

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ШЕВЧЕНКО МАРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 57.043:611-018.8.085.2

**ВПЛИВ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА
ПОВЕДІНКУ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН
НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
Сукач Олександр Миколайович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
старший науковий співробітник відділу кріобіохімії, м. Харків

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Жегунов Геннадій Федорович,
Харківська державна зооветеринарна академія МАП України,
завідувач кафедри хімії та біохімії, м. Харків

доктор біологічних наук, професор
Клімова Олена Михайлівна,
ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії
імені В.Т. Зайцева НАМН України»,
завідувач діагностичної лабораторії з імуноферментним та
імунофлюоресцентним аналізом, м. Харків

Захист відбудеться « 24 » листопада 2015 року о 13–30 на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН
України за адресою: 61015, м. Харків,
вул. Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

Автореферат розісланий « ____ » _____ 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук,
професор

Розанов Л.Ф.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Дослідження нейральних стовбурових і прогеніторних клітин має велике значення для виявлення особливостей розвитку нервової системи людини і тварин. На сьогоднішній день розвиток нервової системи в процесі ембріогенезу вивчений достатньо добре. Але поведінка нейральних попередників у процесі нейро- і гліогенезу в постнатальному і дорослому мозку багато в чому залишається не зрозумілою. Як модель для вивчення постнатального нейро- і гліогенезу та їхнього взаємозв'язку, розвитку апоптоза, механізмів диференціювання стовбурових (СК) і прогеніторних (ПК) клітин можуть використовуватися культури клітин, виділених з тканин головного мозку новонароджених тварин (Palmer T.D. et al., 2001; Петренко О.Ю. та ін., 2011). Важливим при цьому є вивчення впливу клітинного мікрооточення на функціонування нейральних СК і ПК. Відомо, що формування тканин мозку в неонатальному періоді характеризується активною проліферацією, міграцією та диференціюванням СК і ПК. Дані процеси відбуваються за безпосередньої участі клітинного мікрооточення, до складу якого входять підтримуючі клітини стовбурової ніши, фактори росту, молекули адгезії та міжклітинного матріксу (Brizzi M.F. et al., 2012). В умовах культивування просторово-функціональна організація клітинного мікрооточення відновлюється при формуванні клітинами тривимірних структур, а саме агрегатів і сфероїдів (Aydin H.M. et al., 2010; Lu H. et al., 2012; Bernard A.B., 2013). Міжклітинні взаємодії, специфічна гістологічна і тривимірна тканиноспецифічна архітектура, механічні та біохімічні сигнали, які формуються у таких структурах, є необхідними для виживання, проліферації та диференціювання СК і ПК (Conover J.C., Notti R.Q., 2008), що зумовлює актуальність дослідження впливу факторів мікрооточення та формування нервовими клітинами (НК) агрегатів на їх подальше виживання і функціонування в культурі *in vitro*.

Використання клітин у медико-біологічних дослідженнях передбачає розробку ефективних методів їх зберігання. Як правило, для цього клітини заморожують до температури рідкого азоту (Гольцев А.М. та ін., 2003; Бабійчук Л.О. та ін., 2010), однак для короткострокового зберігання більш доцільним є використання низьких позитивних температур (Fuller B.J. et al., 2006). Вивчення впливу гіпотермії на НК новонароджених становить також інтерес для медицини. Відомо, що гіпотермія є перспективним методом зменшення запалення та активації відновлювальних процесів у нервових тканинах, пошкоджених внаслідок гіпоксії і травм у новонароджених (Xiong M. et al., 2011). Однак механізм нейропротекторної дії гіпотермії на клітини нервової тканини, а також її віддалені наслідки залишаються недостатньо вивченими. Ізольовані НК новонароджених можна використовувати як модель для вивчення впливу гіпотермії на клітини нервової тканини *in vitro*, що дозволить виявити механізми впливу низьких позитивних температур як на СК і ПК, так і на нейрональні та гліальні клітини, а також встановити виникнення можливих побічних ефектів гіпотермічного впливу та розробити підходи їхнього усунення. Виходячи з вищесказаного, актуальною є розробка протоколів отримання, культивування та зберігання НК новонароджених щурів (НЩ).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана у відділі кріобіохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідних тем: «Вивчення дії низьких температур на властивості стовбурових клітин та клітин-попередників в умовах експериментальної трансплантації та культивування» (шифр 2.2.6.34, номер державної реєстрації 0107U000538) і «Вивчення впливу кріоконсервування на біологічні властивості стовбурових клітин різного походження при моношаровому і об'ємному культивуванні та експериментальній трансплантації» (шифр 2.2.6.71, номер державної реєстрації 0112U003132).

