призводити до відсутності пунктів контролю проліферації і порушення механізмів загибелі клітин. Клони нащадків таких клітин можуть служити основою для трансформації клітин і росту пухлин [130].

Показано, що ДМСО спричиняє на клітину ряд ефектів, включаючи модифікацію плазматичної мембрани і перебудову цитоскелету [131]. Відомий ефект впливу ДМСО на полімеризацію мікротрубочок, механізм якого полягає в зменшенні ефективної концентрації води навколо мономерів тубуліну, що сприяє утворенню центрів нуклеації [132]. Однак динаміка збирання та розбирання мікротрубочок у присутності даної речовини відрізняється від нормальної. Algaier J. і співавт. показали, що при обробці з 10% ДМСО довжина мікротрубочок зменшується [133]. Інкубація мишачих і кролячих ооцитів з 1,5 М ДМСО протягом 30 хв призводить до полімеризації мікротрубочок у вигляді зірчастих структур, асоційованих з періцентріольярним матеріалом [134]. У результаті змінюється конфігурація мейотичного веретена поділу. В умовах гіпотермії (4°C) ДМСО чинить

стабілізуючий вплив на мікротрубочки, якщо застосовується в концентраціях не нижче 0,75 М [135]. На ембріонах нематод описаний ефект ДМСО, при якому спостерігається надлишкова дуплікація центросоми з появою декількох дочірніх центріолей [136].

В багатьох роботах показано, що додавання до кріозахисних середовищ на основі ДМСО інших високомолекулярних добавок, дозволяє знизити його концентрацію та підвищити збереженість клітин. Найбільший досвід накопичений для середовищ з додаванням ФТС[137], проте такі проблеми, як можливість контамінації сторонніми агентами та залишки ксеногенних білків, що здатні сенситивізувати імунну систему, були приводами для пошуку альтернатив цьому компоненту [138].

В якості альтернативи використанню ФТС, були розроблені середовища з додаванням сироваткового альбуміну, поліетиленгліколю, полісахаридів, метилцелюлози тощо. При кріоконсервуванні різних типів клітин були отримані різні показники життєздатності клітин, тому розробка кріозахисних середовищ потребує індивідуального підходу до кріоконсервування різних типів клітин.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Тварини

Дермальні папіли та наднирники були отримані від неонатальних кроликів породи новозеландський білий, безпорідних білих мишей та поросят першого покоління гібридів порід велика біла/ландрас і макстер/дюрок. Всі тварини, що були використані для отримання тканин, мали нормальну морфологію, час від народження становив 1-2 доби.

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 необхідних 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).

2.2. Виділення первинних культур КПНГ

2.2.1. Отримання культур клітин наднирників неонатальних тварин

Суспензію клітин НН отримували методом ферментативної дезагрегації по раніше описаному протоколу [139].

Надниркові залози поросят (N=5), кроликів (N=15) та мишей (N=18) вилучали, поміщали в стерильний розчин PBS (Biowest, Франція), що містить антибіотик-антимікотик (пеніциліну 10000 ОД / мл, стрептоміцину 10 мг / мл, амфотерицину 25 мкг / мл у розведенні 1: 100) (Sigma, США). Біоматеріал подрібнювали на фрагменти розміром близько 1 мм³, які піддавали подальшій ферментативній обробці. Для цього використовували розчин на основі PBS, що містив 1 мг/мл колагенази 1-го типу (Sigma, США) і 0,1 мг/мл дезоксірибонуклеази (Sigma, США). Здійснювали 3 послідовні ферментативні обробки по 10 хвилин кожна, після кожного етапу за

допомогою серологічної піпетки збирали супернатант з суспензією клітин і переносили у пробірку з охолодженою ФТС (Sigma, США, або Biowest, Франція) для нейтралізації ферментів. До осаду додавали свіжий ферментативний розчин. Суспензію клітин, отриману після ферментативних обробок, збирали в 1 пробірку і двічі відмивали PBS шляхом центрифугування протягом 15 хвилин при 300 g. Після відмивання суспензію клітин фільтрували через нейлонове сито з діаметром пор 125 мкм для видалення клітинного дебрису. Здійснювали ресуспендування осаду здійснювали підрахунок клітин в камері Горяєва. Висів клітин здійснювали в концентрації 1×10^4 клітин/см².

Культивування проводили при 37°C при 5% CO₂ в інкубаторі в чашках Петрі (ЧП, SPL, Німеччина) для культивування клітин. В якості ростового середовища використовувалася ДМЕМ (Biowest, Франція) з додаванням 10% ФТС. Пересів здійснювали шляхом дезагрегації моношару за допомогою розчину Версену (ПанЕко, РФ), що містив 0,05% трипсину (BioWest, Франція).

Отримання первинної культури клітин НН і подальше культивування здійснювали за однаковими протоколами для всіх досліджених видів тварин.

2.2.2. Отримання культур клітин дермальних папіл вібрис неонатальних тварин.

Отримання культури клітин ДП мишей (N=15) та кроликів (N=20) проводили методом експлантів за оригінальною методикою. Для цього отримували фрагменти шкіри новонароджених кроликів і мишей, що містили вібриси. За допомогою пінцета відділяли верхній шар дерми, вилучали ВФ вібриси. З ВФ під збільшенням бінокулярного мікроскопа, за допомогою препарувальної голки, ізолювали ДП (рис. 2.1) і поміщали в 6-лункові планшети (РАА, Австрія), вкриті розчином 10%-го желатину (Генезис, Україна).

Для культивування використовували живильне середовище ДМЕМ / F12 (BioWest, Франція) з додаванням 10% ФТС (BioWest, Франція) і 1% розчину антибіотика-антимікотика. ДП видаляли з культури через 3 доби, і продовжували культивувати клітин, що прикріпились. При досягненні конфлуентного моношару клітини відкріпляли від поверхні сумішшю 0,05% розчину трипсину у Версені в співвідношенні 1:1 і в подальшому субкультивували у вигляді моношару або МС.

Для отримання моношару культури клітини пересівали на ЧП площею 9,6 см². Посівна концентрація становила 1×10^4 клітин/см². Використовували класичне ростове середовище ДМЕМ/F12 з додаванням 10% ФТС. Заміну середовища здійснювали кожні 3 доби. Пересіви культури, як описано в п. 2.2.1 здійснювали 1 раз на 5-6 діб.

Для отримання МС використовувався ряд ростових середовищ на основі ДМЕМ / F12, що містили в якості факторів росту такі добавки:

1. 10% ФТС;
2. 1% ФТС;
3. 1% ростової добавки для нейрональних культур В 27 (Sigma, США);
4. 1% В27 в поєднанні з 10 нг / мл FGF, 5 нг / мл NGF (Sigma, США);
5. 1% ростової добавки для нейрональних культур Нейромакс (ПанЕко, РФ)
6. 1% розчину альбуміну ВРХ (Biowest, Франція);
7. 1% субстанції Албутрісан NR (Харків, Україна) – гідролізат тканин риб, з молекулярною масою пептидів менше 5 кДа;

В якості ростового середовища також використовувалося середовище для безсироваткового культивування Гібріс (ПанЕко, РФ), що містить у своєму складі всі необхідні мітогени й нутрієнти.

Використовували ЧП з адгезивною і неадгезивною поверхнями. У першому випадку були використані ЧП для клітинних культур (SPL, Німеччина), у другому - пластикові мікробіологічні ЧП (SPL, Німеччина), оброблені за методом Hammarback [140].

2.3. Визначення життєздатності клітин

Кількість та життєздатність клітин у зразках підраховували з використанням камери Горяєва. Для забарвлення клітинної суспензії використовували 0,4% розчин трипанового синього, який додавали до суспензії клітин у співвідношенні 1:1.

Життєздатність клітин визначали як відношення кількості незабарвлених клітин до їх загальної кількості та виражали у відсотках.

2.4. Субкультивування МС з культур КПНГ

Флотуючі МС, сформовані в культурах з НН або ДП, переносили в пробірки типу фалькон з конічним дном, відстоювали в умовах термостату при 37 °C протягом 10 хвилин та піпеткою переносили в ЧП з адгезивною поверхнею чи ЧП у живильне середовище ДМЕМ з 10% ФТС або ДМЕМ з 2% безсироваткової ростової добавки, в залежності від завдінь експерименту. При перенесенні в середовище з ФТС, спостерігали прикріплення МС та міграцію клітин з них, підраховували кількість МС, що потрапили в кожен ЧП чи лунку планшета.

При необхідності диспергування МС та отримання вторинних сфероїдів, здійснювали ферментативну обробку МС. Для цього проводили ферментативну обробку розчином 0,05% трипсину у розчині Версена. МС інкубували в описаному розчині протягом 20 хвилин, після чого здійснювали інтенсивне струшування та перемішування за допомогою піпетки для відокремлення клітин. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва, в присутності розчину трипанового синього для виключення з підрахунку нежиттєздатних клітин.

2.5. Визначення коефіцієнту проліферації культури клітин

Визначення коефіцієнту проліферації проводилося для визначення відносної активності поділу клітин. Для цього, проводився підрахунок клітин в камері Горяєва, в присутності розчину трипанового

синього (0,02%) для виключення з підрахунку пошкоджених клітин. Після цього, здійснювали підрахунок концентрації клітин на кінцеву добу культивування, в залежності від умов експерименту. Для цього проводилось диспергування моношару чи МС за допомогою 0,05% трипсину у розчині Версена та підрахунок кількості клітин в камері Горяєва. Визначення коефіцієнту проліферації вираховували за формулою:

$$КП = a/b,$$

де а – кінцева концентрація клітин; b – початкова концентрація клітин.

2.6. Визначення здатності до клонального росту

Здатність до клонування визначали на нативних культурах клітин 2-го та 3-го пасажів, що культивувалися у вигляді МС на 10 добу росту. Для цього здійснювали ферментативну обробку розчином 0,05% трипсину у розчині Версена. МС інкубували в описаному розчині протягом 20 хвилин, після чого здійснювали інтенсивне струшування та перемішування за допомогою піпетки для відокремлення клітин. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва, в присутності розчину трипанового синього для виключення з підрахунку нежиттєздатних клітин. Супензію клітин розводили поживним середовищем для культивування до розрахованої концентрації 5 клітин/ мл. Після цього здійснювали висів клітин в 96-лункові планшети для культивування клітини (РАА, Австрія) в об'ємі 200 мкл/лунку. Ростове середовище використовували аналогічного складу як при культивуванні МС: ДМЕМ з додаванням 2% нейромакс. Після висіву проводили підрахунок фактичної кількості клітин, що потрапила в кожен лунку, відмічали лунки, в які потрапило по 1 клітині, та проводили спостереження за ними протягом 14 діб, звертали увагу на поділ клітин, збільшення їх кількості.

2.7. Кріоконсервування тканин НН, ВФ і культур КПНГ

Кріонсервування здійснювали як на етапі отримання фрагментів тканини (волосяних фолікулів та наднирників), так і на етапі культивування – у вигляді суспензії та МС.

Для заморожування фрагментів тканини спочатку проводили механічне подрібнення тканини, після чого переносили до кріозахисного середовища та витримували 20 хвилин для насичення кріопротектором. При кріоконсервуванні НН поросят раннього неонатального віку (1-3-я доба після народження), НН вилучали і кожен подрібнювали на 5-6 фрагментів. Одну частину фрагментованих наднирників заморожували, а іншу залишали для отримання культури клітин. Кріозахисне середовище включало 10% ДМСО та 90% ДМЕМ. Швидкість заморожування становила 1 град/хв.

Суспензію клітин отримували шляхом диспергування моношару та центрифугування (10 хвилин при 300 g). Отриманий осад клітин переносили до кріозахисного середовища, гомогенізували та переносили до кріопробірок для негайного охолодження.

МС збирали піпеткою з дна лунки для культивування та переносили до кріопробірок, що містили середовище для кріоконсервування.

Для кріоконсервування всіх типів культур клітин використовувались кріопробірки («SPL», Німеччина). Заморожування зі швидкістю охолодження 1 град / хв до -80° [141, 142]. Початкові етапи охолодження здійснювали на програмному заморожувачі «ЗПМ-1» (НПК «Отел», Україна), потім кріопробірки занурювали в рідкий азот і зберігали до використання.

Кріозахисне середовище складалося з ДМЕМ («Biowest», Франція), диметилсульфоксиду (ДМСО) та білково-пептидних добавок у різних концентраціях, залежно від схеми експерименту.

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 центригування у звичайному режимі. МС відмивали без центрифугування.

2.8. Визначення здатності МС до адгезії

Здатність МС до адгезії визначали через добу після субкультивування або кріоконсервування, підраховуючи кількість фероїдів, що вносили до лунки та кількість сфероїдів, що прикріпилися через добу після висіву. Здатність до адгезії вираховували за формулою:

$$A = (1 - a/b) \times 100\%,$$

де а – кількість флотуючих МС; b – загальна кількість внесених до лунки МС.

2.9. Визначення здатності клітин МС до міграції

Визначення здатності клітин МС до міграції вивчали після пересіву або розморожування МС і культивування їх у стандартних умовах упродовж доби (адгезивна поверхня, середовище DMEM з додаванням антибіотиків і 10% ФТС чи безсироваткових ростових добавок при 37°C і 5% CO₂). Підраховували загальну кількість МС після висіву та кількість МС, з яких почалась міграція клітин за добу після висіву. Відносну здатність клітин МС до міграції вираховували за формулою:

$$B = (a/b) \times 100\%,$$

де а – кількість МС з клітинами, з яких почалося виселення клітин; b – загальна кількість внесених до лунки МС.

2.10. Світлова мікроскопія

Прижиттєву мікрофотозйомку здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа МІБ-Р (Ломо, РФ) з відеокамерою. Мікроскопіювання 2-D и 3-D культур проводилося з використанням світлового мікроскопа Leica-2000 та AmScore, модель XYL-403 (Китай) з цифровими камерами. (Германія). Морфометричний аналіз проводили за мікрофотографіями з використанням програми TourView 3.7 та LAN.

2.11. Забарвлення гематоксиліном і еозином

Клітинний моношар фіксували в 4% параформальдегіді (ПФА, («Sigma», США) упродовж 30 хвилин, відмивали PBS та забарвлювали гематоксиліном Караччі впродовж 10 хвилин. Клітини промивали проточною водою, після чого поміщали на 2 хвилини в еозин. Відмивали PBS та одразу використовували для мікроскопічного аналізу.

2.12 Імуноцитохімічний аналіз

Для імуноцитохімічного аналізу 2D-моношару і 3-D-прикріплених сфероїдів фіксували в 4% розчині ПФА протягом 15 хв. Відмивали PBS 3 рази по 5 хвилин. Пермеабілізацію проводили в 0,3% розчині Triton X-100 протягом 10 хвилин. Блокували неспецифічне зв'язування антитіл розчином PBS, що містить 0,1% Triton X-100, 1% БСА, протягом 1 години при кімнатній температурі.

Для непрямого мічення використовували перші і другі антитіла, специфікація і концентрація яких вказана в таблиці 2.1. Інкубацію з першими антитілами проводили при 4 ° С протягом ночі, потім відмивали 3 рази PBS. Інкубацію з другими антитілами проводили при кімнатній температурі протягом 30 хвилин у темряві, потім відмивали 3 рази PBS. Для візуалізації ядер фіксовані клітини після інкубації з антитілами фарбували розчином Hoechst 33342 (5 мкг/мл, «Sigma»). При забарвленні культур НН антитілами до ХрА, для контрастування ядер використовували пропідій-йодид (1 мкг/мл). Специфічність забарвлення антитілами підтверджувалась за допомогою контролів, при яких реакція проводилася лише з вторинними антитілами.

Таблиця 2.1.

Антитіла для імуноцитохімічних досліджень

№ п/п	Антитіло	Мішень	Кон'- югат	Розве- дення	Фірма, країна- виробник
1	Rabbit Anti-Chromogranin A	Адреномеду- лярна клітина	-	1:100	Abcam, Cambridge, Великобританія
2	Rabbit Anti-Glutamine Synthetase	Мантійний глиюцит	-	1:600	Abcam Cambridge, Великобритані я
3	Rabbit Anti-Vimentin	Нейрон, прогеніторна ектодермальна клітина	-	1:400	Abcam Cambridge, Великобританія
4	Mouse Anti-Neuron specific beta III Tubulin	Нейрон, нейробласт	-	1:200	Abcam, Cambridge, Великобританія
5	Mouse Anti-S100	Астроцит, клітина Шванна	-	1:500	Abcam, Cambridge, Великобританія
6	Goat Secondary Antibody to Rabbit IgG	IgG кролика	Alexa Fluor 488	1:500	Abcam, Cambridge, Великобританія
7	Goat Secondary Antibody to Mouse IgG	IgG миші	HiLyte Fluor 488	1:400	Abcam, Cambridge, Великобританія

2. 13. флуоресцентна мікроскопія

Флуоресценцію клітин, мічених антитілами або флуорисцентним ядерним барвником, оцінювали на лазерному конфокальному мікроскопі

Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Німеччина) та мікроскопі Leica-2000 (Німеччина) з флуорисцентним освітлювачем. Використовували програми для аналізу й обробки зображень AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Німеччина), LSM Examiner (Carl Zeiss, Німеччина) та LAN (Leica, Швейцарія). У кожному випадку використовували відповідні налаштування збудження та емісії флуоресценції.

2.14. Індукція клітин ДП кроликів у нейрональному і остеогенному напрямках

Для отримання КПНГ, індукованих в нейрони та остецити, використовували культури клітин ДП на 2-3 пасажі, що формують моношар клітин з необхідною морфологією.

З метою індукції в нейрональному напрямку було використане середовище ДМЕМ/F12, що містило 2% ростової добавки нейромакс, 10^{-6} Ммоль ретиноєвої кислоти, 10 нг / мл NGF, 10 нг / мл EGF.

Для остеоіндукції використовувалось середовище, що містить 2% ФТС, 50 мкМ аскорбата, 10 мМ β -гліцерофосфату, 0,1 мкМ дексаметазону.

Середовища для індукції спеціалізації вносилися до лунок планшета з моношаром, що досягав 80-90% конфлуентності на 2 добу культивування. Зміна середовища на свіже аналогічного складу проводилася 1 раз на 3 доби. Паралельно із заміною середовища здійснювали візуальний контроль за змінами в морфології культур клітин. Підтвердження остеоіндукції підтверджували шляхом забарвлення моношару розчином AlizarinRedна 21 добу культивування. Для визначення нейрональної індукції використовували специфічні антитіла до β III-тубуліну, оцінюючи інтенсивність забарвлення та форму клітин порівняно з контролем.

2. 15. Цитологічний аналіз культур клітин ДП

Для отримання цитологічних препаратів клітини пересівали на покривні скельця (MICROmed, Україна), поміщені в 6-лункові планшети для

культивування клітин (SPL, Німеччина). Посівна концентрація становила $4 \cdot 10^4$ клітин / см³.

Культивування проводили протягом 48 годин, після чого скельця, на яких культивувались клітини, виймали з культуральних планшетів і послідовно зневоднювали в розведеннях спиртів. Препарати послідовно занурювали й витримували протягом 3-4 хвилин у таких розчинах: PBS, спирт-оцтовий фіксатор (1:1), 96% етанол, 70% етанол, вода дистильована, барвник гематоксилін Карачі, вода дистильована, 70% етанол, 96 % етанол, суміш етанол-ксилол (3:1), ксилол-етанол (3:1). Після цього препарати висушували при кімнатній температурі і заключали в канадський бальзам.

Патології вивчали на фіксованих препаратах культур клітин ДП 1 та 2 пасажів. У кожному препараті підраховували 1000 клітин. Результати виражали в проміле (‰).

На кожному препараті окремо враховували такі категорії клітин: клітини, що не поділяються (інтерфаза); клітини, нормально діляться (без видимих патологій), клітини з патологічним перебігом мітозу і клітини в інтерфазі, що мають патології як наслідок патологічного мітозу.

Серед патологій інтерфази виділяли наступні: поліплоїдні клітини (клітини, розмір яких перевищував звичайні розміри в 4-10 разів), клітини з кількома ядрами, з мікроядрами (МЯ), з ядрами аномальної форми. Також траплялися клітини на різних термінальних стадіях апоптозу, з конденсованими хроматином, пікнотичними ядрами; такі, що формують апоптотичні тільця. Як окремий вид патології оцінювалося формування мікровезикулярних частинок на поверхні клітин - т.зв. блеббінг.

Серед патологій поділу виділяли: дефекти центромер і агрегації хромосом; мультиполярний, асиметричний, моноцентричний мітоз; тригруппова, пола метафаза; хромосомні мости і хромосоми, що відстають. Відносне число патологій визначали як відношення числа клітин з

патологічним мітозом до загальної кількості клітин, які діляться і виражається у проміле.

2.16 Оцінка впливу кріопротектора на цитологічні характеристики культур клітин ДП

Розчини ДМСО в концентраціях 5%; 7,5%; 10; 12,5%; 15% були приготовані на основі живильного середовища ДМЕМ / F12. Половина розчинів містила 5% бичачого сироваткового альбуміна (БСА, BioWest, Франція) або Препарат Албутрісан на основі пептидів риб з молекулярною масою пептидів до 5 кДа (Харків, Україна) в якості пептидної стабілізуючої добавки.

Інкубації в розчинах з ДМСО піддавалися клітини 1 пасажу. Для цього до осаду клітин, знятих з поверхні культивування, додавали розчини з подвійною концентрацією ДМСО, БСА, Албутрісан витримували протягом 25 хвилин при кімнатній температурі, після чого здійснювали центрифугування (300g, 5 хв). Після цього видаляли, а клітини відмивали шляхом центрифугування в тому ж режимі. Таким чином, загальний час контакту клітин з досліджуваними кріозахисного середовищами становило 30 хвилин. Далі клітини поміщали в умови культивування, як описано вище. Контролем слугували клітини, які були інкубовані в живильному середовищі без кріопротектори і білково-пептидних добавок.

Культивування проводили протягом 48 годин, після чого культури фіксували і готували цитологічні препарати за стандартною методикою, описаною в п.2. 11.

2.17. Проточна флуориметрія

Метод проточної цитофлуориметрії використовували для визначення ХрА в культурі клітин НН. Раніше було встановлено, що в суспензії клітин, отриманих ферментативним способом з надниркових залоз, присутні кілька типів клітин, частина з яких прикріплені до субстрату, а частина флотуючі

[142]. Для вивчення динаміки експресії ХрА в культурі необхідно враховувати обидві субпопуляції клітин - прикріплену і флотуючу.

Кожні три доби культивування збирали живильне середовище з неприкріпленою клітинами (флотуюча субпопуляція). Кожні три доби збирали поживне середовище з неприкріпленими клітинами (флотуюча субпопуляція). Моношар клітин знімали з поверхні культурального пластика, диспергуючим розчином, відмивали при 300 g (прикріплена субпопуляція) 10 хвилин. Культури клітин нативних та кріоконсервованих культур впродовж 15 мин фіксували 2%-м розчином ПФА («Sigma», США), відмивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) при 300 g та пермеабілізували 0,02%-м розчином сапоніна («Calbiochem», США) протягом 30 хв.

Зразки фарбували першими кролячими антитілами до ХрА («Abcam», Великобританія) в розведенні 1: 200. Інкубували з антитілами в розчині PBS (рН 7,4) з додаванням 0,02% Triton X-100 («Sigma») протягом 12 год при температурі 4° С, потім двічі відмивали в PBS. Фарбування другими антитілами проти кролячих антигенів Alexa488 («Abcam») в розведенні 1: 400 проводили протягом 30 хв в темряві при кімнатній температурі. Неспецифічну флуоресценцію оцінювали при інкубації клітин тільки з другими антитілами проти кролячих антигенів Alexa488. Аналіз проводили на цитофлуориметрі «FACSCalibur» («BDBioscience», США) за допомогою програм «CellQuestPro» («Becton Dickinson», США) і «WinMDI 2.8» (США).

2.18. Статистичний аналіз результатів

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

даних цитологічних досліджень оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ III. МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КПНГ РІЗНИХ ВИДІВ

3.1 Вибір об'єктів за морфологічними та функціональними особливостями культур, що формуються

Деривати НГ можна знайти в період постнатального онтогенезу у багатьох груп хребетних тварин. Більшість його похідних формує спеціалізовані тканини дорослого організму, проте частина лишається якийсь час в не індукованому стані, особливості цих похідних можуть залежати від виду тварини та тканини, з якої їх отримують. Від вдалого вибору об'єкту досліджень залежить те, наскільки відтворюваними будуть отримані результати та універсальними характеристики КПНГ. Ми вирішили в якості видів-кандидатів обрати розповсюджені об'єкти досліджень – мишей, кроликів та свійських тварин – свиней. В якості органа – джерела ми обрали НН, в яких доведено існування пула не індукованих КПНГ, здатних формувати МС, які вже досить добре досліджені. Для порівняння ми обрали клітини ДП вібриси, які, згідно з літературними даними, мають один з найширших потенціалів до спеціалізації. Потрібно було порівняти обрані об'єкти за такими показниками як здатність формувати моношар та тривимірні структури при культивуванні, морфологія клітин при культивуванні в моношарі та здатність до субкультивування.

Встановлено, що клітини, культивовані в складі багатоклітинних утворень, відрізняються від клітин моношарових культур за деякими структурно-функціональними ознаками. Ця закономірність була показана для КПНГ, виділених з рогівки і шкіри [143, 144]. У складі МС такі клітини виявляли властивості більш ранніх прогеніторів у порівнянні з клітинами, які перебували в моношарі.

Загальновизнано, що мікрооточення є дуже важливим, а в деяких випадках визначальним фактором самооновлення і підтримки пулу стовбурових клітин [145, 146]. Можливо, прийоми 3D-культивування, щодо

КПНГ, дозволять встановити нові характеристики, відмінні від тих, що були отримані раніше при моношаровому культивуванні. У зв'язку з цим у нашій роботі була проведена розробка умов культивування для отримання МС з НН та ДП.