Мета і задачі дослідження: Мета роботи – визначення впливу гіпотермічного зберігання на стан і поведінку в культурі клітин головного мозку новонароджених щурів в залежності від умов мікрооточення.

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Вивчити вплив фетальної сироватки телят і сироватки крові дорослих щурів на виживання та поведінку в культурі диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин головного мозку новонароджених щурів.
2. Дослідити особливості дії екстрактів тканин мозку і печінки неонатальних щурів на поведінку нейральних стовбурових/прогеніторних клітин головного мозку новонароджених щурів в умовах культури *in vitro*.
3. Визначити молекулярно-масовий розподіл речовин пептидно-білкової природи в екстрактах тканин мозку і печінки щурів різного віку.
4. Провести оцінку ефективності гіпотермічного зберігання диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин головного мозку новонароджених щурів у DMEM/F-12 і в сахарозомісткому розчині.
5. Вивчити вплив екстрактів мозку та печінки неонатальних щурів на ефективність гіпотермічного зберігання суспензії нервових клітин головного мозку новонароджених щурів.
6. Виявити роль формування багатоклітинних агрегатів на ефективність гіпотермічного зберігання диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин головного мозку новонароджених щурів.

Об'єкт дослідження – вплив умов культивування та гіпотермічного зберігання на морфофункціональні властивості культури клітин головного мозку новонароджених щурів.

Предмет дослідження – культура нервових клітин новонароджених щурів, отримана з тканини головного мозку, до і після гіпотермічного зберігання.

Методи дослідження.

В роботі були використані сучасні методи кріобіології та клітинної біології: культивування, імуноцитохімія, спектрофотометрія, гель-проникна хроматографія, світлова та флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше проведені порівняльні дослідження впливу середовищ внутрішньоклітинного (сахарозомісткий розчин (СМР) (Кравченко Л.П. та ін., 1997) та позаклітинного типу (DMEM/F-12) на ефективність гіпотермічного зберігання (ГЗ) НК у складі суспензії та

багатоклітинних агрегатів, а також впливу сироватки крові та екстрактів тканин мозку (ЕМ) і печінки (ЕП) на особливості поведінки НК в культурі *in vitro*.

Показано, що середовище DMEM/F-12, що містить 10% сироватки крові дорослих щурів (СКДЩ) і СМР без сироватки забезпечують збереження диференційованих НК, а також нейральних стовбурових і прогеніторних клітин протягом 2 діб в умовах гіпотермії.

В роботі отримані оригінальні дані про те, що ГЗ нервових клітин у вигляді агрегатів дозволяє збільшити час зберігання клітин до 4 діб. Показано, що нервові клітини при ГЗ у вигляді агрегатів у середовищі DMEM/F-12, незалежно від присутності СКДЩ, і в СМР без сироватки, зберігають здатність формувати моношар, на якому з'являються β -тубулін III-позитивні клітини і колонії недиференційованих нестин/віментин-позитивних клітин.

Встановлені мінімальні ефективні концентрації ЕМ і ЕП, при яких виявляється їх вплив на НК в умовах культури *in vitro*. Показано, що додавання ЕМ в концентрації 0,3 мг білка/мл до середовища культивування НК прискорює формування конфлюентного моношару і появу на ньому β -тубулін III-позитивних нейробластів і колоній недиференційованих нестин/віментин-позитивних клітин. Присутність ЕП в концентрації 0,3 мг білка/мл у середовищі культивування НК пригнічує формування моношару і появу на ньому β -тубулін III-позитивних клітин, та колоній нестин- і віментин-позитивних клітин. Було вперше виявлено, що додавання ЕМ або ЕП до середовища зберігання DMEM/F-12 дозволяє ефективно замінювати сироватку крові протягом 2 діб ГЗ нервових клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Результати, представлені в роботі, свідчать про те, що для ефективного зберігання суспензії НК у гіпотермічних умовах протягом 2 діб може бути використане середовище DMEM/F-12, збагачене 10% СКДЩ, або СМР без добавок.

В роботі отримані дані про те, що ГЗ нервових клітин у складі агрегатів збільшує строк зберігання нейральних стовбурових, прогеніторних і диференційованих клітин, у порівнянні з суспензією, до 4 діб. При цьому присутність сироватки у середовищі зберігання не впливає на виживання клітин у складі агрегатів, що дозволяє уникнути її негативної дії в процесі зберігання клітин і можливого подальшого експериментального чи клінічного застосування.

Проведені дослідження можуть бути основою для створення ефективних консервуючих розчинів для ГЗ ізольованих НК, а також для з'ясування механізмів пошкодження клітин головного мозку в умовах холодової гіпоксії.

Результати даної роботи можуть бути використані при створенні протоколів культивування та ГЗ нервових клітин.

Дані про молекулярно-масовий розподіл речовин пептидної і білкової природи в екстрактах можна використовувати при вивченні механізмів дії екстрактів тканин.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведений аналіз літератури за темою дослідження. Спільно з науковим керівником визначені мета і задачі роботи, а також шляхи їх вирішення. Автором особисто отримані результати експериментальних досліджень, проведений первинний аналіз даних та їх статистична обробка. Автором особисто виконана обробка експериментальних даних і зроблені попередні висновки. Автором разом з

науковим керівником були інтерпретовані результати та зроблені остаточні висновки. Внесені для захисту положення та експериментальні дані отримані за безпосередньої участі автора дисертаційної роботи.

В опублікованих разом із співавторами роботах особистий внесок здобувача полягав у наступному:

- у роботах [1, 14, 16] – в отриманні та культивуванні НК, мікроскопічних дослідженнях, виявленні особливостей поведінки НК в культурі *in vitro*;

- у роботі [2] – у виявленні особливостей поведінки диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин у процесі їх культивування в присутності фетальної сироватки телят (ФСТ) і СКДЩ;

- у роботах [6, 8, 15] – у дослідженні особливості дії екстрактів тканин мозку і печінки на поведінку нейральних стовбурових/прогеніторних клітин головного мозку НЩ в умовах культури *in vitro*;

- у роботах [3, 4, 9, 10, 11, 13] – у вивченні впливу ГЗ диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин головного мозку НЩ у середовищах різного складу на виживання, метаболічну та проліферативну активність і поведінку в культурі *in vitro*;

- у роботах [7, 12, 17] – у вивченні ролі формування багатоклітинних агрегатів на ефективність ГЗ диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин головного мозку НЩ;

- у роботі [5] – у визначенні вмісту речовин пептидної і білкової природи в екстрактах тканин мозку і печінки щурів в залежності від стадії розвитку тварин.

Апробація результатів дисертації. Наукові результати, представлені в дисертації, доповідалися і обговорювалися на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми і перспективи» (м. Київ, 2010), на конференціях молодих вчених «Холод в біології і медицині» (м. Харків, 2010, 2011, 2012, 2013), на VI Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (м. Харків, 2011), на науковій конференції, присвяченій 40-річчю ІПКіК НАН України «Актуальні проблеми кріобіології і кріомедицини» (м. Харків, 2012), на VI Всеросійському з'їзді трансплантологів (м. Москва, 2012), на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неопатології та дитячій неврології» (м. Київ, 2013), на IV з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (м. Ужгород, 2014), на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє» (м. Київ, 2014), на Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» (м. Іркутськ, 2015).