На перших етапах росту, культури клітин, отримані з НН залоз поросят і кроликів, мали подібні особливості. При культивуванні на адгезивній поверхні до субстрату прикріплялися фібробластоподібні клітини, що формували моношар через 5-7 діб (рис. 3.1 – а, б). На моношарі фібробластоподібних клітин зустрічався інший тип клітин - дрібні веретеноподібні клітини, які мають відростки на полюсах та розташовані ланцюжками. Даний тип клітин має менші адгезивні властивості, оскільки першим знімається при пересіві. При цьому, фібробластоподібні клітини виконують роль фідерного шару для них, за межами моношару веретеноподібні клітини не зустрічаються. У клітинах вирізняється дрібне ядро, цитоплазма однорідна. За зовнішнім виглядом і характером росту ці клітини були віднесені до нейробластоподібних. Раніше була показана можливість виділення в культуру клітин на різних поверхнях і середовищах, з нормальним і зниженим вмістом сироватки - на культурах клітин надниркових залоз поросят [147].

У культурі клітин кроликів і поросят ми виявляли прикріплені МС, що мали щільну структуру, які продовжували збільшуватися в розмірах в процесі культивування (рис. 3.1 – а,б). На культурі клітин надниркових залоз свиней неонатального віку (від 0 до 30 діб) показано прогресуюче зниження здатності до утворення МС в культурі, їх прикріплення і формування моношару в залежності від віку тварини [147, 148], що підтверджується в нашій роботі.

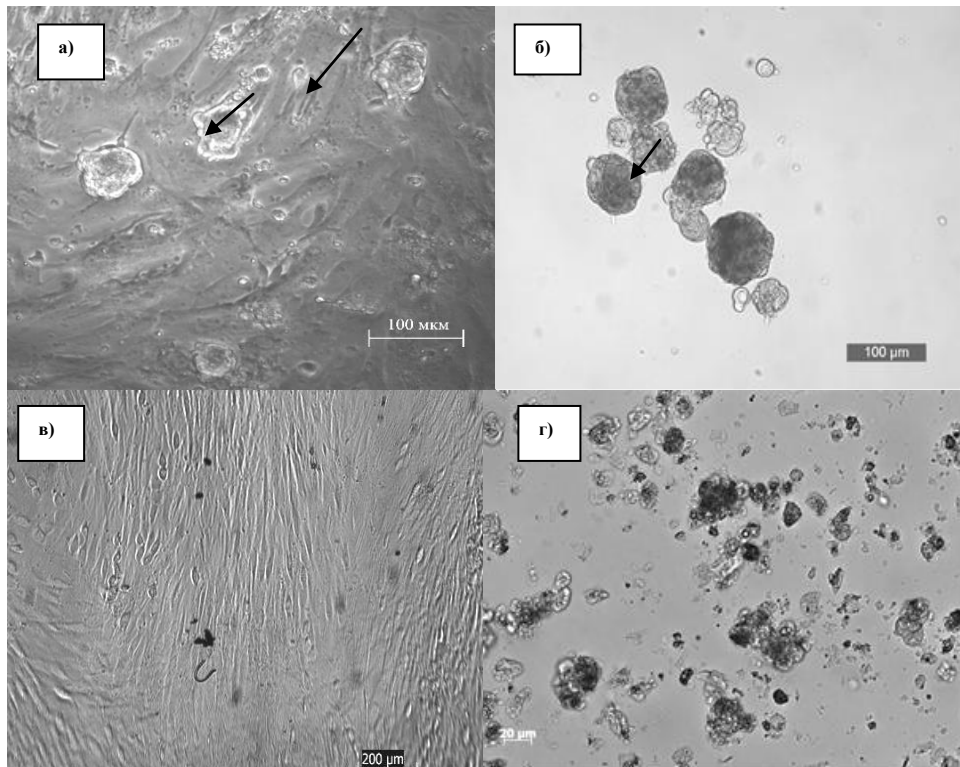


Рис. 3.1. Моношар первинної культури клітин НН неонатальних тварин: (а) поросяти, (б, в) кролика, (г) миші на 7 добу росту (стрілками вказані МС).

При культивуванні на поверхні зі зниженими властивостями адгезії (планшети, вкриті 1% агарози та в безсироватковому середовищі) в культурах НН поросят і кроликів клітинний моношар не утворювався, а відбувалося формування флотуючих МС, які поступово збільшувалися в розмірах. До 7-9 діб розміри МС в культурах досягали 150 – 250 мкм (рис.3.1 – б), а протягом наступних 14 діб спостереження продовжували збільшуватися до 400-450 мкм. МС формувалися як в присутності 10% ФТС, так і на безсироватковому середовищі з факторами росту (1% В27, 10нг / мл FGF). У процесі культивування розміри сфероїдів збільшувалися.

При культивуванні на слабкоадгезивній поверхні в середовищі, що містить ростові добавки, аналогічно культурі з 10% ФТС, велика частина клітин формувала флотуючі МС.

Для дослідження впливу умов культивування (2D та 3D) та складу живильного середовища на властивості первинної культури НН

неонатальних поросят та кроликів, клітинну суспензію, отриману з НН ферментативним методом, поміщали в такі умови культивування:

- 1) живильне середовище з 10% ФТС, поверхня з нормальною адгезією;
- 2) живильне середовище з 10% ФТС, поверхня з низькою адгезією;
- 3) живильне середовище без ФТС, але з додаванням 2% В27 та ростових факторів (EGF, bFGF, гепарину), поверхня з низькою адгезією.

Встановлено, що вид, розмір і кількість МС розрізнялися залежно від умов культивування. В умовах нормальної адгезії поверхні та при наявності ФТС у складі живильного середовища посіяні клітини прикріплялися до поверхні протягом 1-ї доби та розпластувалися. На 3-4 добу в культурі спостерігалися в основному крупні мультиполярні клітини фібробластоподібної морфології та округлі клітини з багатою включеннями вакуолізованою цитоплазмою, які являли собою клітини кори НН. На 5-7 добу в культурі формувалася конфлуентний моношар з фібробластоподібних клітин, при цьому вони тісно прилягали один до одного, ставали більш витягнутими, формуючи «потoki». При цьому, в культурі отриманій з НН кроликів, формування МС на моно шарі не відбувалося (рис. 3.1).

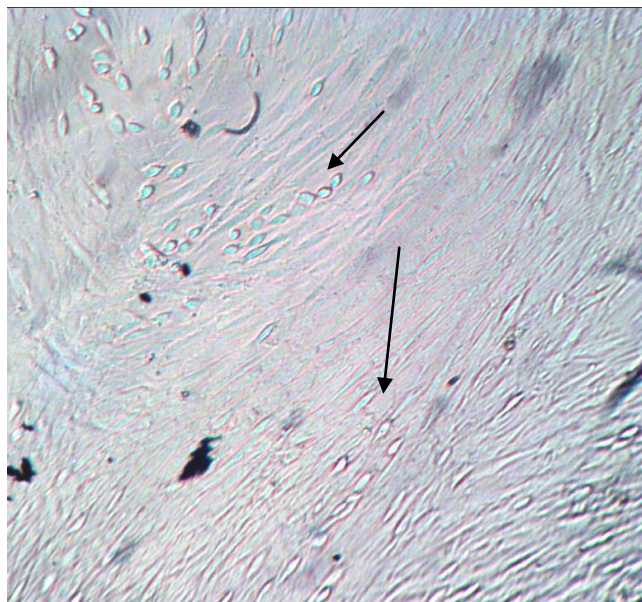


Рис. 3.2 Культура клітин наднирників новонароджених кроликів при моношаровому культивуванні на 8 добу. Моношар з фібробластоподібних

клітин та «ланцюжки» клітин з нейробластоподібною морфологією (вказані стрілками) навколо них на підложці з фібробластоподібних клітин. Прижиттєва світлова мікроскопія, x200.

Культури клітин, отримані з НН поросят, мали подібну морфологію: спочатку іормувався шар фібробластоподібних клітин, на яких ланцюжками розташовувались клітини з веретеноподібною морфологією. Після 8-9 доби на моношарі з фібробластоподібних клітин утворювалися невеликі прикріплені МС, навколо яких згодом появлялись дрібні веретеноподібні клітини з незначною цитоплазмою та двома (рідко трьома) відростками. Відростки цих клітин згодом подовжувалися, разом з ними клітини формували «ланцюжки» та «мережі» навколо МС (рис. 3.2). Спираючись на морфологічні ознаки, ці клітини були віднесені нами до нейробластоподібних клітини (НБК).

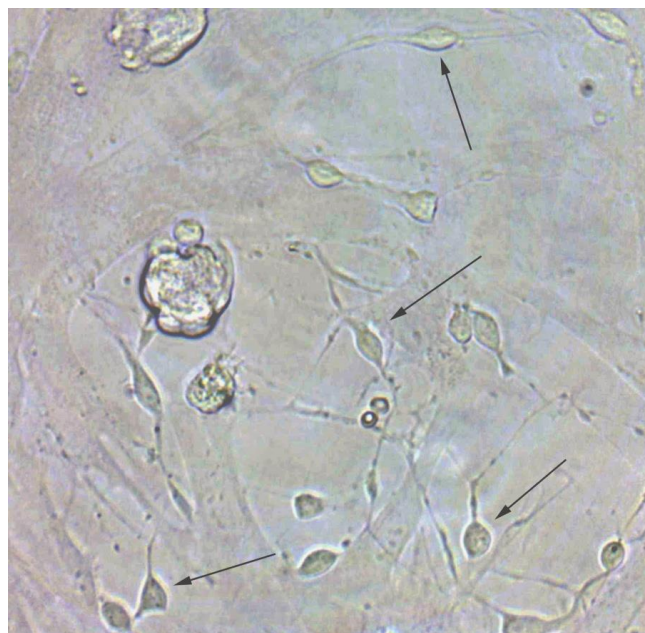


Рис. 3.3 Культура клітин наднирників новонароджених поросят при моношаровому культивуванні на 8 добу. Прикріплені МС та «ланцюжки» клітин з нейробластоподібною морфологією (вказані стрілками) навколо них на підложці з фібробластоподібних клітин. Прижиттєва фазово-контрастна мікроскопія. Об'єктив x800.

Культивування КПНГ, виділених з НН мишей, було детально описано в літературі [149]. Показана можливість отримання культур, що містять флотуючі цитосфери в неадгезивних безсироваткових умовах. Показано, що МС формуються і зберігають здатність до збільшення в розмірах тільки в культурах 2-3-денних мишей.

В нашій роботі в культурі клітин мишей, за протоколами, описаними у відповідному розділі, незалежно від наявності ФТС у середовищі, не спостерігалось формування клітинного моношару (рис. 3.1 – г). Культура містила округлі прикріплені і флотуючі клітини, а також їх агрегати з невеликою кількістю клітин в складі і неоформленою структурою. При фарбуванні трипановим синім показано, що клітини не були пошкоджені. Ймовірно, клітини в даних культурах мають інші механізми росту, ніж у інших досліджених видів і потребують використання інших ростових факторів для отримання моношару. У культурі можна виділити два основних морфологічних типи: прозорі поодинокі клітини і темніші, що частіше зустрічаються в складі агрегатів. Сфероїдів, що мають щільну структуру, також не утворювалося.

Вочевидь, клітини, що мають походження з нервового гребеня, закінчують міграцію з надниркових залоз мишей, раніше в онтогенезі, ніж у інших досліджуваних тварин. Також це може бути обумовлено особливостями гуморальної регуляції в онтогенезі. Зокрема, показано існування стрес-гіпореспонсивного періоду в ранньому постнатальному розвитку гризунів, під час якого відсутній синтез кортикостероїдів і знижується чутливість до АКТГ [150], можливо, в цей час відбуваються перебудови, що змінюють характер взаємодії між клітинами та оточуючим матриксом.

Отримані дані дозволяють припустити, що тип росту у вигляді МС, є прикладом здатності формувати сферичні колонії різних типів стовбурових і прогеніторних клітин, які присутні і в НН на ранніх термінах неонатального

розвитку. Їх присутність в надниркових залозах людини, бика, свині була показана [151, 152].

З досліджень на різних видах тварин відомо, що подібні сфероїди можуть формуватися в культурах клітин НН ранніми попередниками хромафінних клітин, що мають походження з нервового гребеня, спільне з нейронами і гліальними клітинами. Таким чином, показана можливість отримання МС з надниркових залоз кролика і схожість етапів розвитку з такими в культурі клітин надниркових залоз поросят. Процес формування сфероїда на клітинному рівні описаний в літературі. Відсутність адгезивної поверхні на етапі поміщення клітин в штучні умови є стимулом до запуску взаємодії клітина-клітина, потім відбувається виділення міжклітинного матриксу, що використовується для опори клітинами, що діляться, та формування градієнта речовин, який забезпечується вибірковою експресією генів і обумовлює розвиток одним з альтернативних шляхів [153]. Ростова поверхня є селективним чинником для вибіркового росту фібробластоподібних клітин або флотуючих сфероїдів, що може свідчити на користь збереження некомітованого стану клітин в 3D-умовах, в яких вони перебувають у складі цитосфер [154]. Можна припустити один з механізмів, що пояснюють залежність морфології і властивостей клітин від наявності ФТС в ростовому середовищі, який узгоджується з загальними уявленнями «моделі за замовчуванням» індукції нервових клітин. У ФТС висока концентрація білка BMP, який інгібує нейрогенез [155]. Відсутність такого інгібуючого впливу при використанні середовища, що містить B27і FGF, сприяє індукції розвитку в нейральному напрямку.

Для отримання культур клітин з ДП були використані ДП, отримані з вібрис неонатальних мишей та кроликів. У поросят відсутній даний чутливий орган, тому ДП ВФ поросят культури не вивчалися. Культури, отримані з обох джерел, мали схожу морфологію – з ДП виселялися дрібні

веретеноподібні клітини, що мігрували єдиним потоком і згодом формували моношар.

Ми вивчили характер росту культур за аналогічною схемою на адгезивній поверхні. При культивуванні на живильному середовищі (ДМЕМ / F12) з використанням ФТС в концентрації 1 та 10% відбувається ріст моношару. Клітини швидко проліферують, формуючи конфлуентний моношар на 3-5 добу (в залежності концентрації ФТС).

При культивуванні в безсироваткових ростових середовищах - середовищі (ДМЕМ / F12), що містить B27, EGF, FGF, відбувається формування і ріст сфероїдів. Сфероїди формуються починаючи з перших годин після перенесення в безсироваткові умови за рахунок агрегації невеликого числа клітин (в першу добу виявляються конгломерати, що містять 10-20 клітин), які поділяються та сприяють росту сфероїда (рис. 3.4).

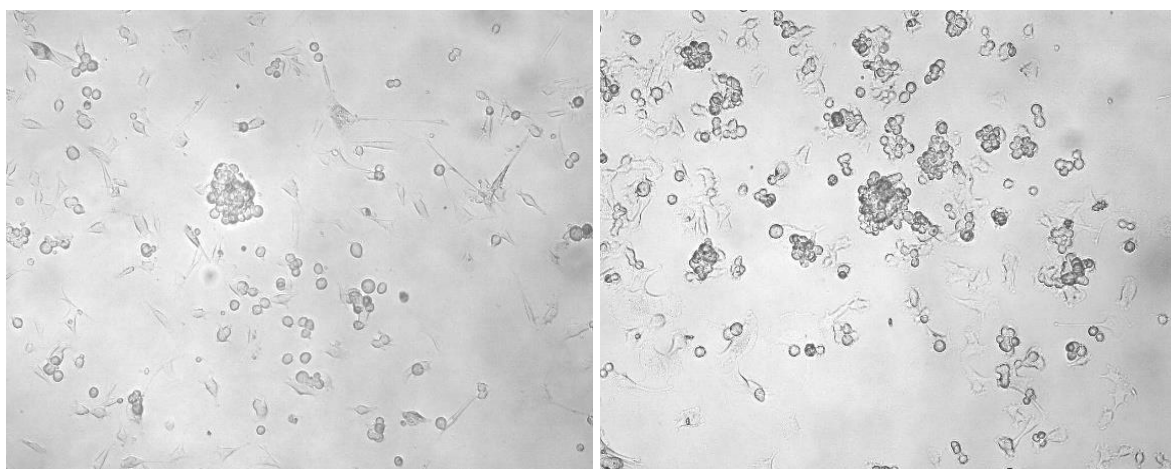
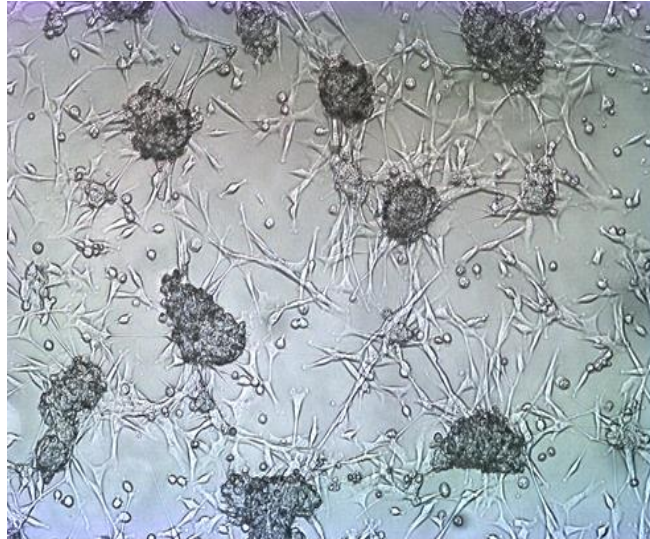


Рис. 3.4 Послідовна агрегація флотуючих клітин ДП кролика при культивуванні на адгезивній поверхні (середовище - ДМЕМ з додаванням 2% Нейромакс).

Після формування агрегатів, що містили 50-100 клітин, відбувалося ущільнення та формування МС. Окремі клітини було неможливо відрізнити, а поверхня ставала гладко – таким чином, клітини втрачали шароподібну форму та розпластувалися на поверхні сфероїда, формуючи шари та займаючи певне просторове положення в структурі МС.



3.5 Прикріплені МС, сформовані клітинами ДП кролика на адгезивній поверхні (середовище - ДМЕМ з додаванням 2% Нейромаск)

Вид одержуваної культури залежить тільки від факторів росту, що використовуються, але не від характеру ростової поверхні - на адгезивній поверхні в безсироватковому середовищі формуються сфероїди (рис.3.5), а на низькоадгезивній, при наявності сироватки прикріплюються і розпластуються клітини, що не формують агрегатів. В неадгезивних умовах та в безсироватковому середовищі, частина клітин залишається у флотуючому стані, проте більшість формує МС.

Табл. 3.1

Типи культур КПНГ, отриманих з різних видів за відмінних умов культивування

Тварина	Порося	Кролик		Миша	
орган	наднирник	наднирник	папіла	наднирник	папіла
Моношар	+	+	+	—	+
МС	+	+	+	—	+
Розселення при пересіві	+	+	+	+/-	—
Нейроноподібні клітини	+	—	+	—	—
Відповідь на ФТС	+/-	+	+	—	+

У тих культурах, що продемонстрували здатність до формування МС, була підрахована ефективність сфероїдоутворення (табл. 3.2), яка підраховувалася як кількість МС, які формувалися на кожні 10^6 клітин, підрахунок проводився на 3 добу після висіву суспензії клітин в неадгезивні умови. Можна припустити, що на цей показник має позитивно впливати здатність формувати мікрофіламенти для контакту між клітинами, а також синтезувати білки міжклітинної взаємодії. Таким чином, ці показники є досить специфічними, та, як нами виявлено, коливаються у великих межах між дослідженими культурами.

Табл. 3.2

Ефективність сфероїдоутворення в культурах КПНГ різних видів

Вид тварини	Порося	Кролик		Миша	
	наднирник	наднирник	папіла	наднирник	папіла
Кількість МС	150±19	92±13	273±28	0 (МС); 41±9 (агрегати)	139±23

Проаналізувавши всі дані, узагальнені в таблиці, ми вирішили для подальших експериментів використовувати культури КПНГ з НН поросят та кроликів та ДП кроликів. Оскільки культури з НН мишей не формували МС та моношару. Культури клітин ДП мишей та кроликів мали схожу морфологію та характер агрегації та росту. Ефективність сфероїдоутворення була вищою у наднирниках поросят та термальних папіл кроликів. Серед всіх культур, найбільше сфероїдів формувалося у клітинах ДП папіл кроликів, що разом з відносно більшими розмірами ВФ, робить їх більш зручним об'єктом для вивчення, оскільки забезпечує необхідну кількість матеріалу для порівняння. ДП неонатальних мишей менші за розміром, з них спостерігається менший вихід клітин, що представляє незручність при

необхідності накопичення, у зв'язку з цим, подальше вивчення фенотипічних та цитогенетичних властивостей проводилося на ДП неонатальних кроликів.

3.2. Характеристики КПНГ при культивуванні у вигляді моношару та МС

Для того щоб з'ясувати, чи зберігається здатність до адгезії у флотуючих МС, їх через 14 діб культивування переносили в умови з адгезивної поверхнею. При цьому в культурі, отриманій з НН залоз кролика, з МС мігрували (виселялися) клітини фібробластоподібних і полігональної форми (рис. 3.3 - а, б). При подальшому культивуванні сфероїди розпластувалися на субстраті, і зростання моношару тривало. До кінця терміну спостереження (21 доба) всі клітини з сфероїдів мігрували на субстрат. Таким чином, було показано вплив характеру ростової поверхні на поведінку клітин і збереження адгезивних властивостей у клітин, що культивуються складі сфер.

При перенесенні флотуючих МС культури НП поросят з неадгезивних в адгезивні умови, відбувалося їх прикріплення до субстрату і виселення клітин, що мають нейробластоподібну морфологію та розташовані ланцюжками.

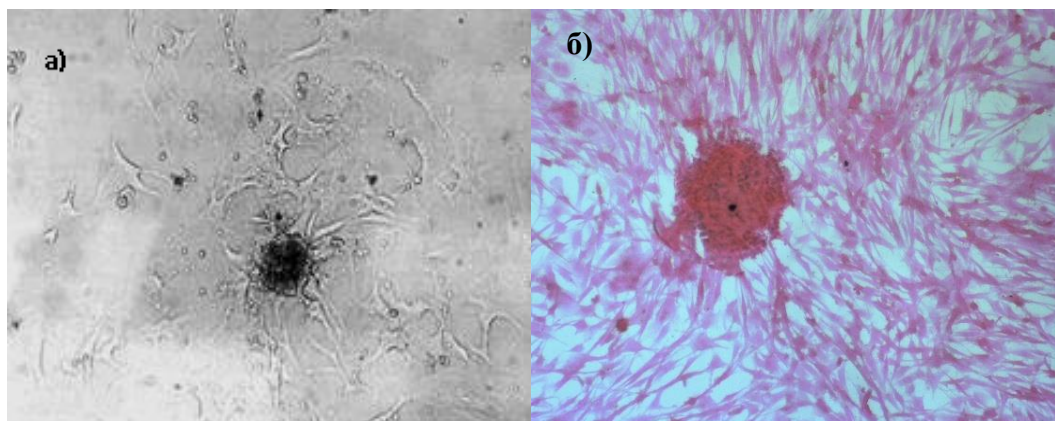


Рис. 3.8 МС з надниркових залоз неонатального кролика, отриманий в умовах слабкої адгезії і перенесений на адгезивну поверхню на 7 добу після

переносу з неадгезивних умов. (а) нативна культура; (б) моношар, фіксований препарат (забарвлення – азур-еозин). Середовище – ДМЕМ з додаванням 10% ФТС

Шляхом культивування культури ДП кролика в середовищах різного складу, ми встановили, що існує залежність між формуванням 2D та 3D-культур в залежності від наявності ФТС в середовищі. У всіх безсироваткових середовищах культура ДП була представлена МС, які формувалися за рахунок агрегації флотуючих клітин і активно збільшувалися в розмірах до 18-10 діб культивування (табл.3.3). Така здатність формувати МС може слугувати підтвердженням наявності прогеніторних клітин в даних культурах. Узагальнені дані щодо впливу середовища культивування на тип культури наведені в таблиці 3.3.

З таблиці 3.3 видно, що наявність ФТС в ростовому середовищі фактор, що стимулює формування моношару. Тоді як достатня умова формування МС є виключення факторів, що входять в склад ФТС і додавання нутрієнтів, що підтримують ріст клітин. При цьому, 1% ФТС в поєднанні з 1% нейромакс, забезпечує формування змішаної культури, в той час як подальше збільшення концентрації ФТС веде до формування моношару, але повноцінних МС не формується.

При перенесенні МС на середовище, що містить ФТС, відбувається виселення клітин і ріст моношару. Надалі при заміні середовища на безсироваткове, можна знову отримувати МС. Зміна типу росту свідчить про вкрай високу пластичність культури і чутливості до чинників у складі ФТС, тоді як за замовчуванням формуються МС. Всі вивчені середовища використовувалися для культивування нативної і кріоконсервованої культур, при цьому не було виявлено будь-яких відмінностей в характері їх росту.

Ефективність міграції клітини з сфероїда, залежало від тривалості культивування у вигляді МС. МС, що культивувалися 57 діб, при дезагрегації легко дисоціюють на окремі клітини, залишків конгломерату на 2-3 добу

після перенесення в адгезивні умови з ФТС не помітно. Якщо сфероїд культивувався більше 10-12 діб, він ставав дуже щільним, і при перенесенні в адгезивні умови з ФТС, на субстрат виселялися лише деякі клітини, однак конгломерат залишався у вигляді скупчення клітин (рис.3.8).

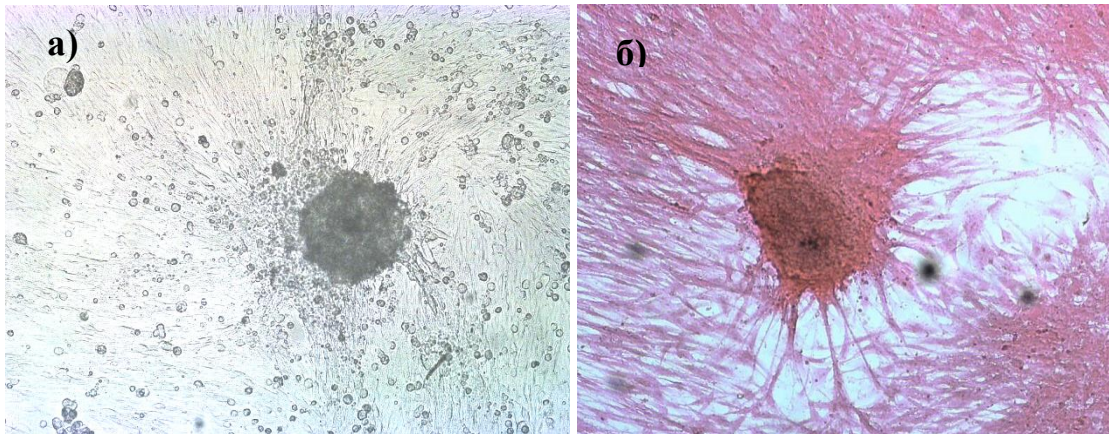


Рис. 3.8 Формування моношару при перенесенні МС ДП кролика з безсироваткового середовища (ДМЕМ/ 2% нейромакс) в сироваткове (ДМЕМ/ 10% ФТС), адгезивна поверхня: а) нативна культура; б) факсований препарат (забарвлення – азур-еозин)

МС обробляли 0,05% розчином трипсину протягом 10 хвилин, після чого вони повністю не розпадалися, проте межклітинний матрикс руйнувався до певної міри, і після перенесення в середовище з ФТС, через добу виселялися на субстрат всі клітини, не залишаючи залишків конгломерата (рис. 3.9).