Публікації. Результати дисертаційної роботи викладені у 17 друкованих роботах, з них 5 – у наукових спеціалізованих виданнях, 12 – у збірниках тез наукових робіт і доповідей на наукових конференціях.

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, розділу, присвяченому опису матеріалів і методів дослідження, розділу з результатами власних досліджень та їх обговоренням, висновків і списку використаної літератури. Дисертація викладена на 154 сторінках, ілюстрована

9 таблицями та 50 рисунками (з них – 25 фотографій). Список використаної літератури містить 224 найменування (у тому числі 172 закордонних), викладений на 25 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом дослідження слугували суспензії клітин головного мозку 80 новонароджених безпородних щурів. Експерименти проводили згідно з «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими V Національним конгресом з біоетики (м. Київ, Україна, 2013), погодженими з положеннями «IV Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (ETS 123, Страсбург, Франція, 1986) і дозволом Комітету з біоетики ІПКіК НАН України.

Первинну суспензію клітин отримували після вилучення головного мозку у декапітованих новонароджених тварин шляхом механічно-вібраційної дезагрегації (Petrenko A.Yu. et al., 1991) тканини, яку попередньо витримували в 0,25% розчині трипсину. Отримані клітини культивували при концентрації 1, 2, 4 і 6 млн/мл у 24-лункових пластикових планшетах («Corning», США) у ростовому середовищі DMEM/F-12, яке містило 0,6 % глюкози, 2 мМ глутаміну, 3 мМ бікарбонату натрію, 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Середовище збагачували 10% СКДЩ або фетальною сироваткою телят (ФСТ) 3 фірм-виробників («Біолот», Росія; «Sigma», США; «Gold» Австрія). Культивування НК проводили в CO₂ інкубаторі при 37 °C, 95% вологості в атмосфері 5% CO₂.

Для отримання екстрактів використовували стандартну методику (Вепрінцев Б.М., 1976). Тканини мозку і печінки дорослих і новонароджених щурів, а також фетальні тканини відмивали від крові фосфатним буфером і гомогенізували у рівному об'ємі середовища DMEM/F-12. Отримані гомогенати центрифугували при 7000 g (T24, Німеччина) протягом 10 хв, після чого відбирали супернатант і стерилізували пропусканням через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм («Millipore», США). Вміст білка в екстрактах і СКДЩ визначали за методом Лоурі (Lowry O. et al., 1951). Спектрофотометричні дослідження проводили на спектрофотометрі Cary 50 («Varian», Австралія). Молекулярно-масовий розподіл пептидних і білкових фракцій екстрактів проводили за допомогою гель-проникної хроматографії (Бідлінгмейер Б. та ін., 1990).

Для ГЗ використовували первинну суспензію клітин головного мозку НЩ, а також агрегати, які отримували в процесі короткострокового культивування цієї суспензії, посіяної в концентрації 2 або 4 млн/мл клітин в середовище DMEM/F-12, збагачене 10% СКДЩ. ГЗ суспензії та агрегатів НК здійснювали при температурі +4 °C у DMEM/F-12 і СМР. Суспензію НК зберігали в концентрації 40–50 млн/мл у кріопробірках («Nunc», США) протягом 1, 2, 3 і 4 діб. Агрегати, утворені в одній лунці при культивуванні НК у концентрації 4 млн/мл в DMEM/F-12 з сироваткою, вміщували в 1,8 мл середовища для ГЗ, переносили в кріопробірки та зберігали протягом від 1 до 8 діб в гіпотермічних умовах. Після ГЗ проводили заміну середовища зберігання НК шляхом центрифугування суспензії протягом 3 хв при

150 g з наступним ресуспендуванням у середовищі DMEM/F-12, збагаченому 10% СКДШ, і висівали в концентрації 2 млн клітин/мл в культуру або піддавали тестам на збереженість і метаболічну активність.

Збереженість НК в суспензії й агрегатах після ГЗ визначали як відношення кількості клітин після ГЗ до їх кількості перед перенесенням в умови гіпотермії, і виражали у відсотках. Життєздатність клітин оцінювали за прокрашуванням трипановим синім (Seglen P.O., 1976) і пропідіум йодидом (Corder D.M., 1997) і виражали у відсотках як відношення кількості непрокрашених клітин до їх загальної кількості. Метаболічну активність клітин оцінювали на основі МТТ-тесту (Niks M. et al., 1990).

Для МТТ-тесту висівали 1×10^5 клітин на одну лунку, додавали 100 мкл культурального середовища і 20 мкл робочого розчину МТТ, та інкубували протягом 2 год при 37 °С в атмосфері 5% CO₂, 95% повітря. Далі додавали 100 мкл диметилсульфоксиду та інкубували протягом 20 хв. Зразки піпетували та вимірювали оптичну щільність розчину при довжині хвилі 540 нм на планшетному спектрофлуориметрі TECAN GENios («GMI», Австрія). Оцінку результатів тесту проводили шляхом зіставлення оптичної щільності в дослідних і контрольних пробах і виражали в умовних одиницях оптичної щільності $UOOC = O - K$, де O – оптична щільність у дослідних зразках, K – оптична щільність у контролі.

Щільність моношару визначали за кількістю прикріплених і розпластаних клітин на одиницю площі шляхом підрахунку кількості клітинних ядер після фарбування барвником Hoechst 33342. Розміри агрегатів оцінювали морфометричним методом за допомогою світлового інвертованого мікроскопа MT3000 («AmScope», США) з наступним вимірюванням площі перерізу проекції агрегатів (мкм²) за допомогою програми «Zeiss Image Examiner». Мікрофотозйомку культур НК здійснювали на мікроскопі Observer Z1 («Carl Zeiss», Німеччина).

В культурах НК визначали наявність специфічних маркерних білків: нейронів – β -тубуліна III; нейральних СК – нестина; нейральних ПК – віментина, клітин глії – GFAP. Для імуноцитохімічних досліджень використовували моноклональні анти- β -тубулін III, анти-GFAP, анти-нестин та анти-віментин антитіла, а також вторинні антитіла: FITC-кон'югований IgG, Chromeo 546-кон'юговані антитіла кози до IgG миші і Chromeo 488-кон'юговані антитіла кози до IgG кролика. Ядра клітин фарбували барвником Hoechst 33342.

Статистичну обробку експериментальних даних виконували з використанням програми «Statistica 7.0» («StarSoft», США). Для порівняння та оцінки відмінностей використовували параметричний t-критерій Ст'юдента (Стентон Г., 1999). Достовірно відмінними вважали результати при $p < 0,05$.

В роботі використовували наступні реактиви: розчин Версена («Біолот», Росія), трипсин, ФСТ («Біолот» Росія, «Sigma» США, «Gold» РАА, Австрія), середовище DMEM/F-12 («Sigma», США), первинні моноклональні антитіла до β -тубуліну III, GFAP, нестина та віментина («Sigma», США, «Abcam», Великобританія), вторинні антитіла («Abcam», Великобританія), Hoechst 33342 («Sigma», США), глутамін, параформальдегід, метил тіазолідифеніл-тетразоліум бромід («Sigma», США), пропідіум йодид («Sigma», США), реактив Фоліна, бичачий сироватковий альбумін.