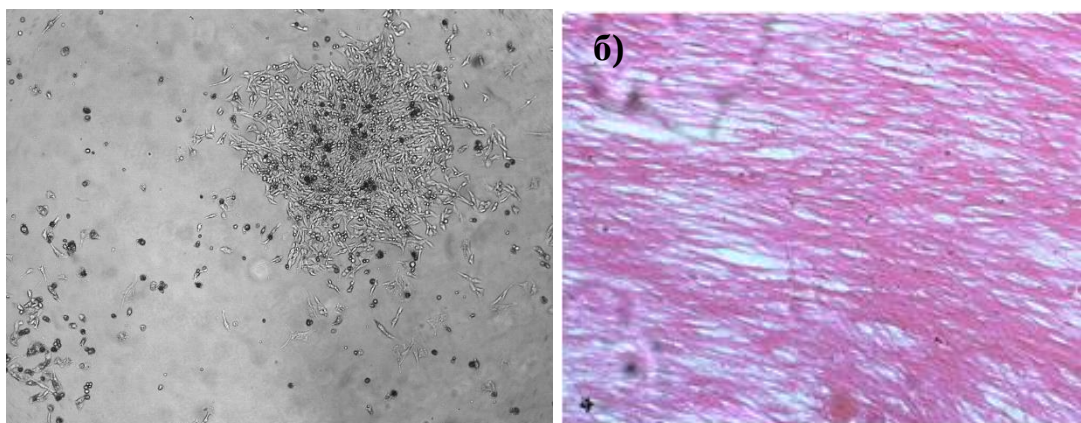


Рис. 3.9 Формування моношару при перенесенні МС з ДП кролика з безсироваткового середовища (DMEM/ 2% нейромас) в сироваткове (DMEM/ 10% ФТС) з попередньою ферментацією; а) 1 доба росту – прикріплення клітин до субстрату (нативна культура), б) 7 доба росту – конфлуентний моношар (фіксований препарат, забарвлення – азур - еозин)

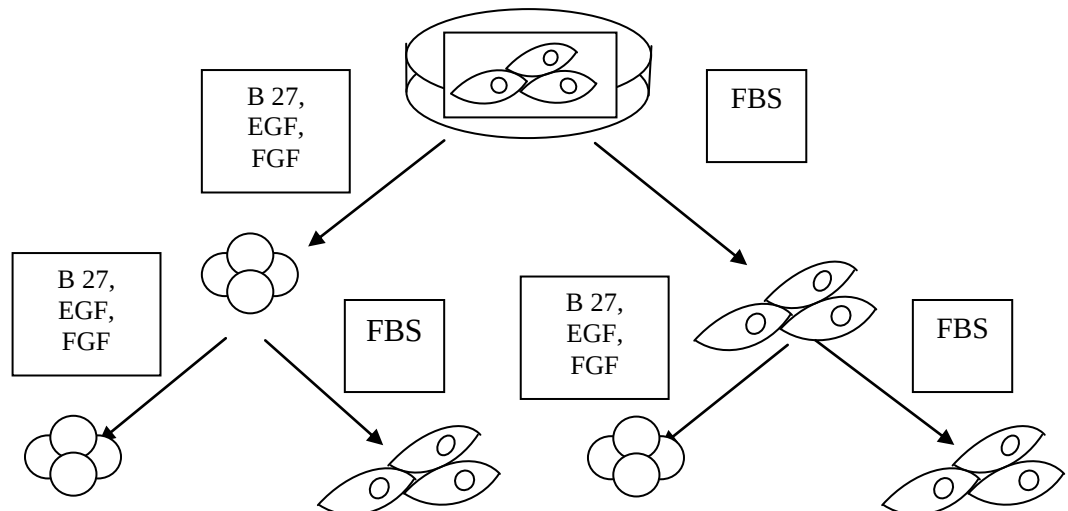


Рис. 3.10 Схема дослідження адгезивних властивостей культур ДП

Схема експерименту з вивчення впливу ростового середовища на формування моношару та МСв загальному вигляді представлена на рис. 3.10 та в табл. 3.3.

Таким чином, клітини зберігають тип росту, що відповідає наявності чи відсутності сироватки в поживному середовищі, їх можна пчергувати додаючи ті чи інші фактори при пасивуванні. Клітини ДП виявились чутливими до сигналів речовин які наявні в ФТС. Ймовірно, одним з натих факторів, що перемикає синтез поверхневих білків, є ВМР, на який багата ФТС. Зміну 2D та 3D-форм культивування ми здійснювали впродовж 8 пасажів, і щоразу отримували тип культури, що відповідали складу ростового середовища.

Табл.3.3

Визначення необхідних достатніх умов для формування МС в культурах клітин ДП

№ п/п	Ростова добавка	Моношар	Сфероїди	Поодинокі флотуючі клитини
адгезивна поверхня				
1	10% ФТС	+	—	-
2	1% ФТС	+	+	+
3	В 27 або Нейромакс	—	+	—
4	B27/ FGF/ NGF	—	+	—
6	Альбумін КРС	—	+	+
7	Екстракт ембріонів курей	—	—	+
8	Албутрисан NR	—	+	—
9	Гібрис	+	+	—
неадгезивна поверхня				
№ п/п	Ростова добавка	Моношар	Сфероїди	Поодинокі флотуючі клитини
1	10% ФТС		—	+
2	1% ФТС	—	+	+
3	В 27 або Нейромакс	—	+	—
4	B27/ FGF/ NGF	—	+	—

6	Альбумін КРС	–	+	+
7	Екстракт ембріонів курей	–	–	+
8	Албутрисан NR	–	+	–
9	Гібрис	–	+	–

Данні щодо отримання 2D та 3D показали, що достатньою умовою для формування моношару культур КПНГ є наявність ФТС у поживному середовищі, ніякі аналоги, включаючи альбумін чи курячий ембріональний екстракт, не сприяли адгезії клітин до субстрату. Частина ростових добавок – таких як Нейромакс, В27, Албутрисан сприяли формуванню МС з чіткою шароподібною структурою та гладкою поверхнею, а частина добавок (курячий ембріональний екстракт, альбумін КРС) – призводили до формування багатоклітинних агрегатів, що не мали структури сфероїда, та поодиноких флотуючи клітин, що поділялися в суспензії. Узагальнені дані занесені до табл. 3.2.

3.2. Аналіз клоногенної здатності КПНГ з ДП

Було проведене вивчення здатності до клонування культур з ДП кролика, отриманих з нативних МС на 2 та 3 пасажі культивування. Клітини розсівалися в лунки 96-лункового планшета в концентрації 1 клітина/ лунку. Середовище для культивування використовувалось підібране для отримання МС – ДМЕМ з додаванням 2% Нейромакс. Спостереження проводилося протягом 14 діб. В результаті ми не спостерігали формування МС та інтенсивного поділу клітин. В поодиноких лунках клітини проходили 1-2 поділи протягом перших 3-4 діб культивування і зупиняли ріст. Водночас спостерігалось збільшення клітин в розмірі. Спостереження продовжувались протягом 14, проте в даних умовах дослідження клонального росту та

формування сфероїдів не було помічено. Таким чином, ми можемо припустити, що для формування багатоклітинних структур клітинами ДП, потрібен контакт великої кількості клітин та спільне виділення міжклітинного матриксу для формування МС.

3.3. Фенотипічний аналіз КПНГ ДП

Фенотипічний аналіз клітин ДП кролика був проведений на 2 пасажі після виділення. Було здійснено забарвлення досліджених культур на антитіла цитоскелету - тубулін і виментин.

Оскільки β III-тубулін є основним білком нейрофіламент, його експресія показана для багатьох клітин-похідних нейроектодерми [156]. У шкірі підтримується достатній рівень експресії даного білка, велика його частина - в папілярному шарі. Нами була детально вивчена експресія даного маркера на різних етапах культивування ДП: до і після кріоконсервування, індукції і формування сфероїдів. Було виявлено, що клітини ДП несуть в собі β III-тубулін, філаменти, що мають специфічне світіння, сконцентровані, головним чином, в перинуклеарній області (рис.3.10). Це може бути пов'язано з походженням даного типу клітин з нейроектодерми.

Крім посилення синтезу β III-тубуліну, нами була відзначена зміна морфології клітин - поява клітин з нейроноподобної морфологією, довгими відростками, які також добре забарвлюється антитілами до β III-тубуліну (рис.3.10 г).

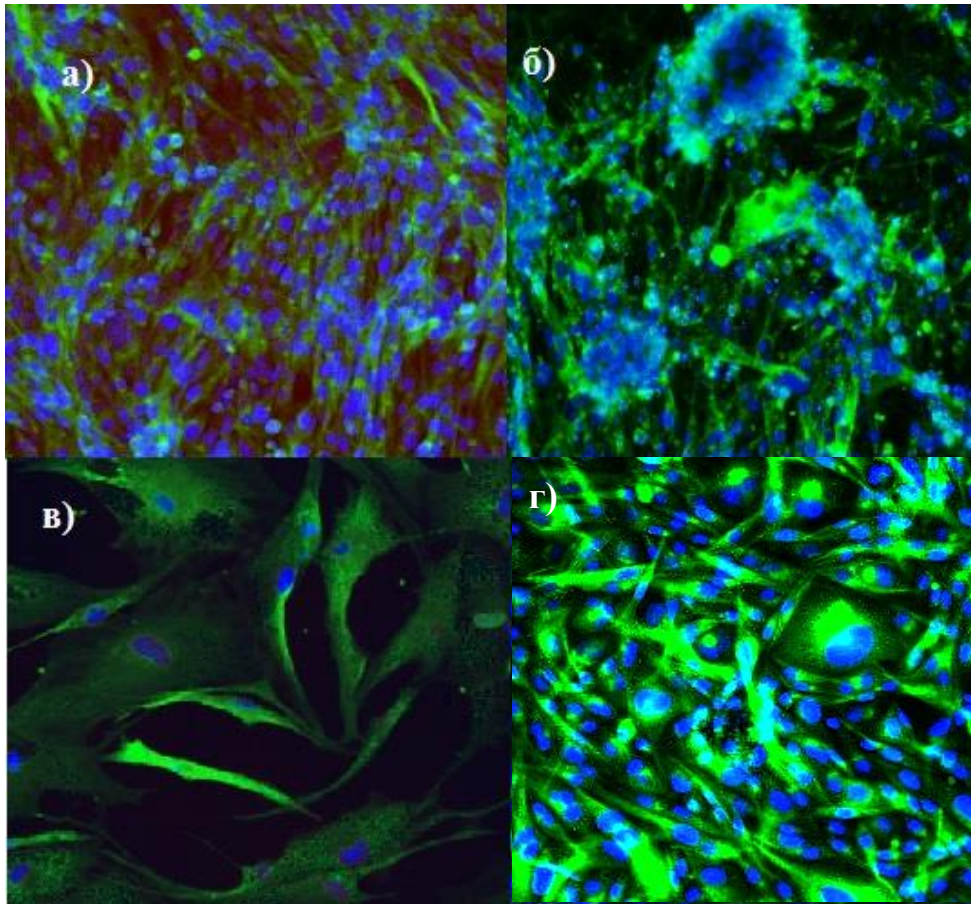


Рис. 3.10 Експресія β III-тубуліну в культурах ДП: а) конфлуентний моношар неіндукованої нативної культури (x100); б) МС в неіндукованій нативній культурі (x100), в) клітини культури після нейрональної індукції - 21 доба росту (x400); г) моношар культури після деконсервування (x200)

Було відзначено позитивне забарвлення на віментин в неіндукованій культурі ДП, проте вміст його був вище в клітинах, що входять до складу МС, в порівнянні з моношаром (рис 3.11). Це може бути пов'язано з участю віментину в агрегації клітин і підтримці міжклітинних зв'язків. Більше віментину було сконцентровано в клітинах, що утворювали МС (3.11, б). Відомо, що віментин є загальним маркером клітин, що здійснюють епітеліо-мезенхімальну трансформацію. Ймовірно, формування 3Д культур пов'язане з посиленням синтезу філамент цитоскелету.

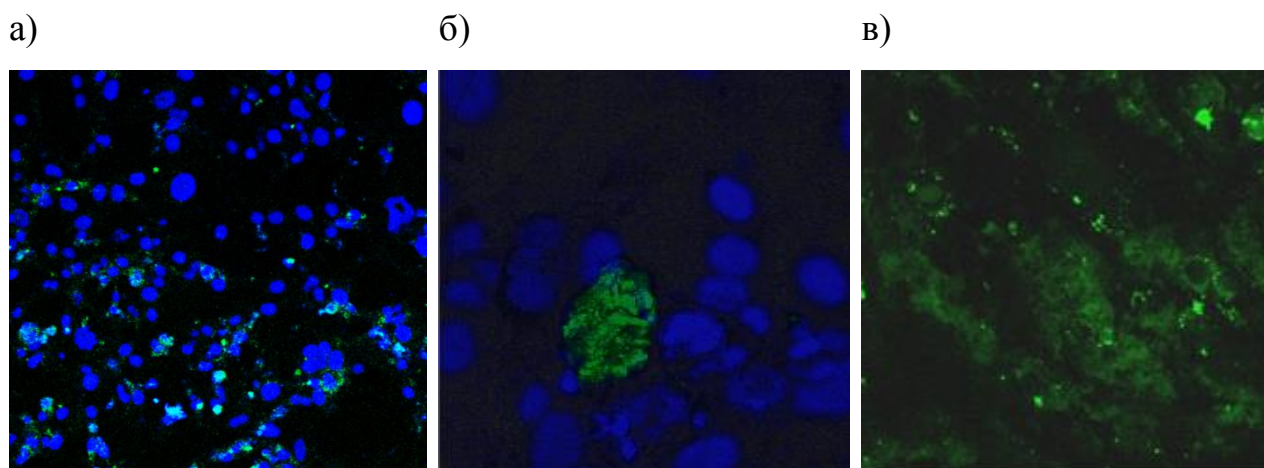


Рис. 3.11 Забарвлення антитілами: а, б – до віментину у моношарі (а) та у МС (б); в – до глутамінсинтази (х 400)

Склад міжклітинного матриксу ДП детально не вивчений, проте є дані про відмінність його від шару фібробластів дерми. Раніше на культурах клітин щурів була показана експресія в ньому актина, фібронектину, віментина, тубуліна [157]. В організмі ссавців експресується кілька ізоформ β -тубулінів. Високі рівні експресії даного білка характерні для тканин залоз внутрішньої секреції і пов'язані з ектодермальним походженням багатьох популяцій клітин в них. У шкірі підтримується відносно низький рівень експресії даного білка (переважно в меланоцитарній лінії) [158]. У нашому дослідженні клітини ДП експресували β III-тубулін в нативному, некомітованому стані, причому як в складі моношару, так і сфероїдів. На клітинному рівні досліджено, що мікротрубочки, що містять β III-тубулін динамічніші - їх деполимеризація і полімеризація відбувається в 2 рази швидше, ніж 2 і 4 типів [159]. Можливо, здатність до активної міграції та формування 3D структур є одним із наслідків присутності β III-тубуліну в клітинах ДП і їх пластичності до зміни способу росту при зміні сигналів середовища [160]. У дослідженні на різних популяціях ДП вібрис мишей показано, що при тривалому культивуванні *in vitro*, клітини формують довгі

відростки, довжиною до 500 мкм, які стають аксонами чутливих нейронів [161]. Схожі морфологічні структури виявлені нами в індукованої культури на 21 добу, що свідчить на користь пластичності культури.

Віментин є білком проміжних філамент, що експресується на високому рівні у всіх тканинах і органах. Віментин також є визнаним маркером клітин ДП [162]. У нашому дослідженні також виявлення експресії даного білка культурою ДП, однак переважна експресія його спостерігалася в клітинах, що утворюють МС.

Позитивне забарвлення на глутамат-синтазу свідчить про протікання глутаматного циклу в даних клітинах в нормі. Відомо, що в клітинах папілярного шару дерми дійсно підтримується високий рівень експресії даного ферменту. У літературі нами не були знайдені дані щодо наявності глутамат-синтази в культурі клітин ДП *in vitro*, однак показана її експресія в папілярному шарі шкіри зрізів шкіри людини і щура [163]. Мабуть, глутамат-синтаза виконує захисні функції в тканинах, сприяючи перетворенню токсичних продуктів азотного обміну в глутамин, що входить до складу багатьох білків даних тканин. Також показано зв'язок підвищення активності ферменту з внесенням дексаметазону [164], що узгоджується з посиленням специфічного забарвлення після остеоіндукції.

При порівнянні кріоконсервованої культури з нативною, виявлено, що субкультивування впродовж декількох пасажів ніяк не впливало на специфічність забарвлення культур ДП. Можна припустити, що кріоконсервування у застосованому режимі не порушує основних біохімічних і молекулярних механізмів функціонування клітин ДП вібрис кролика. Це дає підстави вважати, що кріоконсервовані клітини ДП можуть бути використані як перспективний матеріал для трансплантації, при збереженні їх мультипотентності. Ці дані узгоджуються з деякими роботами, в яких проводилося кріоконсервування первинних культур ДП [161, 165].

Забарвлення антитілами до глутамінсінтетази показало наявність

експресії даного білка в нативній культурі, що свідчить про протікання глутаматного циклу в даних клітинах в нормі. У той же час, спостерігалось посилення специфічного світіння в клітинах, які пройшли 21-денну індукцію в Остеогенні напрямку (рис.3.11).

Аналогічна експресія маркерів зберігалася після кріоконсервування, що свідчить про відсутність впливу на конституційні структурні особливості клітин даного типу.

Негативним виявилось забарвлення на маркер астрогліальних клітин білок S100, а також маркер меланоцитарної лінії C-kit (CD117). В досліджених культурах були відсутні маркери, які вказували б на комітований статус даних клітин. Білок S100-структурний білок астрогліальних клітин, що експресується при їх тканинній спеціалізації із загального нейрогліального попередника [166].

C-kit (CD117)-рецептор, що дозволяє диференціювати інші популяції клітин волосяного фолікула, що мають мезенхімальне походження, від ектодермальних похідних - плюрипотентних клітин ДП. Є повідомлення, що даний маркер експресується при міграції ряду клітин ДП, які беруть участь в міграції і виживанні меланоцитів [167].

3.4. Здатність до індукції в остеогенному та нейрональному напрямках.

З метою вивчення потенціалу до індукції в остеогенному напрямку, культура ДП, здійснювалося тривале культивування в індукційному середовищі культивування в індукційному середовищі, що містить 50 мкг/мл аскорбінової кислоти, 10 мМоль гліцерофосфату та 0,1 мкМоль дексаметазону. Культура досліджувалася на вміст позаклітинних включень кальцію шляхом забарвлення алізариновим червоним. На 7 добу індукції видимі відмінності з контролем були відсутні, тоді як на 21 добу виявлялися великі позаклітинні включення, що забарвлювалися в червоний колір (Рис.3.12).

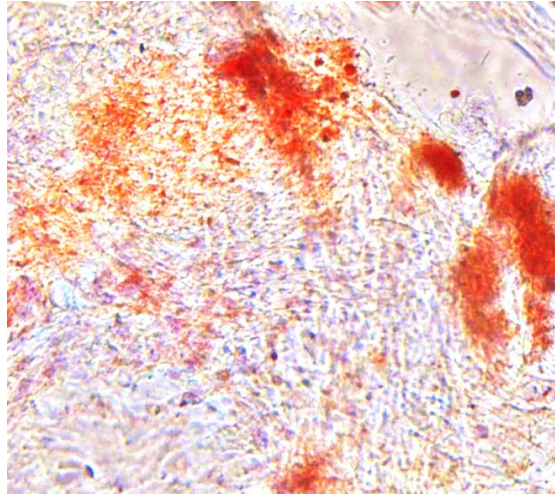


Рис.3.12 КПНГ ДП, індукована в остеогенному напрямку -21 доба росту (зabarвлення – алізариновий червоний, x 200)

Індукція в нейрональному напрямку здійснювалася шляхом тривалого культивування в індукційному середовищі, що містить 10^{-6} Моль ретиноєвої кислоти.

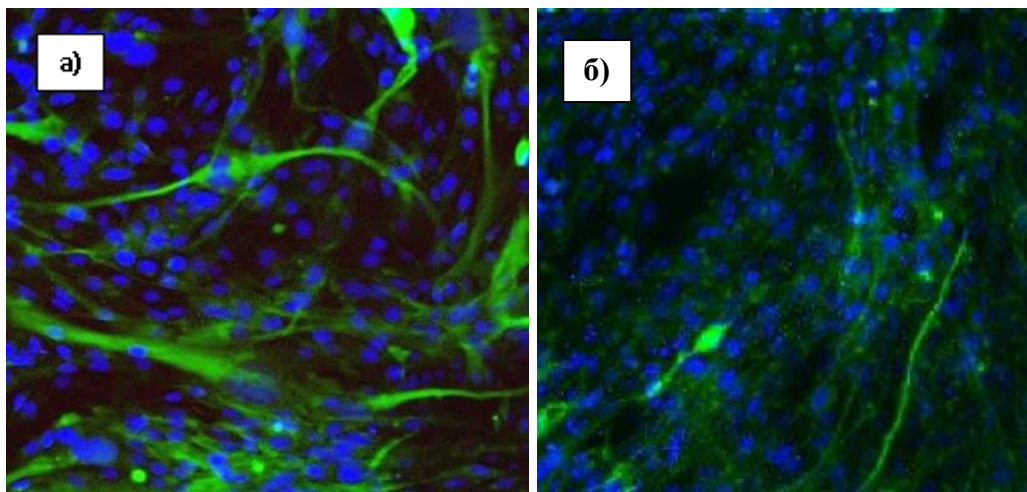


Рис.3.13 КПНГ ДП, індукована в нейрональному напрямку 21 доба росту (зabarвлення – антитіла до β ІІІ тубуліну), а) нативна культура; б) кріоконсервована культура (x200)

свідчать про накопичення тканеспецифічних філаментів, що містили β ІІІ-тубулін. Після індукції в нейрональному напрямку нами була досліджена динаміка накопичення β ІІІ-тубуліну на 7 і 21 добу індукції. Рівень

специфічного світіння на 7 добу культивування не відрізнявся від такого в неіндукованій культурі - як в нативній, так і в кріоконсервованій. Експресія даного білка є маркером нейрального диференціювання. На 21 добу спостерігалось значне посилення світіння, філаменти при цьому займали всю площу клітини (рис. 3.13), а не тільки перинуклеарний простір, як в неіндукованій культурі. 21 добу прийнято вважати терміном, достатнім для термінальної індукції прогеніторних клітин *in vitro*, мабуть, в цей час в досліджуваній культурі ДП дійсно відбулися структурні перебудови, які

В літературі є багато даних, що підтверджують некомпітований стан клітин ДП, та навіть свдчать на користь їх плюрипотентних властивостей. Зокрема, з них дуже легко отримують ІПСК . Також була показана здатність нативних клітин ДП мишей індукуватись в нейрони, остеоцити, а також глію, посмуговану мускулатуру та адипоцити ІПСК [168].

За аналогічною схемою здійснювалась індукція кріоконсервованих клітин на першому пасажі після деконсервування. Було встановлено, що культура клітин після деконсервування, мала подібну до нативної культури морфологію та характеристики після індукції. Після остеοіндукції на 21 добу фарбувались алізариновим червоним. А у випадку нейрональної індукції – посилено експресували тубулін та формували довгі відростки (рис.3.13, б).

Таким чином, проведені дослідження свідчать про індукційну пластичність і підтверджують мультипотентний стан культур ДП кролика до тв після кріоконсервування. Кріоконсервування не впливає на здатність до остеогенної і нейрональної індукції, що узгоджується з літературними даними, отриманими на клітинах ДП інших видів тварин [169]. Культура клітин ДП вібрис кролика в умовах *in vitro* має високий проліферативний потенціал і пластичність при формувати моношару і МС у відповідь на зміну складу ростового середовища. Фенотипування показало експресію β III тубуліну, віментіа, глутамін-синтетази - ранніх маркерів епітеліо-мезенхімальних клітин і відсутність S100 (маркер астроцитів), а також

маркер C-kit (маркер Меланоцитів); що свідчить про перебування у некомпітованому стані даного типу клітин. Отже, разом ці дані дозволяють вважати КПНГ ДП пулом некомпітованих клітин, здатних до формування різних типів клітин. При цьому, кріоконсервована культура клітин може бути джерелом їх отримання. В той же час, досліджувані культури виявляють індукційну пластичність, спеціалізуючись в нейрональному і остеогенному напрямках.

За матеріалами розділу 3 опубліковані роботи [21, 29, 35].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КРІОПРЕТОКТОРІВ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА КПНГ ДП

4.1 Вплив інкубації з кріопротекторами та кріоконсервування на морфологію та життєздатність ДП при культивуванні у вигляді моношару

ДМСО є найбільш вивченим кріопротектором, що використовується для тривалого низькотемпературного зберігання широкого спектру клітин. Проте давно показана наявність токсичних впливів ДМСО на клітину [170]. У зв'язку з цим, є необхідність оптимізації складу кріозахисних середовищ на основі ДМСО, які дозволять при мінімальному його вмісті зберегти життєздатність та метаболічну активність клітин на високому рівні. В якості основи кріозахисного середовища нами уло взято 5 концентрацій ДМСО: від найнижчої, яка, згідно з літературними даними, чинить захисний ефект – 5%, до концентрації, що має чинити токсичний вплив – 15%. В якості одного з варіантів дослідів використовувався ДМСО в різних концентраціях без добавок (табл.4.1).