Результати досліджень та їхнє обговорення

Вплив фетальної сироватки телят і сироватки крові дорослих щурів при культивуванні нервових клітин новонароджених щурів. Для успішного виживання та функціонування ізольованих клітин в культурі *in vitro* необхідне створення умов, наближених до тих, в яких клітини знаходилися *in vivo*. Для цього можна використовувати середовища культивування, збагачені компонентами біологічного походження з не цілком визначеним складом (плазма, сироватка крові, тканинні екстракти) (Pajtler K. et al., 2010; Rauch C. et al., 2011), або такі, що містять синтетичні добавки (Gstraunthaler G., 2003). Як джерело біологічних добавок зазвичай використовують сироватку. При цьому необхідно враховувати певні особливості сироваток, такі як значна варіабельність складу, можлива токсичність (Davis J.M., 2002), міжвидові відмінності складу, а також відмінності, пов'язані з періодом онтогенезу тварин (ембріональна сироватка, сироватка новонароджених тварин) (Обухова Л.М. та ін., 2011). Для оцінки ефективності використання сироваток різного походження НК культивували у ростовому середовищі DMEM/F-12, яке збагачували 10% ФСТ з різних виробників або СКДЦ.

При культивуванні НК у середовищі DMEM/F-12 з додаванням усіх досліджених сироваток відбувалося формування агрегатів з суспензії поодиноких клітин. При культивуванні НК у безсироватковому середовищі DMEM/F-12 клітини не були здатні до формування агрегатів. Здатність до прикріплення клітинних агрегатів до підложки та формування моношару залежали від типу сироватки, якою збагачувалося середовище культивування. У присутності фетальних сироваток «Gold» і «Біолот» протягом всього часу культивування до поверхні лунок прикріплювалося не більше 60% агрегатів. У присутності ФСТ «Sigma» більшість агрегатів (>80%) прикріплювалися до підложки на 6 добу культивування. У присутності СКДЦ більшість агрегатів прикріплювалися до поверхні лунок на 4 добу культивування (рис. 1).

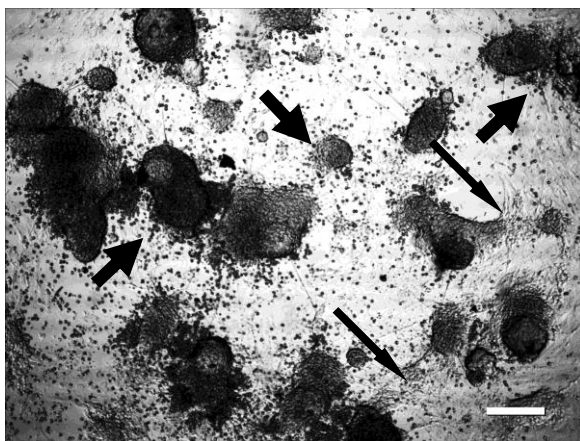


Рис. 1. Культура НК новонароджених щурів, 4 доби культивування у присутності СКДЦ. Міграція клітин від прикріплених агрегатів (короткі стрілки) та формування ділянок моношару (довгі стрілки). Масштаб: 100 мкм.

Особливості формування моношару НК протягом 7 діб культивування та його щільність залежали від наявності та якості використаної сироватки. При

культивуванні у безсироватковому середовищі поодинокі клітини прикріплювалися до поверхні лунок, але не розпластувалися. Використання ФСТ, незалежно від виробника, забезпечувало часткове формування конфлюенту при щільності моношару від $996,0 \pm 144,0$ до $1194,0 \pm 153,0$ клітин на мм^2 . При культивуванні НК протягом такого ж часу в присутності СКДЩ спостерігалось утворення конфлюенту на рівні 70% при щільності моношару $1485,0 \pm 159,0$ клітин на мм^2 , що в 1,4 рази перевищувало кількість клітин, які складали моношар у присутності ФСТ.

Використання імуноцитохімічних маркерів дозволило встановити, що після досягнення 70–80% конфлюентного моношару, клітини якого є позитивними на GFAP (рис. 2), на ньому виявляються клітини, які мають ознаки нейробластів (клітини округлої форми з світлою цитоплазмою, розмірами 9–12 мкм, з короткими відростками) і є позитивними на β -тубулін III (рис. 3). Щільність β -тубулін III-позитивних клітин на 9 добу культивування у присутності СКДЩ складала $1910,0 \pm 185,0$ клітин на мм^2 . В культурах НК, середовище яких містило ФСТ різних виробників, максимальна кількість даних клітин спостерігалась на 13 добу культивування, вона складала $1630,0 \pm 175,0$, $1100,0 \pm 114,0$ і $920,0 \pm 115,0$ клітин на мм^2 для ФСТ «Sigma», «Gold» і «Біолот» відповідно.