Для покращення кріозахисних властивостей середовищ, в якості непроникаючих кріопротекторів, нами використано ряд добавок. В якості позитивного контролю використане середовище на основі 10% ДМСО та 5% ФТС (класична добавка). Проте з огляду на особливості культивування клітин ДП та їх чутливості до сигналів ФТС, нам потрібно було замінити ФТС на інші добавки, які дозволяють зберігати клітини життєздатними та не порушують потенціалу до формування 3D-культур. Спираючись на дані, отримані при культивуванні з різними ростовими добавками, в якості альтернативи ФТС, ми обрали 5% БСА та 5% албутрісану (табл.4.1).

На першому етапі дослідження впливу процесу кріоконсервування на культури ДП, було вивчено вплив кріозахисних середовищ на життєздатність за адгезивні властивості клітин ДП кролика. Для цього клітини, що культивувався у вигляді моношару, були суспендовані ферментативно та

інкубувалися в розчинах кріопротектора в ДМЕМ протягом 20 хвилин. Склад ростових середовищ, які були використані, наведений у табл. 4.1

Табл. 4.1

Склад середовищ для кріоконсервування

Добавка	Концентрація ДМСО, %														
	5			7,5			10			12,5			15		
ДМЕМ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
альбумін, 5%	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
албутрісан, 5%	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Після цього було проведено підрахунок неушкоджених клітин шляхом забарвлення відібраних проб клітин трипановим синім, оівень клітин, що не зазнав порушення цілісності на данному етапі, був високим у всіх варіантах досліду (табл.4.2). Після інкубації з кріопротекторами клітини були висіяні в 6-лункові планшети, через добу була підрахована кулікість клітин, які не прикріпились. Результати цих підрахунків занесені до табл. 4.2.

Як видно з таблиці, життєздатність клітин у всіх варіантах дослідження була досить високою, що свідчить про відсутність гострого токсичного впливу на клітини. При цьому кількість пошкоджених клітин збільшувалась пропорційно до концентрації ДМСО. Використання 12,5 та 15% ДМСО в поєднанні з 5% БСА призводило до значущого зниження життєздатності в порівнянні з контролем (табл. 4.2). Ми можемо припустити, що така комбінація чинить посилений токсичний вплив на культуру вивчених клітин.

При дослідженні неприкріплених клітин через добу після висіву в адгезивні умови, ми дійшли висновку, що у варіантах з використанням ДМСО вище 7,5%, спостерігалася тенденція до збільшення кількості флотуючих клітин. В деяких випадках цей показник був значущим (табл. 4.2). Ми можемо розглядати збільшення кількості флотуючих клітин як показник токсичності, однак ще може бути також реакцією на залишки безсироваткових факторів росту у середовищі, що більш ефективно проникають в клітини на тлі високих концентрацій ДМСО.

Табл. 4.2

**Життєздатність та адгезивні властивості клітин ДП після інкубації з
кріопротекторними середовищами, 1 доба росту, 4 пасаж**

Кріозахисне середовище	Життєздатність, %	Неприкріплені клітини, %
Контроль «»	99±0,9	0,8±0,02
5% ДМСО	99±1,2	0,39±0,01
7,5% ДМСО	99±1,4	0,6±0,02
10% ДМСО	97±1,4	0,6±0,02
12,5 ДМСО	90±2,2	0,7±0,02
15% ДМСО	91±3,7	2,4±0,1
5% БСА	98±1,4	0,6±0,02
5% ДМСО + 5% БСА	99±0,8	0,6±0,02
7,5% ДМСО + 5% БСА	95±1,2	1,7±0,02
10% ДМСО + 5% БСА	92±2,0	3,6±1,2
12,5 ДМСО + 5% БСА	84±3,1*	0,8±0,02
15% ДМСО + 5% БСА	86±2,2*	3,4±0,1*
5% Албутрісан	96±1,7	0,6±0,02
5% ДМСО + 5% Албутрісан	98±1,9	0,8±0,02
7,5% ДМСО+ 5% Албутрісан	96±0,7	2,78±1,1
10% ДМСО+ 5% Албутрісан	90±3,3	1,45±0,05
12,5 ДМСО+ 5% Албутрісан	92±1,6	2,6±0,4*
15% ДМСО+ 5% Албутрісан	90±2,3	2,6±0,4*

* дані значущі в порівнянні з контролем, $p=0,05$.

Для виявлення внеску інкубації з ДМСО на морфологію досліджених культур, було здійснено аналіз морфології клітин в моношарі. Для цього здійснювал висів суспензії клітин на покривні скельця та культивували протягом 3х діб, після чого здійснювали фіксацію клітин в спирт-оцтовому

фіксаторі, виконували зневоднення, забарвлення за допомогою гематоксилін-еозину та вивчення їхньої морфології.

Аналізували морфологію клітин в моношарі, окремо враховували клітини з патологічною морфологією. Клітини з нормальною морфологією являли собою видовжені фібробластоподібні клітини з одним дрібним ядром в центрі клітини. Клітини були гомогенної морфології, з характерним ростом у вигляді колоній, що зливалися, формуючи конфлюентний моношар. Цитоплазма рівномірно забарвлена, прозора.

Підраховували загальну кількість клітин та клітини з наявністю наступних патологій: поліплоїдні клітини, клітини з декількома ядрами, з мікроядра (МЯ), з ядрами аномальної форми (рис. 4.1 - е); на різних термінальних стадіях апоптозу: з конденсованими хроматином, пікнотичними ядрами, що формують апоптотичні тіลця (рис. 4.1 - в). Оцінювалося формування мікроезичулярних частинок на поверхні клітин - т.зв. блеббінг (рис. 3.14-г).

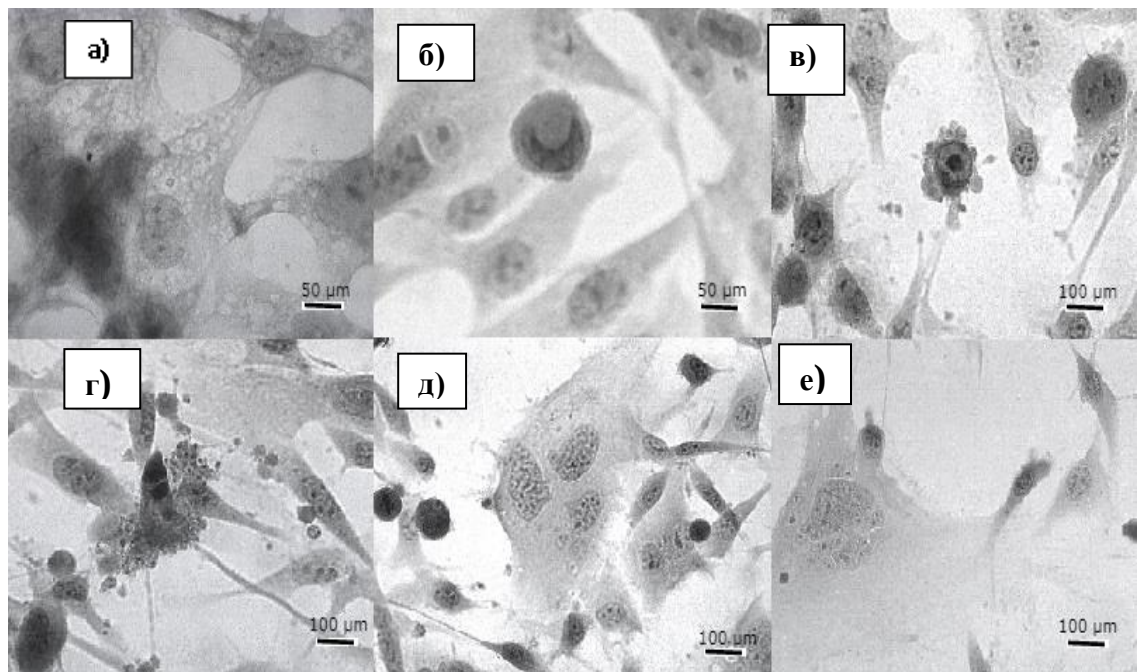


Рис. 4.1 Патології в культурі клітин ДП: а) вакуолізація цитоплазми; б) конденсація хроматину у вигляді «серпа», апоптоз; в) апоптоз - формування апоптотичних тілець; г) блеббінг; д) поліплоїдна клітина з трьома ядрами;

е) поліплоїдна клітина з лопатеподібним ядром. Збільшення: а) в) x400; г) е) x900.

Цитоморфологічний аналіз показав, що в інтактній культурі клітин ДП присутня незначна частина клітин з патологією, клітини моношару мали нормальну морфологію: фібробластоподібну форму, одне ядро, однакові розміри і рівномірно формували моношар. В нормі одне ядро диплоїдної клітини міститло 2 ядерця, збільшення кількості ядерць свідчило про анеуплоїдію чи поліплоїдію. Нечисленні відхилення (4,5%) представляли собою збільшені клітини - імовірно, поліплоїди і клітини з 2 ядрами. На другому пасажі рівень і характер патологій в контрольному варіанті значущо не змінився (7,2%).

У всіх варіантах використаних середовищ, при збільшенні концентрації ДМСО до 7 %, не відбувалося значного збільшення рівня патологій порівняно з контролем (рис. 4.1). У клітинах, які пройшли експозицію з високими концентраціями ДМСО (10 - 15%), незалежно від додавання білкових компонентів, відбувалася масова і значна вакуолізація цитоплазми (рис. 4.1).

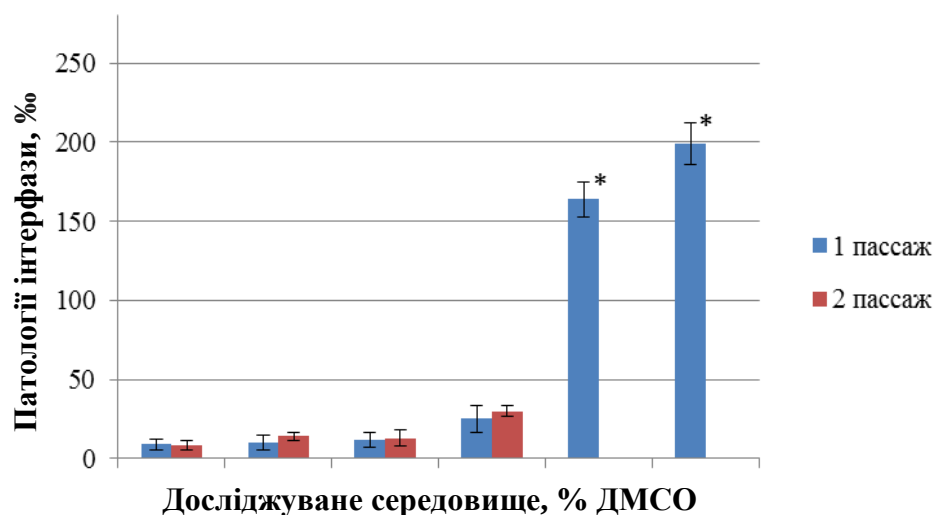


Рис. 4.2. Відносна кількість клітин з патологічною морфологією, що пройшли експозицію з різними концентраціями ДМСО, %.

* – відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Найбільшу частину патологій становили поліплоїдні клітини (з розмірами, що перевищують нормальний в 4-10 разів), клітин з мікроядрами і з декількома ядрами. Показано, причиною появи багатоядерних клітин, до яких відносяться і клітини з мікроядрами, є передчасна конденсація хромосом, в клітинах, в яких не завершився S-період [119].

Додавання білково-пептидних добавок: 5% білкового гідролізату тканин риб (молекулярна маса ≤ 5000 Да) і БСА модулювати вплив ДМСО. Найбільш значущим ефектом добавок було збереження життєздатності культури після впливу високих – 12,5 і 15% концентрацій кріопротектора. У той же час, дані культури містили значний пул клітин, які мають патології. Патологіями, що зустрічалися найчастіше, були клітини з мікровезикулами мембрани, поліплоїди, багатоядерні клітини і клітини з мікроядрами.

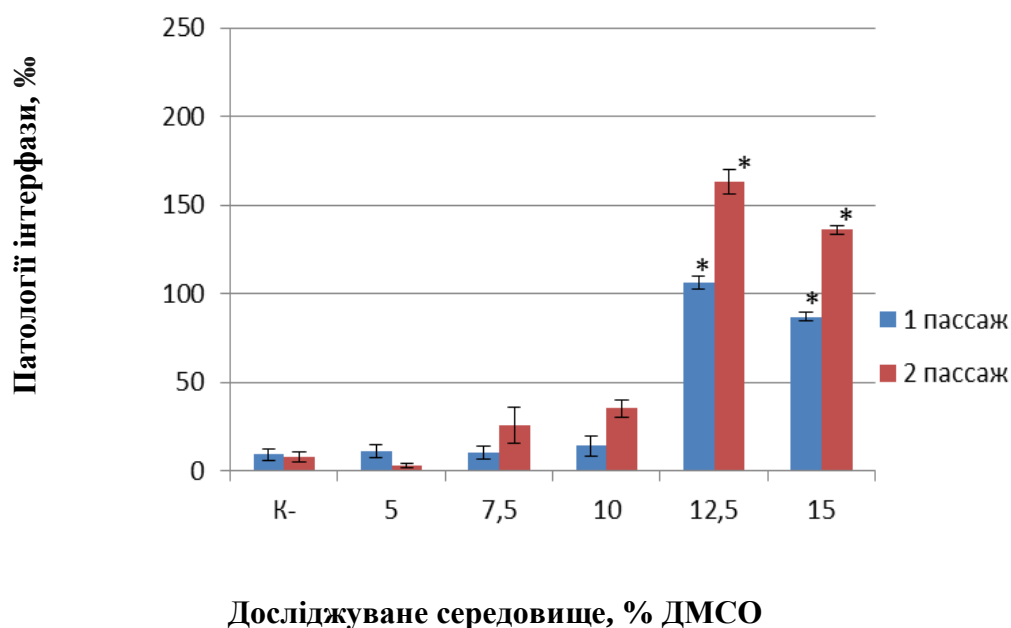


Рис. 4.3. Відносна кількість клітин з патологічною морфологією в культурі ДП, оброблених ДМСО в поєднанні з 5% Албутрісан

* – відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

При порівнянні між собою груп, яким разом з ДМСО вносилися Албутрісан і БСА, значущих відмінностей не виявлено – в обох групах число

патологій різко зростає при внесенні 12,5% і 15% ДМСО. Однак слід зазначити тенденцію до зниження числа патологій в групі з застосуванням Албутрісан в порівнянні з БСА.

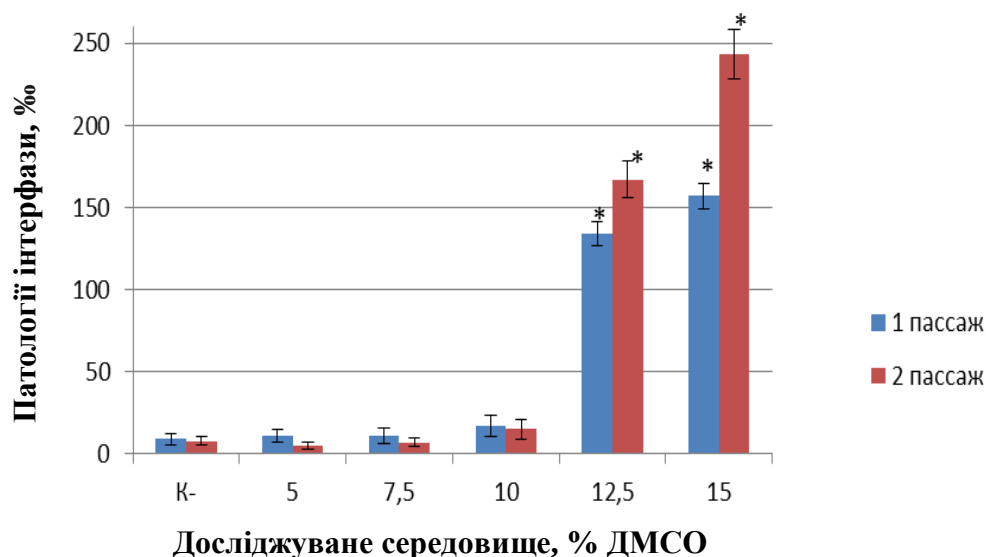


Рис. 4.4 Відносна кількість клітин з патологічною морфологією в культурі ДП, ДМСО в поєднанні з 5% БСА

* – відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Диметилсульфоксид являє собою високополярну речовину, у зв'язку з цим, розчини ДМСО є гіперосмотичними і здатні викликати дегідратацію при зануренні в них клітин. Вакуолізація цитоплазми – явище, пов'язане з набуханням структур ЕПС, при масовому розвитку патологія може призводити до загибелі клітин, що і було відзначено при культивуванні на 1 пасажі після контакту з концентраціями ДМСО вище 10%. Осмотичний стрес, викликаний високими концентраціями ДМСО, може мати подібні наслідки. Якщо розглядати процес пошкодження мембранних структур в більш широкому інтервалі часу – години і доби – пошкодження також може бути викликано окисним форфорилуванням ліпідів мембран і зниженням їх загального вмісту [171].

Було виявлено, що ДМСО послаблює поверхневу водну сітку поблизу ліпідної мембрани, знижує адгезію ліпідів до води і мінімізує пошкодження мембрани, викликані фазовим переходом [172]. Однак при підвищенні концентрації зневоднення посилюється, оскільки вода спрямовується з клітини в простір, що утворився. У групах, де крім ДМСО використовувалися білково-пептидні добавки, вакуолізації цитоплазми не спостерігалось. Це можна пояснити послабленням зневоднення клітин, а також непрямым захисним впливом добавок на мембрани, зниженням окисного фосфорилування [172]. Більш високу ефективність Албутрісану в зниженні числа патологій в порівнянні з БСА, можна пояснити тим, що склад гідролізату більш гетереогенний і включає низькомолекулярні пептиди та цукри [173].

Показано, що механізмом, що захищає клітину від осмотичного стресу, є формування микровезикул на клітинній мембрані. Гіперосмотичний стрес призводить до руйнування кортикального цитоскелету і відриву клітинної мембрани від кортикального цитоскелету, викликаючи утворення клітинних бульбашок. Множинні бульбашки знижують внутрішньоклітинне гідростатичний тиск, викликаний позаклітинним гіперосмотичним шоком, і послаблюють осмотичний пошкодження клітин, що знижує ступінь пошкодження клітин [172]. До певних концентрацій клітинні бульбашки можуть ефективно захищати клітину [174]. В даному експерименті спостерігали початок формування микровезикул при концентраціях ДМСО 10% - близько 8% клітин несли дану патологію, при 12,5 і 15% - вже 35 і 40% відповідно.

Формування микровезикул також супроводжує процес апоптозу – т.зв. «Закипання мембрани», даний процес також мав місце в досліджених культурах. Частина клітин, крім формування микровезикул, мали також інші ознаки, що свідчать про апоптотичні процеси – аномально конденсований хроматин, пікноз і фрагментація ядра. Таким чином, частина з клітин, що

мають ознаки блеббінга, були апоптотичні, особливо це стосується другого пасажу, коли осмотичного впливу на клітину вже не відбувалося. В літературі також є дані про здатність ДМСО знижувати проліферацію і індукувати апоптоз в культурі клітин за рахунок індукції синтезу про-апоптотичних білків [172].

ДМСО також впливає на цитоскелет на етапі формування мікротрубочок, шляхом зменшення ефективної концентрації води навколо мономерів тубуліну, що сприяє утворенню центрів нуклеації [128]. Внаслідок того, що полімери білка мають атипову структуру, вони утворюють коротші фібрили [129]. У зв'язку з цим, крім описаних ефектів на цитоскелет, важливою мішенню впливу ДМСО на клітину є центріолі. Зміни фібрил мікротрубочок можуть призводити до формування аномалій метафазної пластинки.

Ймовірним наслідком порушень веретена є також формування мікроядер (МЯ), які ми також реєстрували в культурі. Слід розрізняти різні типи МЯ, оскільки механізми, що ведуть до їх формування різні. МЯ формуються за двома основними механізмами – ацентрічних фрагментів, що відстали при розриві хромосом – це МЯ «стандартного» типу, значно менші за розміром ніж основне. Найбільшу кількість подібних ядер було зафіксовано в варіантах з введенням концентрацій 10% більше ДМСО без білково-пептидних добавок. Другий варіант – МЯ «основного» типу, однакового з ядром розміру, що формуються внаслідок утворення багатополюсного веретена поділу, відставання груп хромосом або відсутності цитокенеза. Найбільша кількість ядер цього типу зустрічалася в культурах, які пройшли експозицію з високими дозами ДМСО в поєднанні з 5% БГ.

Наслідком порушення веретена поділу є формування поліплоїдних клітин, частка яких значно зростала і досягала 20% при високих концентраціях ДМСО. У разі подальшого поділу поліплоїдних клітин, при нормальному перебігу процесів дуплікації, відбувається накопичення поліплоїдів в культурі і багатоядерних клітин, що і спостерігалось на

другому пасажі. Виникнення багатополюсного веретена призводить до порушення сегрегації хромосом і виникнення анеуплоїдних клітин. Анеуплоїдія може призводити до відсутності пунктів контролю проліферації і порушення механізмів загибелі клітин. Клони нащадків таких клітин можуть служити основою для трансформації клітин і росту пухлин [130].

Таким чином, білково-пептидні добавки здатні чинити протекторну дію на тлі високих концентрацій ДМСО. Їх компоненти, ймовірно, знімають блок клітинного циклу в критичних точках мітозу і фази G1, що сприяє збереженню життєздатності клітин, однак веде до накопичення аномалій.

4.2 Вплив інкубації з кріопротекторами на формування патологій поділу в КПНГ ДП при культивуванні у вигляді моношару

Дослідження мітотичного режиму показало приблизно однакову кількість клітин за стадіями клітинного циклу як в контрольних, так і в експериментальних зразках.

Табл. 4.2

МІ (%) клітин ДП, оброблених в розчинах ДМСО і БСА.

Розчин	МІ, (1 пасаж)	МІ, (2 пасаж)
Контроль	23±4,30	41±5,92
5% ДМСО	35±3,65	19±2,22*
7,5% ДМСО	25±4,65	19±3,11*
10% ДМСО	28±4,5	25±5,35
12,5% ДМСО	23±1,26	0*
15% ДМСО	29±2,89	0*
5% ДМСО+БСА	20±3,56	25±4,2
7,5% ДМСО+БСА	20±3,77	30±3,11
10% ДМСО+БСА	19±2,06	36±4,65
12,5% ДМСО+БСА	19±3,5	35±3,1

* – відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

МІ на 2 добу культивування інтактних клітин ДП (контроль) на 1-му пасажі становив $23 \pm 4,30\%$, а на 2-му – $41 \pm 5,92\%$ (таблиця 4.2). Значущих відмінностей МІ в культурах, оброблених ДМСО соло або в присутності БСА, на 1-му пасажі не спостерігалось.

На 2-му пасажі в зразках, інкубованих з ДМСО в концентраціях від 5 до 10%, виявлено зниження МІ в порівнянні з контролем приблизно в 2 рази ($p < 0,05$). У разі обробки високими концентраціями ДМСО (12,5 та 15%) спостерігалось припинення поділу клітин. При цьому додавання БСА до розчину ДМСО мало протекторну дію, оскільки МІ клітин, що інкубувалися в середовищі з ДМСО в концентраціях від 5 до 10%, значимо не відрізнявся від контролю, а МІ клітин, оброблених з 12,5 і 15% ДМСО, зберігався в межах 25-35%.

Основні види патологічних мітозів, які зустрічались в досліджених культурах, представлені на рис. 4.2 – переважали різні порушення веретена поділу та патології, що можуть бути зумовлені неправильною конденсацією хромосом.

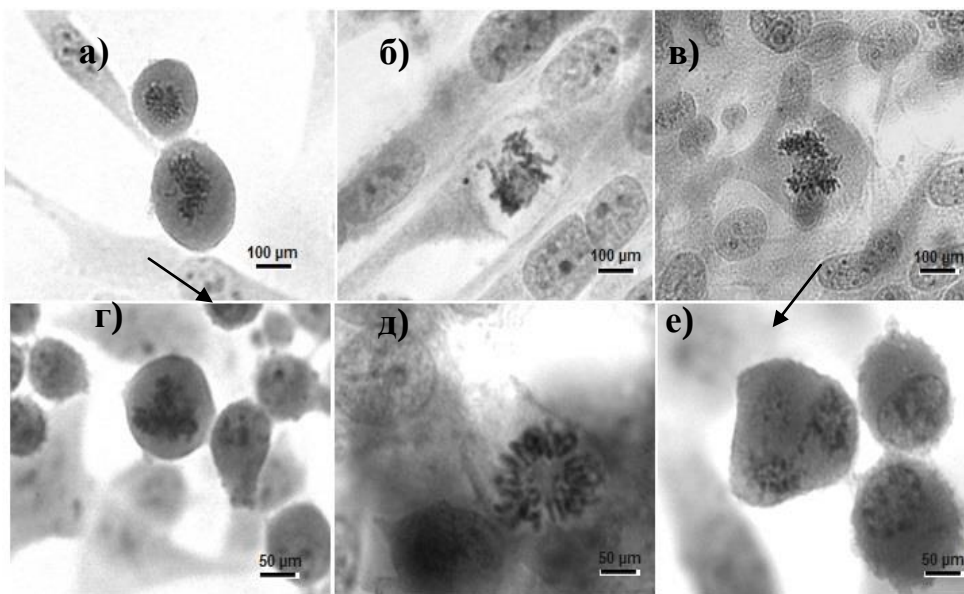


Рис 4.5. Патології мітозу в культурі клітин ДП (1 пасаж, 2 добу росту): а) нерівна телофаза і хромосоми, що відстали (стрілка); б) К-мітоз;

в) відставання хромосом в анафазі (стрілка); г) трьохполюсний мітоз метафаза; д) кільцева метафаза; е) триполюсний мітоз – анафаза.

Цитоморфологічний аналіз показав, що в інтактній культурі клітин ДП присутній незначна частина клітин з патологією мітозу. На 1-му пасажі даний показник становив $4,45 \pm 0,49\%$, а на другому $7,14 \pm 0,79$ (рис. 2). При цьому хромосомні мости і відставання хромосом в анафазі були найбільш поширеними аномаліями мітозу.

На 1-му пасажі кількість патологій мітозу в культурах, оброблених ДМСО в концентраціях від 5 до 10%, мало тенденцію до збільшення в порівнянні з контролем (рис.4.6). При інкубації з ДМСО в концентраціях 12,5 та 15% рівень патологій мітозу значущо ($p < 0,05$) зростає до $15,0 \pm 1,2$ і $14,3 \pm 1,2\%$, відповідно. Серед патологічних форм переважав К-мітоз.

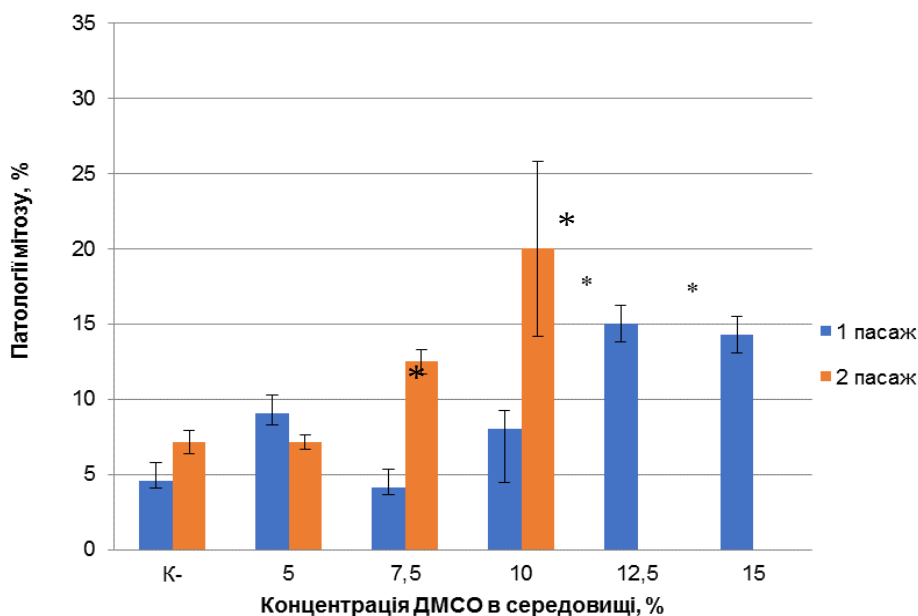


Рис. 4.6 Відносне число патологій мітозів в культурах клітин ДП 1-го і 2-го пасажів, оброблених ДМСО без добавок в різних концентраціях.

Примітка: * відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

На 2-му пасажі в культурах, оброблених ДМСО в концентрації 10% і вище, відбувалося істотне збільшення числа патологій як в порівнянні з контролем, так і з 1-м пасажем (рис.4.6). Інкубація з більш високими

концентраціями (12,5 і 15%) призводила до зупинки поділу і деградації клітин, тому дані на малюнку не приведені.

При інкубації клітин з різними концентраціями ДМСО в поєднанні з 5% БСА на 1-му пасажі не відбувалося значного збільшення кількості патологій мітозу в порівнянні з контролем (рис. 4.6). На 2-му пасажі спостерігалася збереження пулу клітин, які діляться, оброблених високими концентраціями ДМСО (12,5 і 15%) в присутності БСА, на відміну від обробки лише ДМСО (рис. 4.7). При цьому, у всіх культурах, оброблених комбінацією БСА з ДМСО в концентраціях від 10% і вище, збільшувалася кількість клітин з патологіями ділення як в порівнянні з інтактним контролем (рис.4.6), так і в порівнянні з обробкою ДМСО без БСА. Можливо, БСА має деякий токсичний вплив на досліджену культуру, проте збереження клітин від високих концентрацій ДМСО свідчить про його протективні властивості, що дозволяють уникати серйозних порушень, що виявляються фатальними.

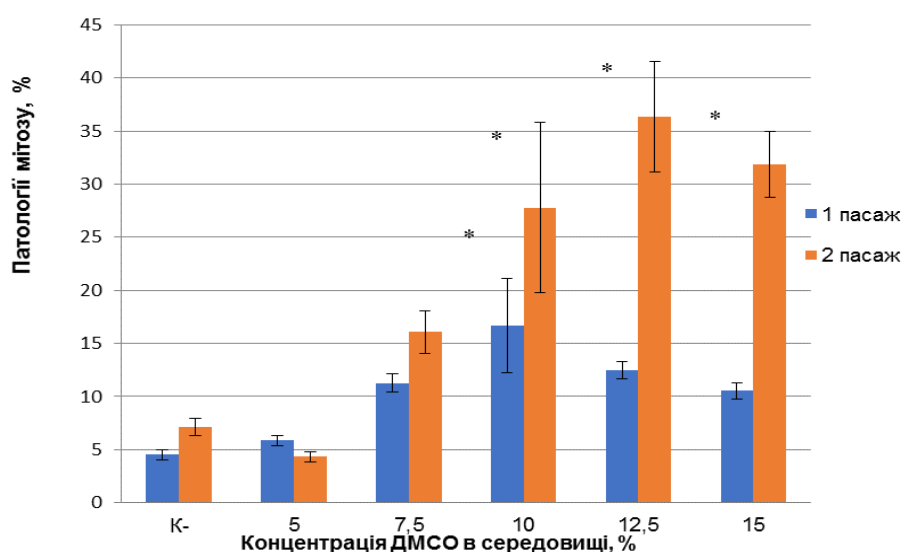


Рис. 4.7. Відносне число патологій мітозу в культурах клітин ДП 1-го і 2-го пасажів, оброблених ДМСО в різних концентраціях в присутності 5% БСА. Примітка: * відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

В той же час, при додаванні Албутрісан спостерігалася виражена тенденція до зменшення числа патологій на другому пасажі (рис. 4.8),

порівняно з першим, що може свідчити про певний антимуtagenний ефект, що дозволяє уникнути накопичення патологій. Можливо, механізмом, що знижує кількість патологій на 2-му пасажі, є загибель клітин з летальними порушеннями, що можна вважати деяким протективним впливом. На кількість патологій на першому пасажі в інших віріантах концентрацій добавка не чинила значного впливу. Таким чином, Албутрісан допомагає уникати летальних пошкоджень, проте не чинить захисної дії при низьких концентраціях ДМСО. В той же час, не відмічено зростання патологій, що може свідчити про відсутність токсичного впливу.

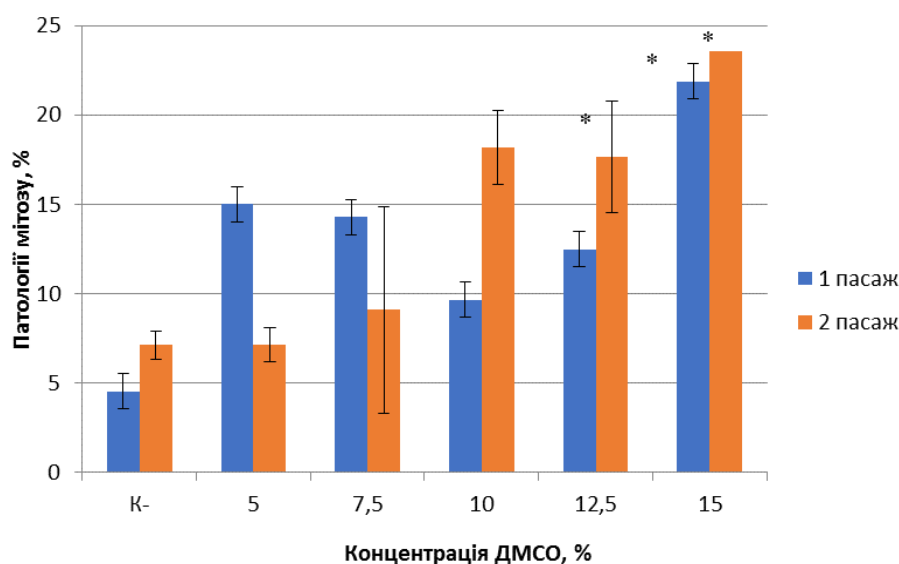


Рис. 4.8. Відносне число патологій мітозу в культурах клітин ДП 1-го і 2-го пасажів, оброблених ДМСО в різних концентраціях в присутності 5% Албутрісан. Примітка: * відмінності статистично значущі в порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Збільшення кількості патологічних мітозів в культурі клітин ДП, виявлене нами, можливо обумовлено модифікуючим впливом ДМСО на мікротрубочки. При цьому важливу роль відіграє концентрація речовини. У високих концентраціях ДМСО (12,5 - 15%) спостерігається зростання показника в два рази, тоді концентрації від 5 до 7,5% не призводять до його

значних змін в порівнянні з контролем. Це відповідає результатам, які так само не виявили патологій митозів в культурі мезенхімальних стромальних клітин після інкубації з 5% ДМСО [175].

Цікаво, що кількість патологій митозів в оброблених клітинах збільшується на 2-му пасажі в порівнянні з 1-м, тобто вплив ДМСО на клітину продовжується після видалення речовини з середовища інкубації і носить пролонгований характер. Ці дані з даними, отриманими Johnson M. і співавт., які показали часткову незворотність дії ДМСО на веретено поділу в ооцитах миші [176]. Такий відтермінований вплив ДМСО пояснюється через опосередковані впливи на клітинні структури, що вже були спровоковані, а також прямим ефектом – оскільки частина речовини залишається в клітині після вилучення з середовища [170, 177, 178].

Таким чином, моніторинг культури безпосередньо після впливу ДМСО і протягом 1-го пасажу в повному обсязі відбиває дійсну ступінь пошкодження генетичного апарату клітин, що необхідно враховувати при подальшому використанні їх для трансплантації.

Відомо, що сироватка крові або очищений сироватковий альбумін сприяють збереженню життєздатності клітин при заморожуванні у присутності проникаючих кріопротекторів, таких як ДМСО [179]. Вважається, що високомолекулярні білкові добавки беруть участь в стабілізації структури клітинної мембрани і зменшенні пошкоджень, викликаних осмотичним стресом, що розвиваються при внесенні ДМСО. Крім того, білкові компоненти середовища знижують негативні ефекти, що надаються ДМСО на текучість мембрани і фазові переходи ліпідів в ній, за рахунок чого в клітці зберігаються нормальні цитоскелет-мембранні і рецепторні взаємодії [177, 179].

У наших експериментах додавання БСА, сприяло виживанню клітин в умовах обробки високими концентраціями ДМСО і призводило до зниження кількості патологій мітозу. Наприклад, обробка 12,5 - 15% ДМСО приводила

до зупинки поділу клітин на 2-му пасажі (рис. 4.2). У тих же умовах, але в присутності БСА, в культурі спостерігалось достатню кількість клітин, які діляться (рис. 4.3). Однак потрібно підкреслити, що патологій митозов серед них була переважна кількість (до 35%). Це може пояснюватися тим, що в присутності БСА індуковані ДМСО зміни в апараті клітинного ділення не купують летальний характер, але накопичився негативний ефект високих концентрацій кріопротектори проявляється пізніше на 2-му пасажі у вигляді зростання аномальних мітозів. Таким чином, застосування білкових добавок призводить до зниження токсичної дії ДМСО і сприяє збереженню культури клітин ДП після впливу високих концентрацій речовини. Однак ті, що вижили клітини можуть мати як нормальну, так і трансформовану природу. Можливо кілька варіантів подальшого розвитку культури, що включають постмітичну загибель клітин, їх патологічну трансформацію або повернення до нормального генотипу шляхом деплоїдації [180].

Найкращий результат спостерігався при обробці клітин ДМСО в концентрації 5% в присутності БСА. У цьому випадку як на 1-му, так і на 2-му пасажах не спостерігалось значних відмінностей МІ (див. Таблицю) і відносної кількості патологій митозов (рис. 3) в порівнянні з контролем, що свідчило про відсутність порушень, що впливають на елементи мітотичного апарату клітини. Таким чином, при розробці протоколів кріоконсервування клітин ДП можна рекомендувати кріозахисного середу, яка включає ДМСО в 5% -й концентрації в комбінації з БСА.

Таким чином, у групах, де крім ДМСО використовувалися білково-пептидні добавки, вакуолізації цитоплазми не спостерігалось. Це можна пояснити послабленням зневоднення клітин, а також непрямим захисним впливом добавок на мембрани, зниженням окисного фосфорилювання [181]. Більш високу ефективність Албутрісан в зниженні числа патологій в порівнянні з БСА, можна пояснити тим, що склад гідролізату більш гетереогенний і включає низькомолекулярні пептиди та цукри [182].

Як вже було сказано в попередніх розділах, ДМСО також впливає на процес організації мікротрубочок та порушення вертена поділу. Це є безпосереднім механізмом впливу ДМСО на центріолі, що призводить до формування аномалій метафазної пластинки. Одним з можливих шляхів впливу використаних добавок є захист структурних білків від зневоднення.

На культурі клітин лімфоцитів показано, що ДМСО може інгібувати формування клітинного контакту і оборотно затримати клітини на початку G1 клітинного циклу, викликаючи затримку поділу і швидкості росту культури. [124]. Якщо такий механізм є дозозалежним, то збільшення концентрації ДМСО може призводити до поступової деградації культури внаслідок затримки поділу. Можливо, такий механізм мав місце при використанні 12,5 та 5% ДМСО, коли клітини 2го пасажу зупинили проліферацію.

На культурі клітин гібридами мишей показано, що ДМСО впливає на синтез про-апоптичного білка p53, модулюючи активність про-апоптотичних киназ і регулюючи синтез циклінів. [124, 186]. Можна припустити, що цей механізм є універсальним, і вплив на перебіг мітотичного циклу в культурі ДП аналогічний наведеному. В нашій роботі, серед інших патологій, відмічено також велику долю апоптотичних клітин. А саме, при концентраціях ДМСО 10% і вище в поєднанні з білково-пептидними добавками, виявлялося до 20% клітин, що мають ознаки апоптозу - аномальну конденсацію хроматину, пікноз ядер, формування мікровезикул, відбувається фрагментація клітин.

4.2.1 Вплив кріоконсервавання на формування патологій поділу в культурах КПНГ ДП неонатальних кроликів

Після проведення дослідження по впливу кріозахисних середовищ, було проведене кріоконсервування суспензії клітин ДП з усіма дослідженими середовищами. Заморожування відбувалося за методикою охолодження 1

град/хв до -80°C з подальшим зануренням в рідкий азот. Зберігалися клітини до моменту деконсервування протягом 1,5 місяців.

Після швидкого відігріву при 37°C , була підрахована цілісність при фарбуванні трипановим синім. У всіх середовищах цілісність клітин після відігрівання була досить високою понад 80% (Таблиця 4.3), значного порушення цілісності клітин даим методом виявлено не було. Спостерігається тенденція до більшого виживання клітин в середовищах з додаванням БСА і ФТС, ймовірно, високомолекулярні білкові добавки беруть участь в стабілізації структури клітинної мембрани і зменшенні пошкоджень, викликаних осмотичним стресом [184]. Крім того, білкові компоненти середовища знижують негативні ефекти, що чинить ДМСО на текучість мембрани та фазові переходи ліпідів в ній [185].

Таблиця 4.3.

Цілісність клітин в культурах ДП кролика після кріоконсервування в різних кріозахисних середовищах

кріозахисне середовище											
ДМСО, %	10; 5% ФТС	5	7,5	10	12,5	15	5	7,5	10	12,5	15
БСА, %	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5
цілісність, %	96,0	83,67	87,33	89,33	85,33	84,67	93,67	89,67	93,00	94,33	88,00
	$\pm$ 2,00	$\pm$ 5,51	$\pm$ 2,52	$\pm$ 4,16	$\pm$ 1,53	$\pm$ 3,51	$\pm$ 4,73	$\pm$ 2,52	$\pm$ 2,65	$\pm$ 4,04	$\pm$ 3,00

Виявилося, що рівень патологій в культурі після відігрівання і 3 діб культивування зростав пропорційно до концентрації ДМСО (рисунок 4.9). Значуще зростання рівня патологій в порівнянні з контролем відбувалося при використанні концентрацій ДМСО 12,5 і 15%. Як видно з таблиці 4.3, всі

культури на першому пасажі після деконсервування несуть певний пул клітин з патологіями, в концентраціях ДМСО в межах 5-10% він не має суттєвих відмінностей. Значуще підвищення рівня патологій спостерігається при використанні 15% ДМСО.

Серед патологій мітозу зустрічалися порушення веретена поділу: багатополосний, асиметричний, багатоцентричний мітоз, тригрупові метафаза, порожниста метафаза, К-мітоз, хромосомні мости і відставання хромосом в анафазе. Серед патологій клітин в інтерфазі зустрічалися мікроядра, клітини з декількома ядрами, поліплоїди. Найбільшу частку патологій інтерфази становили при впливі високих концентрацій ДМСО (12,5 і 15%), що свідчить про їх токсичності. Причиною зростання числа патологій, пов'язаних з цитоскелетом, може бути вплив ДМСО на полімеризацію мікротрубочок, механізм якого полягає в зменшенні ефективної концентрації води навколо мономерів тубуліну, що сприяє утворенню центрів нуклеації і аномальної полімеризації мікротрубочок [186].

В якості загальної тенденції ми відмітили зменшення рівня патологічних мітозів після деконсервування, порівняно з нативною культурою, що пройшла експозицію з ДМСО. Такі відмінності можуть бути зумовлені частковою втратою клітин при відмиванні після відігріву. Ще однією відмінністю було виживання культури, кріоконсервованої з 12,5 та 15% ДМСО на другому пасажі (рис. 4.9), тоді як в аналогічних концентраціях після експозиції, нативна культура деградувала та поділів на другому пасажі ми не відмічали (рис. 4.2).

При концентраціях ДМСО 12,5 і 15% на 1 і 2 пасажі масово зустрічалися апоптотичні клітини - з пікнотичної ядрами, аномальною конденсацією хроматину в ядрі, формувалися апоптотичні тільця. У літературі є дані про здатність ДМСО знижувати проліферацію і індукувати апоптоз в культурі клітин за рахунок індукції синтезу про-апоптотичних білків [124, 186].

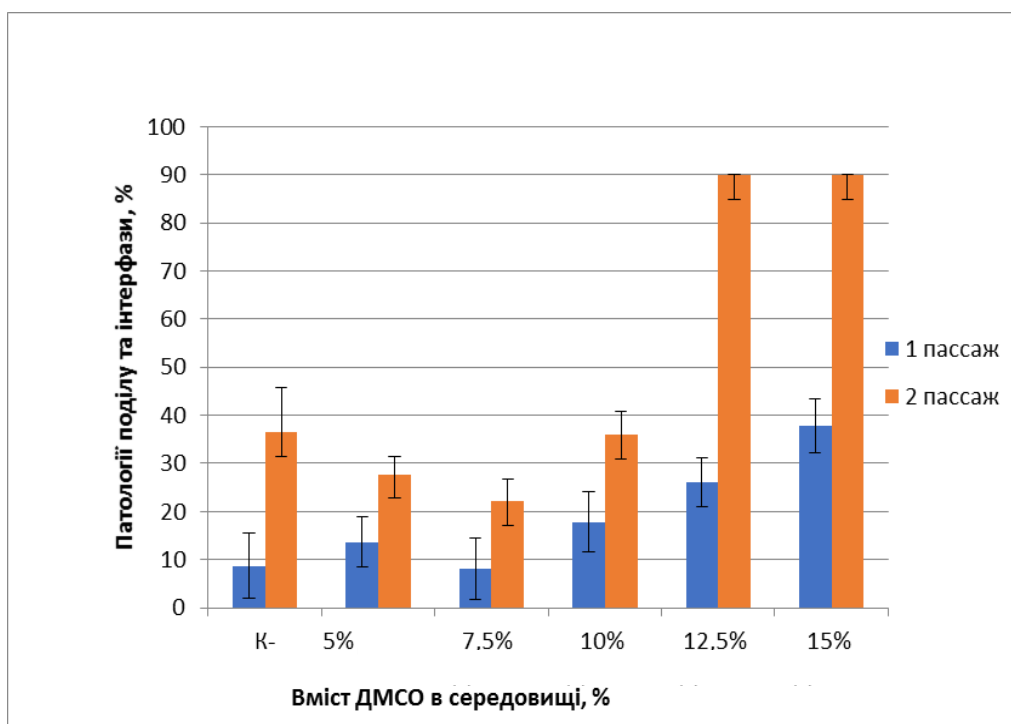


Рис. 4.9. Відносне число патологій на 1 та 2 сасажах в культурі клітин ДП, кріоконсервованій з додаванням ДМСО.

В той же час, на другому пасажі відбувалося зростання рівня патологій в культурі, що свідчить про накопичення помилок в генетичному матеріалі після кріоконсервування. Найвищим рівень патологій був при використанні 12,5 та 15% ДМСО, і досягав 90%. При цьому слід зазначити, що стандартні методи контролю – підрахунок цілісності трипановим синім та адгезії до пластику, не виявив ніяких гострих токсичних впливів. У зв'язку з цим, зрозуміло, що більшість патологій, що виникають при кріоконсервуванні з високими концентраціями ДМСО, є сублетальними, проте мають значні довгострокові ефекти.

Додавання білкових добавок (Албутрісан і БСА) не чинило значущого впливу на рівень патологій при використанні низьких концентрацій ДМСО – 5 та 7,5% (рис. 4.10; 4.11). Проте на тлі дії високих концентрацій – 10% і більше, значуще знижувався загальний рівень патологій в культурі.

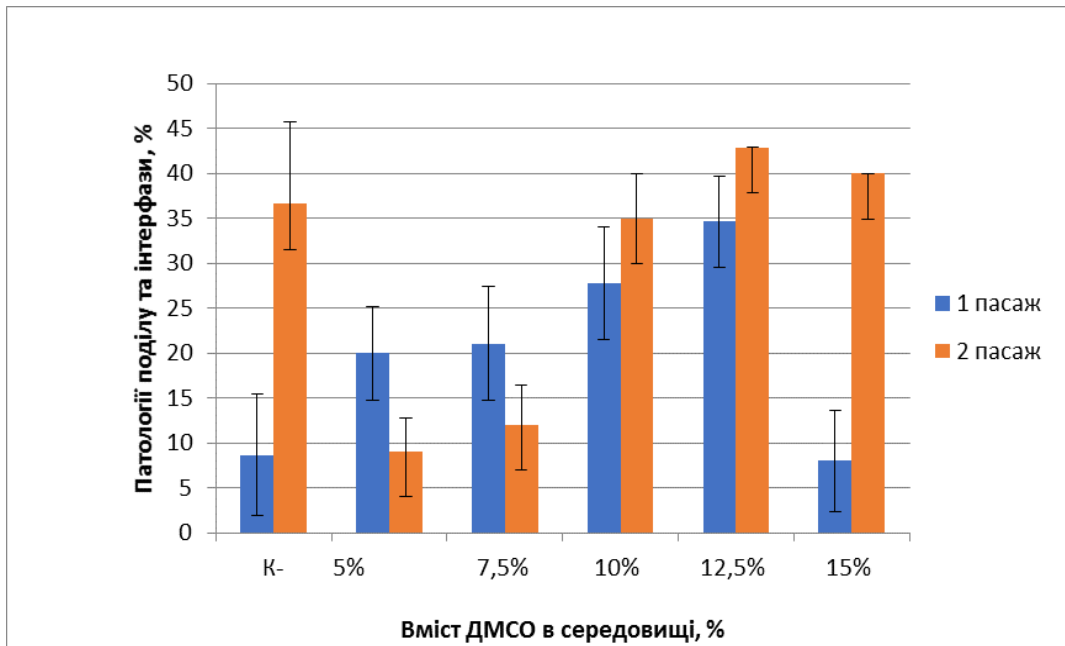


Рис. 4.10. Відносне число патологій на 1 та 2 сасажах в культурі клітин ДП, кріоконсервованих з додаванням ДМСО та 5% БСА .

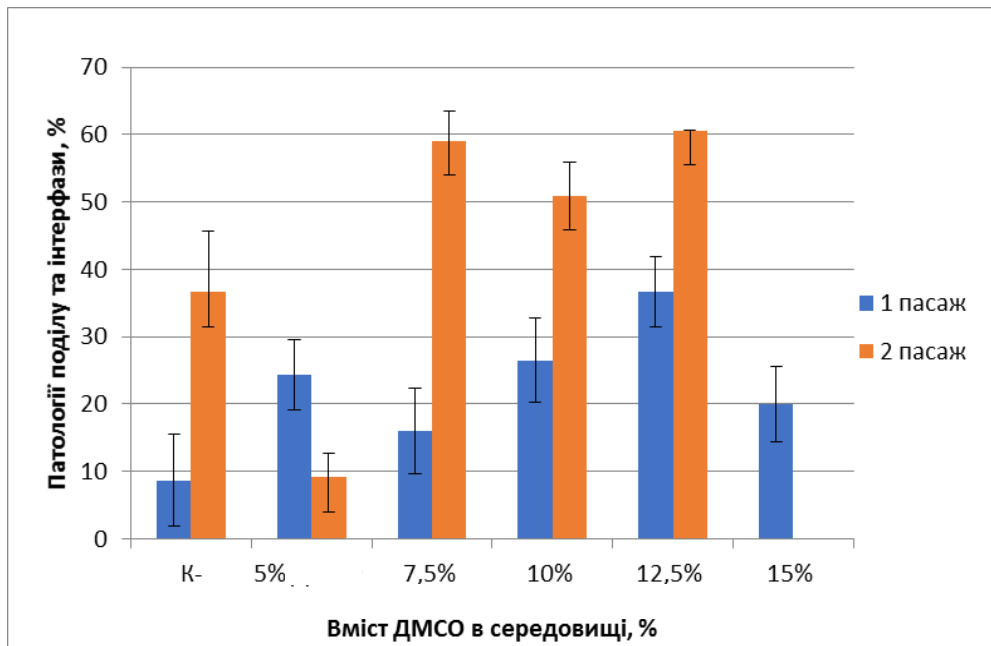


Рис. 4.11. Відносне число патологій на 1 та 2 сасажах в культурі клітин ДП, кріоконсервованих з додаванням ДМСО та 5% Албутрісан .

При додаванні 5% Албутрісану в поєднанні з 15% ДМСО, на 2-му пасажі не відбувалося поділу клітин, і культура деградувала. Можливо, це є свідченням посилення токсичного впливу ДМСО, проте має позитивний

практичний результат, оскільки елімінуються нежиттєздатні культури, рівень яких при використанні лише 15%ДМСО, досягає 90% (рис. 4.9).

Таким чином, токсичний вплив ДМСО на клітини ДП проявляється у вигляді підвищення числа патологій поділу, в той час як цілісність клітин при відігріванні порушується менш ніж у 20% клітин. Більша частина клітин, які мають патології, зберігають здатність до поділу, проте він перебігає з порушеннями [187]. Процеси апоптозу і мітотичної катастрофи є механізмами програмованої загибелі клітин, і на рівні клітинної популяції сприяють елімінації ушкоджених клітин, що ми і спостерігаємо після доконсервування і в ході подальшого культивування клітин.

4.3 Вплив кріоконсервування на характер росту та розселення КПНГ ДП у вигляді МС

В попередніх розділах були описані деякі закономірності МС з ДП, характерні для нативної культури. Була показана можливість культивування деконсервованих клітин ДП кролика у вигляді МС без додавання ФТС. В умовах відсутності ФТС, при використанні ростових добавок - В27 або Нейромакс, відбувається формування 3D-культур МС. Таким чином, характер росту культури повністю залежить від морфогенетических чинників, присутніх в ембріональній сироватці. Отже для вивчення впливу кріоконсервування на МС ДП, ми мали підібрати безсироваткові кріозахисні середовища. Більшість середовищ передбачає додавання ФТС при кріоконсервуванні. Тому, базуючись на літературних даних [170], в якості контролю використали середовище на основі ФТС, а в якості дослідних – використали пептидні добавки Албутрісан та БСА. Для кріоконсервування МС ДП використовували концентрації ДМСО 5% та 10% з додаванням 10% ФТС, на основі даних щодо кріоконсервування МС НН [197].

Середній розмір сфероїдів, виміряний на 14 добу після пересіву, становив $235,00 \pm 17,78$, спостереження свідчать, що після цього терміну сфероїди більше не збільшувалися в розмірах і починали деградувати.

Середній розмір сфероїдів, виміряний на 14 добу після кріоконсервування, становив $128,25 \pm 16,5$ ($p = 0,05$). Таким чином, спостерігається значуще зменшення розмірів МС, які формуються з кріоконсервованої культури. Проте ріст сфероїдів продовжувався довше, досягаючи розмірів нативної культури (рис. 4.12).

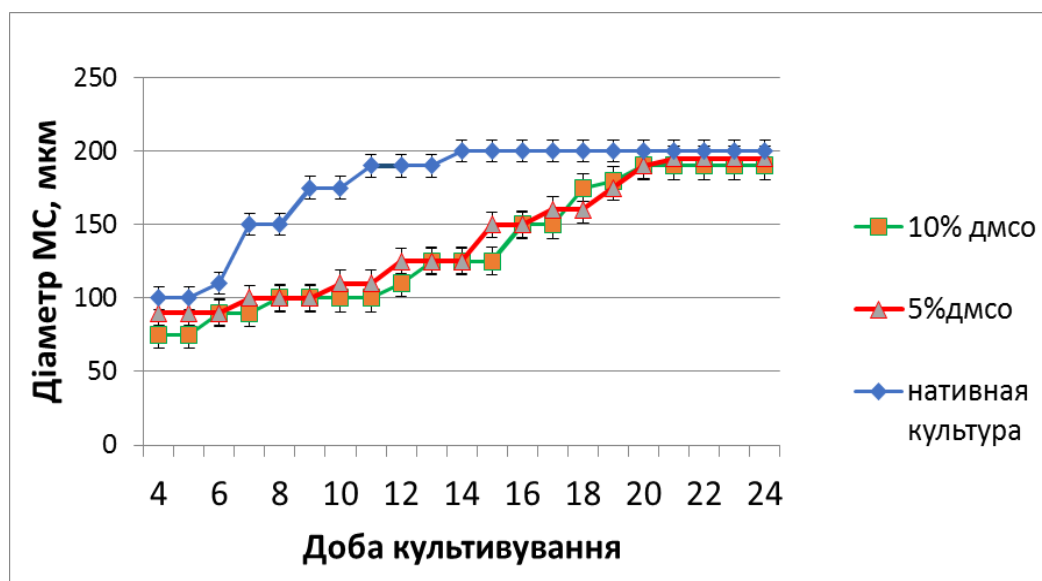


Рис. 4.12. Динаміка росту МС в нативній та кріоконсервованій культурах ДП колика

Динаміка росту культур вказує на продовження поділу клітин в складі МС, в той час як контактне гальмування клітин в складі моношару призводить до значного уповільнення їх поділу. Уповільнення швидкості росту сфероїдів і їх деградація (починається через 20-25 діб росту), що пов'язане з порушенням транспорту поживних речовин до глибоких шарів клітин і накопиченням продуктів їх розпаду. Відмінності в розмірах сфероїдів, ймовірно, пов'язані з порушенням агрегації клітин на етапі формування, внаслідок чого формується більше дрібніших сфероїдів, при цьому загальна кількість клітин культури зберігається.

Була досліджена швидкість проліферативних процесів в моношарі та МС нативної культури та кріоконсервованої в середовищі з 5% ДМСО та 5%

БСА (табл. 4.4). В нативній культурі КП на 3 добу культивування в моношарі та МС склав $5,44 \pm 0,33$ та $4,27 \pm 0,54$ відповідно. Дослідження проліферативної активності деконсервованих клітин складі моношару показало, що КП на 3 добу культивування становить 5,93 і значуще не відрізняється від такого в нативній культурі; КП клітин в складі сфероїдів становив 3,87. Таким чином, в обох культурах спостерігалась культура сповільнення поділу клітин в МС. На 7 добу спостереження аналогічна тенденція зберігалася в обох культурах.

Табл. 4.4

**Коефіцієнт проліферації в культурі клітин ДП при різних способах
культивування**

Доба росту	Нативна культура		Кріоконсервована культура	
	моношар	сфероїди	моношар	сфероїди
3	$5,44 \pm 0,33$	$4,27 \pm 0,54$	$5,93 \pm 0,21$	$3,87 \pm 0,29$
7	$8,39 \pm 0,36$	$6,17 \pm 0,62$	$8,87 \pm 0,29$	$5,53 \pm 0,62$
10	$9,10 \pm 0,29$	$9,87 \pm 0,33$	$8,53 \pm 0,36$	$10,36 \pm 0,35$

Після досягнення конfluентності моношару, тенденція змінилася КП прикріпленої культури залишився практично незмінним 8,53, в той час як в МС збільшився майже в 2 рази в порівнянні з 7 добою 10,36. Порівнявши показники КП в сфероїдах нативної та кріоконсервованої культури між собою, ми встановили, що значущих відмінностей в швидкості проліферації клітин в складі сфероїдів після кріоконсервування, в порівнянні з нативною культурою, немає (табл. 4.4).

Була досліджена також швидкість формування моношару в культурах, отриманих з МС нативної культури та кріоконсервованих у двох видах ростового середовища – 5% ДМСО з 5% БСА та 10% ДМСО з 5% БСА. Відносний відсоток площі моношару, який займала культура, оцінювався

візуально. Кількість МС, що висівалися в кожну лунку кожної з культур, була нормалізованою і становила 50+5 МС на лунку 6-лункового планшета.

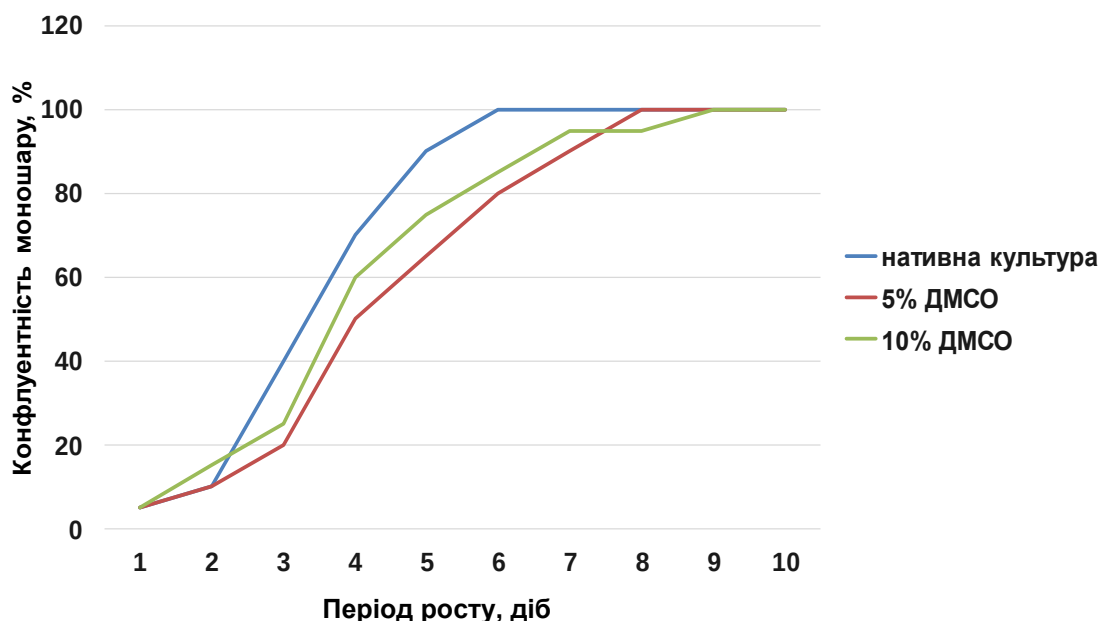


Рис. 4.13 Швидкість формування моношару в нативній культурі та культурах, кріоконсервованих в середовищах з різною концентрацією ДМСО

В результаті спостережень ми дійшли висновку, що швидкість росту моношару нативної культури була вищою до 6 доби культивування (рис. 4.13), тоді як кріоконсервовані культури мігрували та поділялись дещо повільніше. Однак вони продовжували ріст та формували конфлуентний моношар на 8-9 добу культивування.

Таким чином, кріоконсервування призводить до суттєвого зменшення розміру МС, виміряного на 14 добу росту. Це може бути пов'язано з уповільненням агрегації клітин при формуванні МС та процесів проліферації, проте до 25 доби МС досягають розмірів нативного контролю. Кріоконсервування не чинить значного впливу на інтенсивність проліферації клітин в культурі ДП кролика як в складі моношару, так і МС. В літературі зустрічаються численні дані, що підтверджують зворотнє сповільнення росту різних типів КПНГ ДП після деконсервування. [81, 188, 190].

За матеріалами розділу 4 опубліковані роботи [23-26, 30, 34, 35].

5. ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ПОПУЛЯЦІЮ ХРОМОГРАНІН-А ПОЗИТИВНИХ КЛІТИН В КУЛЬТУРІ КПНГ НН ПОРΟΣЯТ

Нами здійснювалося дослідження ХрА-експресуючих клітин в культурах, отриманих з нативних та кріоконсервованих НН. Раніше була показана можливість кріоконсервування КПНГ НН поросят [191] та показана наявність ХрА-секретуючих клітин в цих культурах. Для отримання культур клітин НН, фрагменти залоз неонатальних поросят були розділені порівну на 2 частини – одну з них кріоконсервували, іншу – використовували для отримання культури негайно (рис. 5.1). Після зберігання в рідкому азоті, з кріоконсервованої культури за аналогічною методикою виділялася первинна культура клітин. Далі культури аналізувалися аналогічно. В кожній було вичено 2 популяції клітин – флотуюча та адгезивна.

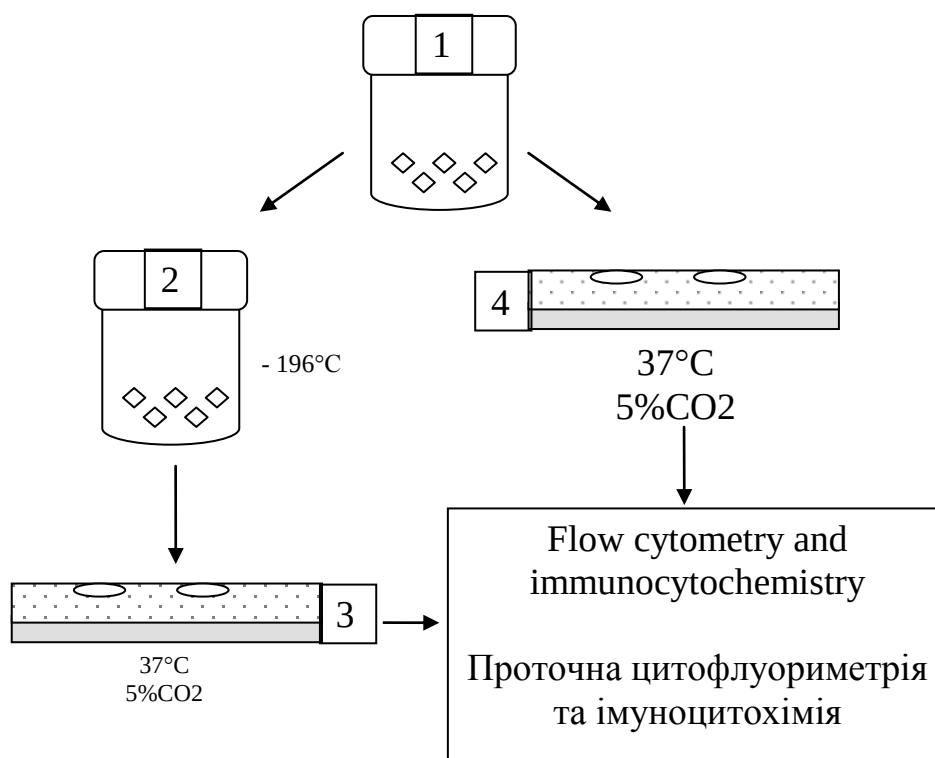


Рис. 5.1 Схема експерименту з отримання та кріоконсервування первинної культури клітин надниркових залоз: 1 - інтактні фрагменти тканини надниркових залоз; 2 - кріоконсервовані фрагменти тканини надниркових залоз; 3, 4 - культури клітин, отримані з інтактних (контроль) і кріоконсервованих фрагментів тканини.

Спочатку в нативній культурі клітин НН, отриманих в неадгезивних умовах, при перенесенні в середовище з ФТС, було виявлено два типи клітин: округлі слабо прикріплені клітини середнього розміру та великі розпластані фібробластоподібні клітини моношару. Враховуючи морфологічні ознаки, нами було зроблено припущення, що округлі клітини є хромафінними клітинам мозкової речовини НН. Однак для ідентифікації фенотипової приналежності цих клітин нами було проведено мічення антитілами до ХрА. Відомо, що цей білок з сімейства гранінів у великій кількості міститься в нейро-ендокринних клітинах, в тому числі й в мозковій речовині НН, тому є специфічним маркером хромафінних клітин [192, 193]. Ця слабкоадгезивна популяція клітин була досліджена шляхом цитофлуориметричного аналізу на наявність ХрА шляхом мічення специфічними антитілами. Кількісний аналіз дозволив встановити, що 93% округлих неприкріплених клітин забарвлюються антитілами до ХрА. При аналізі субпопуляції адгезивних фібробластоподібних клітин позитивного мічення антитілами до ХрА не було виявлено.

Таким чином, була показана наявність в культурі НН неонатальних поросят популяції ХрА-позитивних клітин що, ймовірно, є попередниками хромафінних клітин НН.

На наступному етапі роботи ми мали на меті встановити співвідношення флотуючих та прикріплених клітин в нативній та кріоконсервованій культурах. Морфологічний та функціональний поліморфізм культури, що проявляється, в тому числі, в характері росту, був вже раніше показаний при культивуванні КПНГ поросят [194]. Були досліджені всі клітини, що знаходились в культурі, окремо – в прикріпленій популяції, окремо – у флотуючій. Дослідження проводилось шляхом мічення специфічними антитілами до Хр-А та аналізувалися на проточному цитофлуориметрі. Показана наявність флотуючої та адгезивної субпопуляцій, та встановлено наявність деяких імунохімічних особливостей у них. Культури, отримані

нами, мали подібну структуру, яка зберігалася і після кріоконсервування (Табл. 5.1). На початку культивування Хр-А позитивні клітин переважали в складі прикріпленої популяції (представленої моно шаром та прикріпленими МС) – як в нативній, так і в деконсервованій культурах. Співвідношення цих клітин в популяціях зберігалось протягом тривалого часу – до 12 доби культивування. Значуще зменшення кількості Хр-А позитивних клітин відбувалось лише на 15-у добу культивування – як в нативній, так і в деконсервованій культурах. Можливо, це пов'язане з міграцією Хр-А позитивних клітин до МС. Для уточнення структури популяції, надалі нами було проведено дослідження даних культур клітин шляхом цитохімічного аналізу.

Табл. 5.1

Кількість Хр-А-позитивних клітин в культурах КПНГ НН поросят

Термін культивування, доба	Нативна культура, %		Кріоконсервована культура, %	
	флотуюча субпопуляція	адгезивна субпопуляція	флотуюча субпопуляція	адгезивна субпопуляція
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*

* - відмінності статистично значущі порівняно з 2 добою культивування, $p < 0,05$.

На наступному етапі дослідження в контрольній і кріоконсервованій культурах НН за допомогою імуноцитохімічного методу нами було проведено якісний аналіз клітин, що експресують ХрА. Було встановлено, що відносна кількість ХрА-позитивних клітин в моношарі обох культур знижувався починаючи з 7-ої доби культивування (рис. 5.2). Зауважимо, що клітини, які знаходяться в складі МС, які не підраховувалися, оскільки

коректна оцінка даного показника неможлива. Через 7 діб культивування відносна кількість ХрА-позитивних клітин зменшувалася в контрольній культурі - в 1,8 рази, а в кріоконсервованій - в 1,6 раз. Через 15 діб відносна кількість даних клітин зменшувалася в контрольній культурі до $(1,5 \pm 0,7)\%$, а в кріоконсервованій до $(0,9 \pm 0,8)\%$.

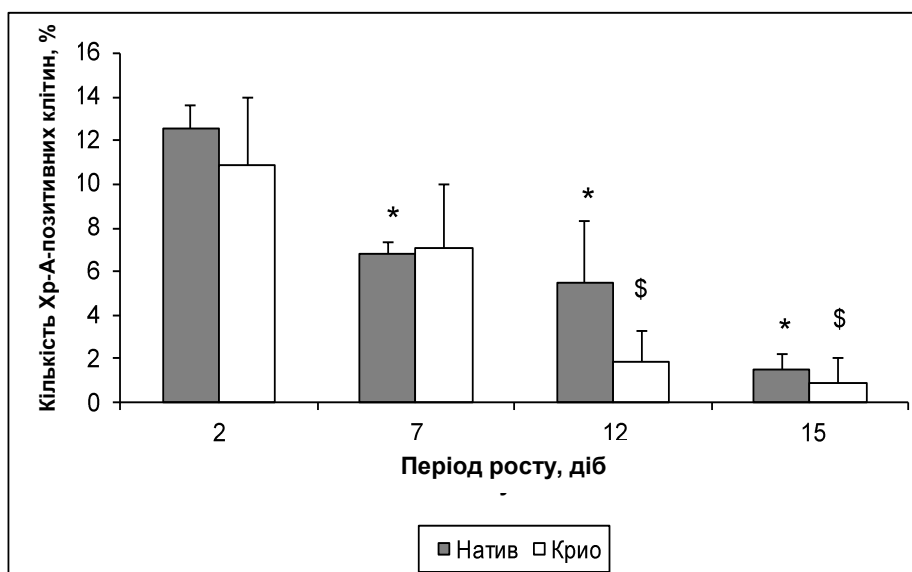


Рис.5. 2 Відносна кількість ХрА-позитивних клітин в моношарі. Візуалізація за допомогою імуноцитохімічного методу з використанням антитіл до ХрА. *, \$ □ відмінності статистично значущі в порівнянні з другою добою культивування відповідної культури, $p < 0,05$

Нами було виявлено невідповідність між результатами цитофлуориметричного та імуноцитохімічного аналізів, оскільки в останньому випадку ми спостерігали більш значне зменшення кількості ХрА-позитивних клітин. Однак візуальна оцінка експресії ХрА в культурі клітин НН неонатальних поросят дозволила пояснити дане протиріччя. На 2-у добу в культурі спостерігалось формування моношару клітин з рівномірним розподілом ХрА-позитивних клітин (рис. 5.3, а). Світіння клітин було не інтенсивним, клітини розсіяні в моно шарі. Після 7-ми діб культивування характер клітинного розподілу змінився: ХрА-мічені клітини були переважно

зосереджені в МС та прикріпленій клітинах, що оточували МС, хоча поодинокі мічені клітини ще зрідка зустрічалися в моношарі. На 15-у добу спостерігалось збільшення розмірів МС, що складаються в основному з ХрА-позитивних клітин (рис. 5.3, б). У моношарі дані клітини практично були відсутні (рис. 5.3, в). З огляду на характер розподілу, ми можемо припустити, що перерозподіл клітин відбувався за рахунок міграції ХрА-позитивних клітин в МС.

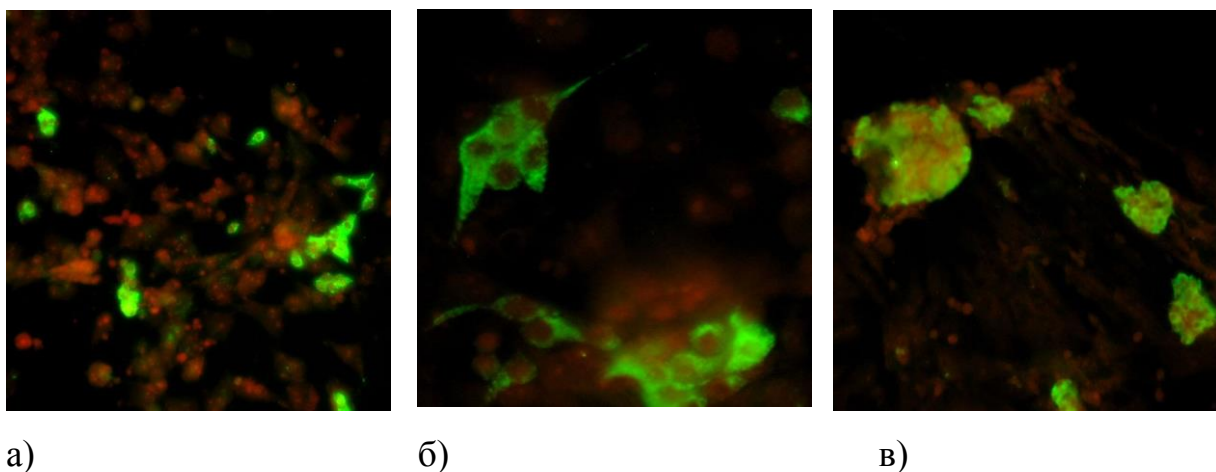


Рис.5.3. Імуноцітохімічне забарвлення антитілами до ХрА (зелена флуоресценція) в культурі клітин НН неонатальних свиней на 2-гу (а) і 15-ту (б, в) добу культивування. а) - ХрА-позитивні клітини рівномірно розподілені в моношарі; б) - експресія ХрА переважно в МС; в) - відсутність експресії ХрА в клітинах моношару. Ядра клітин контрастувати пропідій йодидом (червона флуоресценція). Збільшення: а, в – X400, б – X800

А попередніх працях було встановлено, що кріоконсервування первинної культури клітин надниркових залоз новонароджених поросят в середовищах, що містять 10% ДМСО з додаванням 10% ФТС, зі швидкістю охолодження 1 град/ хв дозволяє зберегти до 80% життєздатних клітин [195]. Обраний нами спосіб передбачає кріоконсервування фрагментів тканини наднирників в середовищі з 10% ДМСО з використанням низьких швидкостей охолодження 0,31 град/ хв. При цьому, первинна культура, отримана з кріоконсервованих фрагментів, характеризувалась аналогічними

морфофункціональними властивостями. Життєздатність клітин, їх здатність до адгезії, морфологічні особливості, експресія β -III-тубуліну, при даному способі кріоконсервування в інтактній і кріоконсервованій культурах значуще не відрізнялися. Встановлено, що суспензія клітин, отримана з інтактних фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят, містила близько 30% клітин, що експресують ХрА, кріоконсервування істотно не впливало на цей показник.

Кількісне співвідношення ХрА-позитивних клітин у флотуючій і прикріпленій субпопуляціях первинної культури клітин наднирників неонатальних поросят зберігалось після заморожування-відігрівання. У контрольній і кріоконсервованій культурах після 7 діб значуще знижувалася кількість клітин, що експресують ХрА – можливо, за рахунок переважного поділу інших типів клітин, що проліферують швидше.

Оскільки хромафінні клітини мозкової речовини надниркових залоз являють собою нейроендокринні КПНГ. Разом з симпатичними нейронами спинних гангліїв, а також дрібними інтенсивно флуоресціюючими клітинами вони складають симпатoadреналову лінію похідних НГ [196, 197], їх збереження при кріоконсервуванні має велике практичне значення, це може дозволити отримувати культури з функціональними секреторними клітинами. Раніше було виявлено властивість клітин мозкової речовини надниркових залоз різних видів ссавців і людини до утворення МС в культурі [198-200]. При цьому важливо відзначити, що кількість, розмір, здатність до формування колоній, фенотипічний склад МС залежать від умов їх отримання (вид культуральної поверхні, присутності ФТС в середовищі, наявності і комбінації ростових факторів).

У даній роботі встановлено, що клітини, які експресують ХрА, беруть участь у формуванні МС в умовах культивування клітин наднирників неонатальних поросят в середовищі з ФТС на адгезивній ростовій поверхні. При цьому, в процесі культивування виявлено зміну розподілу ХрА-

позитивних клітин: зниження їх відносної кількості в складі моношару і підвищення в МС. Механізм утворення МС в культурі клітин надниркових залоз вимагає окремого дослідження, однак можна припустити, що клітини, які експресують ХрА, грають в цьому процесі важливу роль.

За матеріалами розділу 5 опубліковані роботи [21, 22, 27].

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Продемонстрована можливість отримання культур НН поросят і кроликів, що містять флотуючі цитосфери в неадгезивних безсироваткових умовах. На перших етапах росту, культури клітин, отримані з НН залоз поросят і кроликів, мали подібні особливості. При культивуванні на адгезивній поверхні до субстрату прикріплялися фібробластоподібні клітини, що формували моношар через 5-7 діб. При культивуванні в умовах зі зниженою адгезією в культурах НН поросят і кроликів клітинний моношар не утворювався, а відбувалося формування флотуючих МС, які поступово збільшувалися в розмірах. До 7-9 діб розміри МС в культурах досягали 100 – 150 мкм (рис.3.1 – б), а протягом наступних 14 діб спостереження продовжували збільшуватися до 200-250 мкм. МС формувалися на безсироватковому середовищі з факторами росту (1% B27, 10нг / мл FGF).

В нашій роботі в культурі клітин мишей, за протоколами, описаними у відповідному розділі, незалежно від наявності ФТС у середовищі, не спостерігалось формування клітинного моношару (рис. 3.1 – г). Культура містила округлі прикріплені і флотуючі клітини, а також їх агрегати з невеликою кількістю клітин в складі і неоформленою структурою.

Для отримання культур клітин з ДП були використані фрагменти волосяних фолікулів, отримані з вібрис неонатальних мишей та кроликів. У поросят відсутній даний чутливий орган, тому ДП поросят культури не вивчалися. Культури, отримані з обох джерел, мали схожу морфологію – з ДП виселялися дрібні веретеноподібні клітини, що мігрували єдиним потоком і згодом формували моношар. При культивуванні в безсироваткових ростових середовищах - середовищі (DMEM / F12), що містить B27, EGF, FGF, відбувався ріст МС. МС формуються починаючи з перших годин після перенесення в безсироваткові умови за рахунок агрегації невеликого числа клітин (в першу добу виявляються конгломерати, що містять 10-20 клітин), які поділяються та сприяють росту МС.

Встановлено, що вид одержуваної культури залежить тільки від факторів росту, що використовуються, але не від характеру ростової поверхні - на адгезивній поверхні в безсироватковому середовищі формуються МС, а на нізкоадгезивній, при наявності сироватки прикріплюються і розпластуються клітини, що формують адгезивний моношар. В неадгезивних умовах та в безсироватковому середовищі, частина клітин залишається у флотую чому стані, що зумовлене відсутністю механічного контакту між клітинами, проте більшість формує МС.

Ефективність сфероїдоутворення була вищою у НН поросят та ДП кроликів. Серед всіх культур, найбільше сфероїдів формувалося у клітинах ДП папіл кроликів, що разом з відносно більшими розмірами ВФ, робить їх більш зручним об'єктом для вивчення, оскільки забезпечує необхідну кількість матеріалу для порівняння.

Шляхом культивування культури ДП кролика в середовищах різного складу, ми встановили, що існує залежність між формуванням 2D та 3D-культур в залежності від наявності ФТС в середовищі. У всіх безсироваткових середовищах культура ДП була представлена МС, які формувалися за рахунок агрегації флотуючих клітин і активно збільшувалися в розмірах до 18-10 діб культивування. Така здатність формувати МС може слугувати підтвердженням наявності прогеніторних клітин в даних культурах. Наявність ФТС в ростовому середовищі – достатній фактор, що стимулює формування моношару. Тоді як достатня умова формування МС є виключення факторів, що входять в склад ФТС і додавання нутрієнтів, що підтримують ріст клітин. При перенесенні флотуючих МС культур НН з неадгезивних в адгезивні умови, відбувалося їх прикріплення до субстрату і виселення клітин, що мають нейробластоподібну морфологію та розташовані ланцюжками.

Надалі при заміні середовища на безсироваткове, можна знову отримувати МС. Зміна типу росту свідчить про вкрай високу пластичність

культури і чутливості до чинників у складі ФТС, тоді як за замовчуванням формуються МС. Всі вивчені середовища використовувалися для культивування нативної і кріоконсервованої культур, при цьому не було виявлено будь-яких відмінностей в характері їх росту.

Ефективність міграції клітини з сфероїда, залежало від тривалості культивування у вигляді МС. МС, що культивувалися 5 -7 діб, при дезагрегації легко дисоціюють на окремі клітини, отже некротичного ядра в них ще не формується. Якщо сфероїд культивувався більше 12 діб, він ставав дуже щільним, і при перенесенні в адгезивні умови, на субстрат мігрували лише деякі клітини. Ймовірно, в ньому відбуваються процеси розшарування на функціональні шари.

Таким чином, тип культури залежить від складу ростового середовища, перенесення в умови з іншою ростовою добавкою призводить до зміни 2D-культури на 3D-культуру, і навпаки. Таке чергування способу культивування ми здійснювали впродовж 8 пасажів.

Фенотипічний аналіз клітин ДП кролика був проведений на 2 пасажі після виділення. Було здійснено забарвлення досліджених культур на антитіла цитоскелету - тубулін і виментин. β III-тубулін є основним білком нейрофіламент, його експресія показана для багатьох клітин-похідних нейроектодерми. Нами була детально вивчена експресія даного маркера на різних етапах культивування ДП: до і після кріоконсервування, індукції і формування сфероїдів. Було виявлено, що клітини ДП несуть в собі β III-тубулін, філаменти, що мають специфічне світіння, сконцентровані, головним чином, в перинуклеарній області. Це може бути пов'язано з походженням даного типу клітин з нейроектодерми. Експресія β III-тубуліну підтримується на досить високому рівні також в кріоконсервованій культурі.

Було відзначено позитивне забарвлення на виментин культурі ДП, проте вміст його був вище в клітинах, що входять до складу МС, в порівнянні з моношаром. Це може бути пов'язано з участю виментину в

агрегації клітин і підтримці міжклітинних зв'язків. Більше віментину було сконцентровано в клітинах, що утворювали МС. Оскільки віментин є загальним маркером клітин, що здійснюють епітеліо-мезенхімальну трансформацію. Ймовірно, формування 3Д культур пов'язане з посиленням синтезу філамент цитоскелету. Виявлено експресію глутамат-синтази свідчить про протікання глутаматного циклу в даних клітинах в нормі. Глутамат-синтаза – це цитоплазматичний фермент, висока активність якого характерна для клітин гліального ряду. Відомо також, що в клітинах папілярного шару дерми дійсно підтримується високий рівень експресії даного ферменту, що, ймовірно, пов'язане з онтогенетичним походженням.

Негативним виявилось забарвлення на маркер астрогліальних клітин - білок S100, а також маркер меланоцитарної лінії C-kit (CD117). В досліджених культурах були відсутні маркери, які вказували б на комітований статус даних клітин. Білок S100 - структурний білок астрогліальних клітин, що експресується при їх тканинній спеціалізації із загального нейрогліального попередника. C -kit (CD117) - рецептор, що дозволяє диференціювати інші популяції клітин волосяного фолікула, що мають мезенхімальне походження, від ектодермальних похідних - плюрипотентних клітин ДП.

З метою вивчення потенціалу до індукції в остеогенному напрямку, культура ДП, здійснювалося тривале культивування в індукційному середовищі, на 21 добу виявлялися великі позаклітинні включення кальцію, що забарвлювалися в червоний колір алізариним червоним. Індукція в нейрональному напрямку здійснювалася шляхом тривалого культивування в індукційному середовищі. Була досліджена динаміка накопичення β III-тубуліну на 7 і 21 добу індукції. Рівень специфічного світіння на 7 добу культивування не відрізнявся від такого в неіндукованій культурі - як в нативній, так і в кріоконсервованій. На 21 добу спостерігалось значне посилення світіння, філаменти при цьому займали всю площу клітини, а не

тільки перинуклеарний простір, як в неіндукованій культурі. 21 добу прийнято вважати терміном, достатнім для термінальної індукції прогеніторних клітин *in vitro*,

Таким чином, клітини з ДП є пулом клітин, здатних до спрямованої спеціалізації. В процесі кріоконсервування даний пул клітин зберігається і має властивості аналогічні нативній культурі.

На першому етапі дослідження впливу процесу кріоконсервування на культури ДП, було вивчено вплив кріозахисних середовищ на життєздатність за адгезивні властивості клітин ДП кролика. Життєздатність клітин у всіх варіантах дослідження була досить високою, що свідчить про відсутність гострого токсичного впливу на клітини. При цьому кількість пошкоджених клітин збільшувалась пропорційно до концентрації ДМСО. Значного впливу на адгезивні властивості клітин також не виявлено.

Для виявлення внеску інкубації з ДМСО на морфологію досліджених культур, було здійснено аналіз морфології клітин в моношарі. Клітини з нормальною морфологією являли собою видовжені фібробластоподібні клітини з одним дрібним ядром в центрі клітини. Клітини були гомогенної морфології, з характерним ростом у вигляді колоній, що зливалися, формуючи конфлюентний моношар. Цитоплазма рівномірно забарвлена, прозора. Аналізуючи морфологію клітин в моношарі, окремо враховували клітини з патологічною морфологією. Інтактна культура містила невеликий відсоток патологій, здебільшого поліплоїдні клітини та клітини з двома ядрами. У всіх варіантах використаних середовищ, при збільшенні концентрації ДМСО до 7 %, не відбувалося значного збільшення рівня патологій порівняно з контролем. У клітинах, які пройшли експозицію з високими концентраціями ДМСО (10 - 15%), незалежно від додавання білкових компонентів, відбувалася масова і значна вакуолізація цитоплазми. Найбільшу частину патологій становили поліплоїдні клітини (з розмірами, що перевищують нормальний в 4-10 разів), клітин з мікроядрами і з декількома ядрами. На другому пасажі відбувався

значний сплеск патологій порівняно з першим, отже порушення мали кумулятивний характер, після впливу 12,5 і 15% концентрацій ДМСО, культури на 2 пасажі зупиняли поділ та деградували.

Додавання білково-пептидних добавок: 5% Албутрісан і БСА модулювати вплив ДМСО. Найбільш значущим ефектом добавок було збереження життєздатності культури після впливу високих – 12,5 і 15% концентрацій кріопротектора. У той же час, дані культури містили значний пул клітин з патологіями. Патологіями, що зустрічалися найчастіше, були клітини з мікровезикулами мембрани, поліплоїди, багатоядерні клітини і клітини з мікроядрами. При порівнянні між собою груп, яким разом з ДМСО вносилися Албутрісан і БСА, значущих відмінностей не виявлено – в обох групах число патологій різко зростає при внесенні 12,5% і 15% ДМСО. Однак існувала тенденція до зниження числа патологій в групі з додаванням Албутрісану в порівнянні з БСА при концентраціях ДМСО 5-10%.

Цитоморфологічний аналіз показав, що в інтактній культурі клітин ДП присутня незначна частина клітин з патологією мітозу. На 1-му пасажі даний показник становив $4,45 \pm 0,49\%$, а на другому $7,14 \pm 0,79$. При цьому хромосомні мости і відставання хромосом в анафазі були найбільш поширеними аномаліями мітозу. На 1-му пасажі кількість патологій мітозу в культурах, оброблених ДМСО в концентраціях від 5 до 10%, мало тенденцію до збільшення в порівнянні з контролем. При інкубації з ДМСО в концентраціях 12,5 та 15% рівень патологій мітозу значущо ($p < 0,05$) зростав до $15,0 \pm 1,2$ і $14,3 \pm 1,2\%$, відповідно. Серед патологічних форм переважав К-мітоз. На 2-му пасажі в культурах, оброблених ДМСО в концентрації 10% і вище, відбувалося істотне збільшення числа патологій як в порівнянні з контролем, так і з 1-м пасажем (рис. 2). Інкубація з більш високими концентраціями (12,5 і 15%) призводила до зупинки поділу і деградації клітин.

В той же час, при додаванні Албутрісан спостерігалася виражена тенденція до зменшення числа патологій на другому пасажі, порівняно з першим, що може свідчити про певний антимутагенний ефект, що дозволяє уникнути накопичення патологій. Можливо, механізмом, що знижує кількість патологій на 2-му пасажі, є загибель клітин з летальними порушення.

Після проведення дослідження по впливу кріозахисних середовищ, було проведене кріоконсервування суспензії клітин ДП з усіма дослідженими середовищами. Заморожування відбувалося за методикою охолодження 1 град/хв до -80°C з подальшим зануренням в рідкий азот. Зберігалися клітини до моменту деконсервування протягом 1,5 місяців. Після швидкого відігріву при 37°C , була підрахована цілісність при фарбуванні трипановим синім. У всіх середовищах цілісність клітин після відігрівання була досить високою понад 80%.

Виявилося, що рівень патологій в культурі після відігрівання і 3 діб культивування зростав пропорційно до концентрації ДМСО. Значуще зростання рівня патологій в порівнянні з контролем відбувалося при використанні концентрацій ДМСО 12,5 і 15%. Серед патологій мітозу зустрічалися порушення веретена поділу: багатополюсний, асиметричний, багатоцентричний мітоз, тригрупові метафаза, порожниста метафаза, К-мітоз, хромосомні мости і відставання хромосом в анафазе. Серед патологій клітин в інтерфазі зустрічалися мікроядра, клітини з декількома ядрами, поліплоїди. Найбільшу частку патологій інтерфази становили при впливі високих концентрацій ДМСО (12,5 і 15%), що свідчить про їх токсичності.

Додавання білкових добавок (Албутрісан і БСА) не чинило значимого впливу на рівень патологій при використанні низьких концентрацій ДМСО – 5 та 7,5% (рис. 4.11; 4.12). Проте на тлі дії високих концентрацій – 10% і більше, значуще знижувався загальний рівень патологій в культурі на 10%.

При додаванні 5% Албутрісану в поєднанні з 15% ДМСО, на 2-му пасажі не відбувалося поділу клітин, і культура деградувала.

Базуючись на літературних даних, для кріоконсервування МС ДП використовували концентрації ДМСО 5% та 10% з додаванням 10% ФТС, на основі даних щодо кріоконсервування МС НН (Плаксина та ін, 2017). Середній розмір сфероїдів, виміряний на 14 добу після пересіву, становив $235,00 \pm 17,78$, спостереження свідчать, що після цього терміну сфероїди більше не збільшувалися в розмірах і починали деградувати. Середній розмір сфероїдів, виміряний на 14 добу після кріоконсервування, становив $128,25 \pm 16,5$ ($p = 0,05$). Таким чином, спостерігається значуще зменшення розмірів МС, які формуються з кріоконсервованої культури. Проте ріст сфероїдів продовжувався довше, досягаючи розмірів нативної культури. Встановлено, що КП в моношарі склав 5,44, тоді як в сфероїдах – 4,27. Ймовірно, існує тенденція до зниження показників проліферації в складі МС, що може бути пов'язано з відтермінуванням початку мітозу і подовженням клітинного циклу.

Нами здійснювалося дослідження ХрА-експресуючих клітин в культурах, отриманих з нативних та кріоконсервованих НН. Показана наявність флотуючої та адгезивної субпопуляцій, та встановлено наявність деяких імунохімічних особливостей у них. Культури, отримані нами, мали подібну структуру, яка зберігалася і після кріоконсервування.

Було встановлено, що відносна кількість ХрА-позитивних клітин в моношарі обох культур знижувався з 7-х діб. Через 7 діб культивування відносна кількість ХрА-позитивних клітин зменшувалася в контрольній культурі - в 1,8 рази, а в кріоконсервованій - в 1,6 раз. Через 15 діб відносна кількість даних клітин зменшувалася в контрольній культурі до $1,5 \pm 0,7$ %, а в кріоконсервованій - до $0,9 \pm 0,8$ %. Кількісне співвідношення ХрА-позитивних клітин у флотуючій і прикріпленій субпопуляціях первинної культури клітин наднирників неонатальних поросят зберігалася після заморожування-

відігрівання. У контрольній і кріоконсервованій культурах після 7 діб значуще знижувалася кількість клітин, що експресують ХрА – можливо, за рахунок переважного поділу інших типів клітин, що проліферують швидше.

ВИСНОВКИ

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 умов культивування, при цьому присутність ФТС є чинником формування моношару. 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, мезенхімального маркеру віментину. 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 ± 3 % (в порівнянні з інтактним контролем) та аномальною морфологією на 30 ± 5 % (в порівнянні з контролем), що виражається у виникненні вакуолізації цитоплазми та везикуляції плазматичної мембрани, різноманітних порушеннях веретена поділу та злипанні хромосом. 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 до 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 при кріоконсервуванні клітин першого пасажу, але збільшує кількість клітин з патологічним перебігом мітозу при кріоконсервуванні клітин другого пасажу.

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 конfluентності 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*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bronner ME. Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. *Histochem Cell Biol.* 2012; 138(2):179186. DOI:10.1007/s00418-012-0999-z.
2. 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.
3. Сосунов АА. Нервный гребень и его нейральные производные. *Соросовский образовательный журнал: Биология.* 1999; 5: 14–21
4. Sommer L. Growth factors regulating neural crest cell fate decisions. *Adv Exp Med Biol.* 2006;589:197–205.
5. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, 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.
6. Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E. The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle.* 2008; 7(8):1013–9. DOI: 10.4161/cc.7.8.5641.
7. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y et al.. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci.* 2007;27:9545–9559.
8. McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci.* 2006;26:6651–6660.
9. Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(2):270-279. DOI:10.1002/ajmg.a.33702.
10. Gallik KL, Treffy RW, Nacke LM, et al. Neural crest and cancer: Divergent travelers on similar paths. *Mech Dev.* 2017;148:89-99. DOI:10.1016/j.mod.2017.08.002.

11. Corallo D, Donadon M, Pantile M et al. LIN28B increases neural crest cell migration and leads to transformation of trunk sympathoadrenal precursors. *Cell Death Differ.* 2020, 27;1225–1242. DOI: 10.1038/s41418-019-0425-3.
12. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol.* 2012, 12; 1347–1360
13. Lei Y, Schaffer DV. 2013A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, E5039–E5048.
14. Ehrhart F, Schulz JC, Katsen-Globa A, Shirley SG, Reuter D, Bach F, et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology.* 2009 Apr;58(2):119–27. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.11.005.
15. Bronner ME, LeDouarin NM. Development and evolution of the neural crest: an overview. *Dev Biol.* 2012; 366(1): 2–9. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.12.042.
16. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, 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 Apr 10;2(4):392–403. DOI: 10.1016/j.stem.2008.03.005.
17. Huber K, Kalcheim C, Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci.* 2009; 151: 10-16.
18. Sidorenko O, Bozhok G, Legach E, Gurina T Study of possibility to obtain and cryopreserve adrenal cell primary culture of newborn piglets. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 21 (1), 58-67.
19. Santana MM, Chung KF, Vukicevic V, et al. Isolation, characterization, and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1 (11): 783-791. DOI: 10.5966 / sctm.2012-0022.
20. 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.

21. Новикова ОЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Морфологические особенности первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных разных видов. Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Серия «Биология». 2019; (33): 49–59. DOI: 10.26565/2075-5457-2019-33-9.
22. Новикова ОЮ, Сидоренко ОС, Божок ГА, Бондаренко ТП. Влияние криоконсервирования на экспрессию хромогранина А в культуре клеток надпочечников неонатальных свиней. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29(4):344–353. doi.org/10.15407/cryo29.04.344. (Scopus)
23. Новикова ОЮ, Бондаренко ТП. Характеристики нативной и криоконсервированной культур клеток дермальной папиллы вибрисс новорожденных кроликов. Вісник проблем біології та медицини. 2019 - 3 (152). С. 54-57 .
24. Новикова ОЮ, Бондаренко ТП. Цитоморфологические нарушения в культуре клеток дермальной папиллы кролика после инкубации с диметилсульфоксидом. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019;4 (6).
25. Novikova Oksana, Bozhok Galyna, Bondarenko Tatyana. Effect of Incubation with Dimethyl Sulfoxide on the Mitotic Cycle of Cell Culture of Rabbit Dermal Papilla. Recent Advances in Biology and Medicine. 1 Vol. 5, Iss./Yr. 2019, Pgs. 6. doi.org/10.18639/RABM.2019.882649.
26. Novikova O. Effect of Low-Molecular Fraction of Fish Peptide Albutrisan-Nr on In Vitro Neurogenesis Recent Advances in Biology and Medicine Recent Adv Biol Med. 2020; Vol. 6, Article ID 1101035, 4 p. <https://doi.org/10.18639/RABM.2020.1101035>
27. Новикова ОЮ, Плаксина ЕМ, Божок ГА, Лаврик АА, Бондаренко ТП Сравнительная морфологическая характеристика первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных. Холод в біології та медицині, 2016:

- мат. 40-ї щорічн. міжнар. конф. Молодих учених. м. Харків, 23–24 черв. 2016 р. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26 (2): 178;
28. Новикова ОЮ, Сидоренко ОС, Божок ГА, Бондаренко ТП. Изучение экспрессии Хромогранина А в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят. Холод в біології та медицині – 2018: мат. 42-ї щорічн. міжнар. конф. молодих учених. м. Харків, 23–24 трав. 2018 р. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 179.
29. Новикова ОЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Культивування клітин дермальної папіли кролика *in vitro* в середовищах різного складу. З'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. Київ, 2018.
30. Новикова ОЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Життєздатність та ростовий потенціал кріоконсервованої культури клітин дермальної папілом кролика; 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним Представництвом. м. Яремча, 2019.
31. Новикова ОЮ. Cultivation of newborn rabbit vibrissa dermal papilla cells *in vitro* XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. 2019 р. Київ.
32. Новикова ОЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Кріоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из дермальной папиллы кролика. Холод в біології та медицині, 2019: міжнар. конф. молодих учених, м. Харків, 27–29 трав. 2019. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019. 29(2): 177.
33. Новикова ОЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Cultivation of rabies virus in rabbit vibrissa dermal papilla cell culture. IX Міжнародний симпозіум Біоресурси та віруси. Київ, 2019.
34. Новикова ОЮ. Патологии деления в культуре дермальной папиллы кролика после кріоконсервирования. Научный форум: Медицина, биология и химия: сб. ст. по мат. XXVIII міжнар. наук.-практ. Конф.; 10(28). М. МЦНО, 2019.

35. Новикова ОЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП. 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. 2020: сб. тез. АНО Иннов. центр Кольцово. Новосибирск. ИПЦ НГУ. 2020; 642 с.
36. Bronner ME. Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(2):179-186. DOI:10.1007/s00418-012-0999-z.
37. 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.
38. Incremental evolution of the neural crest, neural crest cells and neural crest-derived skeletal tissues Brian K Hall, J Andrew Gillis *J Anat.* 2013 Jan; 222 (1): 19-31. Published online 2012 Mar 14. DOI: 10.1111 / j.1469-7580.2012.01495. PMCID: PMC3552412.
39. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res.* 012; 22 (2): 288-304. DOI: 10.1038 / cr.2012.11.
40. Noden DM, Schneider RA. (2006) Neural Crest Cells and the Community of Plan for Craniofacial Development. In: Saint-Jeannet JP. (eds) Neural Crest Induction and Differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 589. Springer, Boston, MA. P. 24-55. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_1.
41. Basch ML, Bronner-Fraser M. (2006) Neural Crest Inducing Signals. In: Saint-Jeannet JP. (eds) Neural Crest Induction and Differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 589. Springer, Boston, MA. P. 2-23. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_2.
42. Сосунов АА. Нервный гребень и его нейральные производные. *Соросовский образовательный журнал.* 1999; 5: 14-21.

43. Le Douarin NM, Kalcheim C. The Neural Crest. Cambridge UK: Cambridge University Press; 1999
44. 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. *Dev Biol.* 1980; 80: 96–106
45. Kaczmarczyk D, Kmiec BL, Daczewska M, Kmiec KB. Proliferation and apoptosis in the guinea pig adrenal cortex during postnatal development. *Folia Morphol (Warsz).* 2004 Aug;63(3): 333–5.
46. Seron-Ferre M, Jaffe RB. The Fetal Adrenal Gland. *Annual Review of Physiology.* 1981;43:141–62. DOI: 10.1146/annurev.ph.43.030181.001041
47. Плаксина ЕМ. Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии / Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, Божок ГА. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2016; 26 (2): 188–195.
48. Quenten Schwarz and Sophie, editors. *Wisznjak Neural Crest Cells Methods and. LLC, part of Springer Nature SA, Australia; 2019. Chapter 1 The Neural Crest: A Remarkable Model System for Studying Development and Disease.*
49. Плаксина ЕМ. Морфологические и фенотипические особенности цитосфер, формирующихся в культуре клеток надпочечников неонатальных поросят, в обычных и низкоадгезивных условиях / Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Божок ГА. *Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2015; 25 (2): 190 – 196.
50. Сидоренко ОС. Экспрессия β -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят / Сидоренко ОС, Божок Г А, Легач ЕИ. *Проблемы криобиологии.* 2011; 21 (2): 218–223.
51. Plaksina EM. Obtaining a culture of neuroblast-like cells from adrenal glands of newborn piglets by the method of selective adhesion / Plaksina EM, S.

- Sidorenko OE, Legach EI, Bozhok GA. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2016; 26 (2): 188–195.
52. Study of migration of neural crest cells to adrenal medulla by three-dimensional reconstruction. Yamamoto M, Yanai R, Arishima K. *J Vet Med Sci*. 2004 Jun; 66 (6): 635–41
53. Huber K, Kalcheim C, Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci*. 2009 poky; 151: 10–16
54. Sicard F, Ehrhart-Bornstein M, Corbeil D, Sperber S, Krug AW, Ziegler CG, et al. Age-dependent regulation of chromaffin cell proliferation by growth factors, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(6):2007–12. DOI: 10.1073/pnas.0610898104.
55. Verhofstad AA. Kinetics of adrenal medullary cells. *J Anat*. 1993 Oct;183(Pt 2):315–26.
56. Anderson DJ, Carnahan JF, Michelsohn A, Patterson PH. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage. *J. Neurosci*. 1991 Nov;11(11):3507–19. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.11-11-03507.1991.
57. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol*. 2006 Oct 15; 298(2): 335–43. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.07.010.
58. Langley K, Grant NJ. Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res*. 1999 Nov;298(2):185–206. DOI: 10.1007/PL00008810
59. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, Ambrosio MR, Bondanelli M, Colao A, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Jan; 25(1): R11-R29.

60. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, Hermann A, Storch A, Huttner WB, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells*. 2009; 27(10): 2602–2613.
61. Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R et al. Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells, Bernard. *Endocrinology*. 2012 Sep;153(9): 444-56.
62. Livett BG, Borges R. Advances in cell culture for chromaffin cells and related cell types. In: Borges R, Gandia L, editors. *Cell Biology of the Chromaffin Cell 2004 Workshop*. Laguna, Spain; 2004: Додати 261-267.
63. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina E.M. et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. *Cryobiology*. 2016 року; 73 (2): 152-161.
64. Plaksina EM, Sidorenko OS, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids obtained from adrenal glands of newborn piglets. *Problems of cryobiology and cryomedicine*. 2017; 27 (4): 322-33
65. Till H, Stachel D, Muller-Hocker J, Kellnar St, Joppich I. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats. *Eur J Pediatr Surg*. 1998 Aug;8(4):240–3. DOI: 10.1055/s-2008-1071162
66. Vincenzo Silani, Antonio Pizzuti, Ornella Strada, Andrea Falini, Gianni Pezzoli and Guglielmo Scarlato Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells *Brain Research*, 454 (1988) 383-386 Elsevier
67. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach EI, Gurina TM Study of possibility to obtain and cryopreserve adrenal cell primary culture of newborn piglets *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 21 (1), 58-67
68. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. *Cryobiology*. 2016 року; 73 (2): 152-161. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2016.08.006

69. Lindvall O, Backlund EO, Farde L, et al: Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann Neurol* 22: 457-468, 1987
70. Alabedalkarim NM, Bozhok GA, Legach EI, et al. Outcome of adrenal tissue fragments allotransplantation: the impact of cryopreservation. *Cryobiology*. 2012; 65 (3): 188-195. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2012.05.013.
71. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 778-784
72. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells published correction appears in *Nat Cell Biol.* 2005 May; 7 (5): 531. *Nat Cell Biol.* 2004; 6 (11): 1082-1093. DOI: 10.1038 / ncb1181
73. Driskell RR, Clavel C, Rendl M, Watt FM. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *J Cell Sci.* 2011 Apr 15;124(Pt 8):1179-82. DOI: 10.1242/jcs.082446. PMID: 21444748; PMCID: PMC3115771.
74. Ryan R. Driskell, Carlos Clavel, Fiona M. Watt *J Cell Sci.* 2011 Apr 15; 124 (8): 1179-1182. doi: 10.1242 / jcs.082446
75. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2714–22. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0156.
76. Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E. The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle.* 2008 Apr 15;7(8):1013–9. DOI: 10.4161/cc.7.8.5641
77. Millar, Sarah Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *Journal of Investigative Dermatology.* vol 118, pg 216, 2002. 1214-1214
78. Veraitch O, Mabuchi, Y, Matsuzaki Y, et al. Induction of hair follicle dermal papilla cell properties in human induced pluripotent stem cell-derived

multipotent LNGFR(+)THY-1(+) mesenchymal cells. *Sci Rep* 7, 42777 (2017). <https://DOI.org/10.1038/srep42777>;

79. Messenger AG & Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *Br J Dermatol* 150, 186–194 (2004).

80. Kishimoto J, Ehama R, Ideta R, Arai T, Yano K, Soma T, Inventors; Shiseido Co Ltd, Current Assignee. Preparation method of a hair dermal papilla cell preparation, composition and method for regenerating hair follicles, and animal having regenerated hair follicles United States Patent 7718426.

81. Kajiura S, Mii S, Aki R, et al. Cryopreservation of the Hair Follicle Maintains Pluripotency of Nestin-Expressing Hair Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21 (8): 825-831. DOI: 10.1089 / ten.TEC.2014.0500

82. Hasan W. Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. *Organogenesis*. 2013; 9(3):176–93. DOI: 10.4161/org.24892.

83. Kajiura S, Mii S, Aki R, et al. Cryopreservation of the Hair Follicle Maintains Pluripotency of Nestin-Expressing Hair Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21 (8): 825-831. DOI: 10.1089 / ten.TEC.2014.0500

84. Cao W, Li L, Tran B, Kajiura S, Amoh Y, Liu F, et al. (2015) Extensive Hair Shaft Growth after Mouse Whisker Follicle Isolation, Cryopreservation and Transplantation in Nude Mice. *PLoS ONE* 10 (12): e0145997. <https://DOI.org/10.1371/journal.pone.0145997>

85. 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. DOI: 10.1016/j.stem.2011.04.007

86. Abe S, Yamaguchi S, Sato Y, Harada K. Sphere-derived multipotent progenitor cells obtained from human oral mucosa are enriched in neural crest cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016 Jan;5(1):117–28. DOI: 10.5966/sctm.2015-0111

87. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One*. 2015 Feb 20; 10(2): e0117503. DOI: 10.1371/journal.pone.0117503
88. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One*. 2015 Feb 20;10(2):e0117503. DOI: 10.1371/journal.pone.0117503,
89. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen*. 2006 Dec; 11(8):922–32. DOI: 10.1177/1087057106292763.
90. Сукач АН, Ляшенко ТД. Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования. *Проблемы криобиологии*. 2011;21(4):395–405
91. Антоневиц НГ, Квачева ЗБ, Чекан ВЛ, Сидоренко ИВ, Лобанок ЕС. Стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки человека: условия выделения и накопления в культуре, морфофункциональная и фенотипическая характеристика. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 2012; 28: 27–36.
92. Kinney MA, Hookway TA, Wang Y, McDevitt TC. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann Biomed Eng*. 2014; 42(2):352–67. DOI: 10.1007/s10439-013-0953-9.
93. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat*. 2015 Dec; 227(6):746–56. DOI: 10.1111/joa.12257.
94. Morimoto Y, Hsiao AY, Takeuchi S. Point-, line-, and plane-shaped cellular constructs for 3D tissue assembly. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;95: 29–39. DOI: 10.1016/j.addr.2015.09.003.

95. 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 Nov 10; 9(11):e112781. DOI: 10.1371/journal.pone.0112781.
96. Li H, Dai Y, Shu J, Yu R, Guo Y, Chen J. Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *Tissue Cell*. 2015; 47(1): 39–48. DOI: 10.1016/j.tice.2014.10.008.
97. Мартынова МГ, Крылова ТА, Быстрова ОА. Изменение ультраструктуры стволовых клеток в цикле монослой-сферы-монослой. *Цитология*. 2016; 58(1):16–22.
98. Kinney MA, Hookway TA, Wang Y, McDevitt TC. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann Biomed Eng*. 2014; 42(2):352–67. DOI: 10.1007/s10439-013-0953-9.
99. Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*. 2012 Feb;33(6):1748–58. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.049.
100. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol*. 2010 Jul 1;148:3–15. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
101. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol*. 2005 Sep 26;170(7):1135–46. DOI: 10.1083/jcb.200504061.
102. Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, Argikar UA, Remmel RP, Rinaldo P. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transpl*. 2005 Aug;11 (8):901–10. DOI: 10.1002/lt.20446.

103. Fukuda J, Nakazawa K. Orderly arrangement of hepatocyte spheroids on a microfabricated chip. *Tissue Eng.* 2005;117-8:1254–62.
104. Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* 2004;224:195–202;
105. Lin RZ, Chang HY Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology.* 2008, 3:1172-84. 10.1002/biot.200700228.
106. Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, et al. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 2905: 1385– 98.
107. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Molecular Cell Biology.* 2006; 7:211-24.
108. Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 1984;95:1–23. DOI: 10.1007/978-3-642-82340-4_1.
109. Fuller B, Green C, Grischenko V (2003) Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century. *Probl Cryobiol* 10: 63– 83.
110. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2020; 41:187–196.
111. Ranneh, Yazan & Saulol Hamid, Nur Fazila & Goh, Yong & Hashim, Zailina & Abdulwahid, Samiaa. (2019). Dimethyl Sulfoxide and Their Toxicity;
112. Gurtovenko A, Anwar J Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide, *J. Phys Chem.B.*, 2007, 6, 111(35):10453-60.
113. Szmant HH. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. *Ann. NY Acad. Sci.* 243(1), 20–23 (1975).
114. Kajiura S, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. Protocols for Cryopreservation of Intact Hair Follicle That Maintain Pluripotency of Nestin-Expressing Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells.

Methods Mol Biol. 2016; 1453: 173–8 [cited 2019 Nov]. PMID: 27431257. DOI: 10.1007/978-1-4939-3786-8_18.

115. Hill RP, Gledhill K, Gardner A, Higgins CA, Crawford H, Lawrence C, et al. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. PLoS One. 2012; 7(11): e50742. [cited 2019 Nov]. PMID: 23226372. PMCID: PMC3511366. DOI: 10.1371/journal.pone.0050742.

116. Song YM, Song SO, Jung YK, Kang ES, Cha BS, Lee HC, et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. Autophagy. 2012; 8: 1085–97. DOI: 10.4161/auto.20260.

117. Dlodla PV, Jack B, Viraragavan A, Pheiffer C, Johnson R, Louw J, et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocyte. Toxicology Reports. 2018; 5: 1014–20. [cited 2019 Nov]. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.10.002.

118. Ruan R, Zou L, Sun S, Liu J, Wen L, Gao D, et al. Cell blebbing upon addition of cryoprotectants: a self-protection mechanism. PLoS One. 2015; 10(4): e0125746. [cited 2019 Nov]. PMID: 25875076. PMCID: PMC4395349. DOI: 10.1371/journal.pone.0125746.

119. Ranneh, Yazan & Saulol Hamid, Nur Fazila & Goh, Yong & Hashim, Zailina & Abdulwahid, Samiaa. (2019). Dimethyl Sulfoxide and Their Toxicity.

120. Cabrita E, Anel L, Herraes MP Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm, Theriogenology, 2001, 56, 623–635. DOI:10.1016/S0093-691X(01)00594-523.

121. Liu Y, Xu X, Ma X, Martin-Rendon E, Watt S, Cui Z Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions, Biotechnol Prog., 2010, 26(6), 1635-43. DOI: 10.1002/btpr.464.

122. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B Death through a tragedy: Mitotic catastrophe. Cell death and differentiation, 2008; 15: 1153-62. DOI:10.1038/cdd.2008.47.

123. Jourdon P, Berwald-Netter Y, Dubois JM. Effects of dimethylsulfoxide on membrane currents of neuroblastoma glioma hybrid cell BBA. *Biomembranes*. 1986 Apr; 14, 856(2): 399-402. [https://DOI.org/10.1016/0005-2736\(86\)90053-2](https://DOI.org/10.1016/0005-2736(86)90053-2).
124. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition, *Oncogene*, 2004 Apr 12; 23(16):2825-37. DOI:10.1038/sj.onc.1207528
125. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: Mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation*, 2008, 15, p. 1153-62. DOI:10.1038/cdd.2008.47
126. Hill RP, Gledhill K, Gardner A, Higgins CA, Crawford H, Lawrence C, et al. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. *PLoS One*. 2012; 7(11): e50742. [cited 2019 Nov]. PMID: 23226372. PMCID: PMC3511366. DOI: 10.1371/journal.pone.0050742 .
127. Dłudla PV, Jack B, Viraragavan A, Pheiffer C, Johnson R, Louw J, et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocyte. *Toxicology Reports*. 2018; 5: 1014–20. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.10.002 .
128. Yazici I, Molski M, Siemionow MZ. Cryopreservation in Plastic Surgery. Our Experience and Review of the Literature. *Experimental Models and Research Designs*. London. Springer; 2015. p. 255-64. DOI: 10.1007/978-1-4471-6335-0_32.
129. Finkenstaedt-Quinn SA, Ge S, Haynes CL. Cytoskeleton dynamics in drug-treated platelets. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407(10): 2803–9. DOI: 10.1007/s00216-015-8523-7
130. Na J, Baker D, Zhang J, Andrews PW, Barbaric I. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein Cell*. 2014; 5: 569–79. DOI: 10.1007/s13238-014-00739.
131. Algaier J, Himes RH. The effects of dimethyl sulfoxide on the kinetics of tubulin assembly, *Biochim Biophys Acta*. 1988, 13, 954(3): 235-43.

132. Van der Elst J, Van der Abbeel R, Jacobs E, Wisse A, Van Steirteghem. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction*. 1988; 3(8): 960–967.
133. Pajot-Augy E. Comparative effects of cryosolvents on tubulin association, thermal stability, and binding of microtubule-associated proteins. *Cryobiology*. 1993 Jun;30(3): 28698.
134. Cabral G, Sans SS, Cowan CR, Dammermann, A. Multiple mechanisms contribute to centriole separation in *C. elegans*, *Curr Biol.*, 2013, 22, 23(14):13807.
135. Gulevsky A, Lavrik A, Trifonova A. The Influence of DMSO and a Fraction (below 5 Kda) from Cord Blood on MSC Culture Growth. *Problems of cryobiology*. 2014; 3: 96-99
136. Johnson MH, Pickering, SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte, *Development*. 1987; 100(2): 313-24.
137. Zhao J, Hao H-N, Thomas RL, Lyman WD. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 2001; 19 (3), 212–218.
138. Cao T-T, Zhang Y-Q. The potential of silk sericin protein as a serum substitute or an additive in cell culture and cryopreservation. *AminoAcids*. 2017; 49(6), 1029–1039.
139. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach EI, et al. Obtaining primary culture of adrenal cells of newborn piglets. *Medicine today and tomorrow*. 2011; 1(2): 248–52.
140. Hammarback JA, Letourneau PC. Neurite extension across regions of low cell-substratum adhesivity: implications for the guidepost hypothesis of axonal pathfinding. *Dev Biol*. 1986;117(2):655–662. doi:10.1016/0012-1606(86)90334-9
141. Ehrhart F, Schulz JC, Katsen-Globa A, Shirley SG, Reuter D, Bach F, Zimmermann U, Zimmermann H. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for

- cryobanking of human tumours. *Cryobiology*. 2009 Apr; 58(2):119-27. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.005. Epub 2008 Dec 3. PubMed PMID: 19094979;
142. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, Бондаренко ТП & Божок ГА. Изменение экспрессии хромогранина а в надпочечниках поросят на разные сроки неонатального развития. *Вісник проблем біології і медицини*, 2017; 2 (3), 99-104.
143. Ramgolam K, Lauriol J, Lalou C, Lauden L, Michel L, de la Grange P, et al. Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One*. 2011 Apr 15;6(4):e18784. DOI: 10.1371/journal.pone.0018784.
144. Малюгин БЭ, Борзенко СА, Сабурин ИИ, Репин ВС, Кошелева НВ, Колокольцова ТД и др. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока. *Офтальмохирургия*. 2013;4:89–97. DOI: 10.25276/0235-4160-2013-4-89-97
145. Терских В, Васильев А. Стволовые клетки (обзор). *Эстетическая медицина*. 2004;3(4): 324–35.
146. Репин ВС, Ржанинова АА, Шаменков ДА. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: Реметэкс; 2002: 176.
147. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, Божок ГА. Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии. Божок ГА. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2016; 26 (2): 188-195.
148. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, Божок ГА. Морфологические и фенотипические особенности цитосфер, формирующихся в культуре клеток надпочечников неонатальных поросят, в обычных и низкоадгезивных условиях // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2015; 25 (2): 190-196.

149. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, Stadel D, Braubach P, et al. Generation of Murine Sympathoadrenergic Progenitor-Like Cells from Embryonic Stem Cells and Postnatal Adrenal Glands. 2013; 8(5): e64454.
150. Vazquel MD, Bouchet P, Mallet J-L, Foliguet B, Gkrard H, LeHeup H. 3D Reconstruction of the Mouse's Mesonephros. *Anat. Histol. Embryol.* 1998; 27: P.283-287.
151. Плакcина ЕМ. Получение культуры нейроблаcтоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии / Плакcина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, Божок ГА. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26 (2): 188195.
152. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells.* 2009.; 27(10): 2602–2613.
153. Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda).* 2017; 32(4): 266277.
154. Vukicevic V, Rubin de Celis MF, Pellegata NS, Bornstein SR, Androutsellis-Theotokis A, Ehrhart-Bornstein M. Adrenomedullary progenitor cells: Isolation and characterization of a multi-potent progenitor cell population// *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2014; 408: 178–184.
155. Kodaira K, Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. Imada M, Goto M, Tomoyasu A, Fukuda T, Kamijo R. Katagiri, T. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006: 1224–1231.
156. Trojanowski JQ, Walkenstein N, Lee VM. Expression of neurofilament subunits in neurons of the central and peripheral nervous system: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies. *J Neurosci.* 1986; 6(3): 650–60. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.06-03-00650.
157. Couchman JR, Gibson WT, Thom D, Weaver AC, Recs DA, Parish WE: Fibroncctin distribution in epithelial and associated tissues of the rat. *Arch Dermatol Res* 266:295-310, 1979.

158. Tubulin Beta-3 Chain as a New Candidate Protein Biomarker of Human Skin Aging: A Preliminary Study Sylvia G. Lehmann, Sandrine Bourgoin-Voillard, Michel Seve, Walid Rachidi *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 5140360.
159. Jiang YQ, Oblinger MM. Differential regulation of beta III and other genes during peripheral and central neuron development. *J Cell Sci*. 1992 Nov;103(Pt 3):643-51. PMID: 1478962.
160. Ching-Wu Hsia, Ming-Yi Ho, Hao-Ai Shui, Chong-Bin Tsai, Min-Jen Tseng, Bing Yan Analysis of Dermal Papilla Cell Interactome Using STRING Database to Profile the ex Vivo Hair Growth Inhibition Effect of a Vinca Alkaloid Drug, Colchicine Academic Editor.
161. Kajiura S, Mii S, Aki R, et al. Cryopreservation of the Hair Follicle Maintains Pluripotency of Nestin-Expressing Hair Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21(8): 825–831. DOI:10.1089/ten.TEC.2014.0500.
162. Couchman JR. Rat hair follicle dermal papillae have an extracellular matrix containing basement membrane components. *J Invest Dermatol*. 1986; 87(6):762-7. PubMed PMID: 3537150.
163. Danielyan L, Zellmer S, Sickinger S, Tolstonog GV, Salvetter J, Loughmati A, et al. Keratinocytes as depository of ammonium-inducible glutamine synthetase: age- and anatomy-dependent distribution in human and rat skin. *PLoS One*. 2009; 4(2): e4416. DOI:10.1371/journal.pone.0004416.
164. Couchman JR, Gibson WT, Thom D, Weaver AC, Recs DA, Parish WE: Fibronectin distribution in epithelial and associated tissues of the rat. *Arch Dermatol Res* 266:295-310, 1979
165. Cao W, Li L, Tran B, et al. Extensive Hair Shaft Growth after Mouse Whisker Follicle Isolation, Cryopreservation and Transplantation in Nude Mice. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0145997. Published 2015 Dec 30. DOI:10.1371/journal.pone.0145997.

166. Cocchia D, Michetti F. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 1981;215(1):103–12. DOI: 10.1007/BF00236252.
167. Yoshida, H, Kunisada T, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, et al. Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001; 6: 1–5.
168. Toma J. G., Akhavan M., Fernandes K. J., Barnabe-Heider F., Sadikot A., Kaplan D. R., Miller F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 3, 778-784.
169. Jahoda C. .A., Whitehouse J., Reynolds A. J., Hole N. (2003) Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol.* 12, 849-859.
170. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity. *Regen Med.* 2020 Mar;15(3): 1463-1491. DOI: 10.2217/rme-2019-0145.
171. Hill RP, Gledhill K, Gardner A, Higgins CA, Crawford H, Lawrence C, et al. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. *PLoS One.* 2012; 7(11): e50742. [cited 2019 Nov]. PMID: 23226372. PMCID: PMC3511366. DOI: 10.1371/journal.pone.0050742.
172. Dlodla PV, Jack B, Viraragavan A, Pheiffer C, Johnson R, Louw J, et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocyte. *Toxicology Reports.* 2018; 5: 1014–20. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.10.002
173. Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides.* 2012; 33(1): 178-85. PMID: 22138166. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.11.013.
174. Ruan R, Zou L, Sun S, Liu J, Wen L, Gao D, et al. Cell blebbing upon addition of cryoprotectants: a self-protection mechanism. *PLoS One.* 2015; 10(4):

e0125746. [cited 2019 Nov]. PMID: 25875076. PMCID: PMC4395349. DOI: 10.1371/journal.pone.0125746.

175. De Leeuw FE, Van Wagendonk-De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effect of various cryoprotectants agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing, *Cryobiology*. 1993, 30, 32-44.

176. Johnson, M.H., Pickering, S.J. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte, *Development*, 1987,100(2), 313-24

177. Cabrita E, Anel L, Herraiz MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm, *Theriogenology*. 2001, 56, 623–635.

178. Decot V. Houzé P. Stoltz J-F, Bensoussan D. Quantification of Residual DiMethylSulfoxide after Washing Cryopreserved Stem Cells and Thawing Tissue Grafts. 1 Jan. 2009 : 293 – 300.

179. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, Lowdell M, Mericka P, Petrenko A, Petrenko Y, Rogulska O, Stolzing A, and Stacey G N. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity. *Regenerative Medicine*. 2020 15:3, 1463-1491.

180. Liu Y, Xu X, Ma X, Martin-Rendon E, Watt S, Cui Z. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions, *Biotechnol Prog*. 2010; 26(6): 1635-43.

181. Potapova, T, Gorbsky, GJ, The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis, *Biology (Basel)* 2017, 6(1), 1-12.

182. Dlodla PV, Jack B, Viraragavan A, Pheiffer C, Johnson R, Louw J, et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocyte. *Toxicology Reports*. 2018; 5: 1014–20. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.10.002.

183. Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*. 2012; 33(1): 178-85. PMID: 22138166. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.11.013
184. Na J, Baker D, Zhang J, et al. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation// *Protein Cell*; 2014: Vol. 5. P. 569– 79
185. Yazici I, Molski M, Siemionow MZ. Cryopreservation in Plastic Surgery. Our Experience and Review of the Literature// *Experimental Models and Research Designs*. London, Springer; 2015. P. 255–64
186. Potapova T, Gorbsky GJ. The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology*. Basel. 2017; 6 (1):1-12
187. Kalatova B, Jesenska R, Hlinka D, et al Tripolar mitosis in human cells and embryos: occurrence, pathophysiology and medical implications. *Acta Histochem*. 2015; 117(1): 111-25
188. Hill RP, Gledhill K, Gardner A, Higgins CA, Crawford H, Lawrence C, Hutchison, C.J., Owens, W.A., Kara, B., James, S.E., Jahoda, C.A. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. *PLoS One*. 2012; 7(11):e50742. DOI: 10.1371.
189. Kajiura, S., Mii, S., Aki, R., Hamada, Yu., Arakawa N., Kawahara, K., Li, L., Katsuoka, K., Hoffman M.R., Amoh Y. Cryopreservation of the Hair Follicle Maintains Pluripotency of Nestin-Expressing Hair Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21(8), p. 825–831. DOI: 10.1089.
190. Tamatsu Y, Tsukahara K, Hotta M, Shimada K. Vestiges of vibrissal capsular muscles exist in the human upper lip. *Clin Anat*. 2007 Aug;20(6):628-31. doi: 10.1002/ca.20497. PMID: 17458869.
191. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач ЕИ, Гурина ТМ. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. *Проблемы криобиологии*. 2011;21(1):58–67.

192. Louthan O. Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(5):173–81.
193. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secreto granin family. *N Engl J Med*. 2003 Mar 20; 348(12):1134–49. DOI: 10.1056/ 021405
194. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach EI, et al. Obtaining primary culture of adrenal cells of newborn piglets. *Medicine today and tomorrow*. 2011; 1(2): 248–52.
195. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, и др. Экспрессия β -III-тубулина в культуре клеток неонатальных надпочечников: сравнение монослойного и 3D-культивирования. *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Серія «Біологія»*. 2017; 28: 76–86.
196. 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 Nov 30;165(1):36–44. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.11.021.
197. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol*. 2006; 298(2): 335–43.
198. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач ЕИ, Бондаренко ТП. Получение первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. *Медицина сьогодні і завтра*. 2011; 1(2): 248–52.
199. Chung KF, Sicard F, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells*. 2009; 27(10): 2602–13
200. Unsicker K, Müller TH. Purification of bovine adrenal chromaffin cells by differential plating. *J Neurosci Methods*. 1981; 4(3): 227–41.

ДОДАТОК А

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у фахових журналах України

1. **Новикова ОЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП. Морфологические особенности первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных разных видов. Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Серия «Биология». 2019; (33): 49–59. DOI: 10.26565/2075-5457-2019-03-09.
2. **Новикова ОЮ**, Сидоренко ОС, Божок ГА, Бондаренко ТП. Влияние криоконсервирования на экспрессию хромогранина А в культуре клеток надпочечников неонатальных свиней. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29(4):344–353. DOI: 10.15407/cryo29.04.344.
3. **Новикова ОЮ**, Бондаренко ТП. Характеристики нативной и криоконсервированной культур клеток дермальной папиллы вибрисс новорожденных кроликов. Вісник проблем біології та медицини. 2019; 3 (152): 54-57.
4. **Новикова ОЮ**, Бондаренко ТП. Цитоморфологические нарушения в культуре клеток дермальной папиллы кролика после инкубации с диметилсульфоксидом. Український журнал медицини, біології та спорту. 2019; 4 (6): 19-24.

Статті у фахових зарубіжних журналах

5. **Novikova OYu, Bozhok GA, Bondarenko TP**. Effect of Incubation with Dimethyl Sulfoxide on the Mitotic Cycle of Cell Culture of Rabbit Dermal Papilla. Recent Advances in Biology and Medicine. 2019; 1(5): 6. <https://doi.org/10.18639/RABM.2019.882649>.
6. **Novikova O**. Effect of Low-Molecular Fraction of Fish Peptide Albutrisan-Nr on In Vitro Neurogenesis Recent Advances in Biology and Medicine Recent Adv Biol Med. 2020; 6: 4. <https://doi.org/10.18639/RABM.2020.1101035>.

ДОДАТОК Б

Апробація результатів роботи

Тези наукових доповідей конференцій

1. **Новикова ОЮ**, Плаксина ЕМ, Божок ГА, Лаврик АА, Бондаренко ТП. 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. Харків; 23–24 черв. 2016 р. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26 (2): 178;
2. **Новикова ОЮ**, Сидоренко ОС, Божок ГА, Бондаренко ТП. 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. Харків; 23–24 трав. 2018 р. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 179;
3. **Новікова ОЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП. Культивування клітин дермальної папіли кролика *in vitro* в середовищах різного складу. З'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. Київ, Україна, 23-25.06. 2018;
4. **Новікова ОЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП. Життєздатність та ростовий потенціал кріоконсервованої культури клітин дермальної папілом кролика; 6й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнароднім Представництвом, м. Яремча, 26 – 30. 07. 2019;
5. **Novikova OYu, Bozhok GA, Bondarenko TP.** Cultivation of newborn rabbit vibrissa dermal papilla cells *in vitro* XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, Київ. 2019;

6. **Новикова ОЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП. 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. Харків; 27–29 трав. 2019 р. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2019; 29 (2): 177;

7. **Novikova OYu**. 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: 54;

8. **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: 112;

9. **Новикова ОЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП. 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: 642.