Наявність нейральних СК і ранніх клітин-попередників цього ж напрямку, яку визначають за допомогою маркерів нестина та віментина, виявлялась вже на 9–12 добу культивування НК у середовищі, збагаченому СКДЩ. При цьому на моношарі виявлялися колонії нестин/віментин-позитивних клітин (рис. 4). При культивуванні НК у середовищі, збагаченому ФСТ, подібні колонії не виявлялися.

Вплив екстрактів мозку і печінки неонатальних щурів на поведінку нервових клітин новонароджених щурів в культурі. Оскільки функціонування клітин знаходиться під впливом великої кількості регуляторних чинників, які виділяються як самими клітинами, так і клітинами їх мікрооточення (Discher D.E. et al., 2009), то одним із підходів, спрямованих на ідентифікацію даних факторів, механізмів їх дії та визначення ступеня специфічності для різних тканин, може слугувати вивчення впливу екстрактів на клітинному рівні *in vitro*. Ґрунтуючись на даних про високу біологічну активність екстрактів різних тканин та їх тканиноспецифічність (Кайдашев І.П., 1995), ми проводили культивування НК новонароджених щурів у середовищі DMEM/F-12 з 10% СКДЩ при додаванні ЕМ або ЕП у концентраціях 0,1, 0,2 і 0,3 мг білка/мл.

Присутність у середовищі культивування ЕМ у концентраціях 0,1, 0,2 та 0,3 мг білка/мл не впливала на стан НК в культурі: щільність моношару, який формували НК при додаванні ЕМ, незалежно від його концентрації, не відрізнялася від контролю, коливаючись у межах $1467,0 \pm 141,0$ – $1491,0 \pm 177,0$ клітин на мм^2 (рис. 5).

Наявність у середовищі культивування ЕП у концентраціях 0,1 і 0,2 мг білка/мл не впливала, а у концентрації 0,3 мг білка/мл чинила негативний вплив на стан і поведінку НК в культурі, а саме: НК не були здатні до формування конфлюентного моношару, кількість розпластаних на підложці клітин складала $996,0 \pm 183,0$ клітин на мм^2 , що у 1,5 рази менше, ніж в контролі (рис. 5), β -тубулін III-позитивні нейробластоподібні клітини та колонії нестин/віментин-позитивних клітин в культурі не виявлялися.

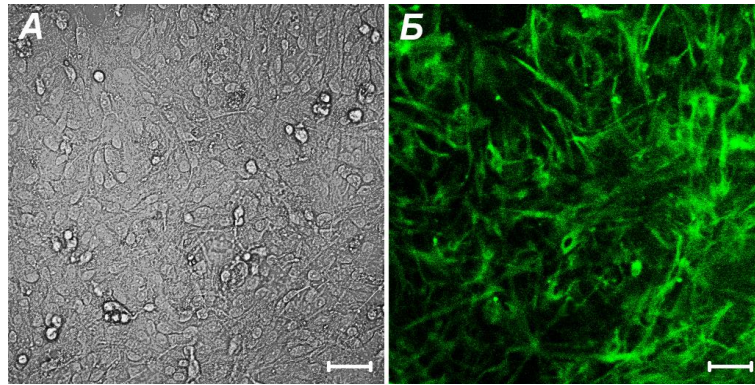


Рис. 2. Експресія GFAP, маркера астроцитів, в культурі НК новонароджених щурів, 6 діб культивування у присутності СКДЦ. Світлова (А) і флуоресцентна (Б) мікроскопія. Масштаб: 50 мкм.

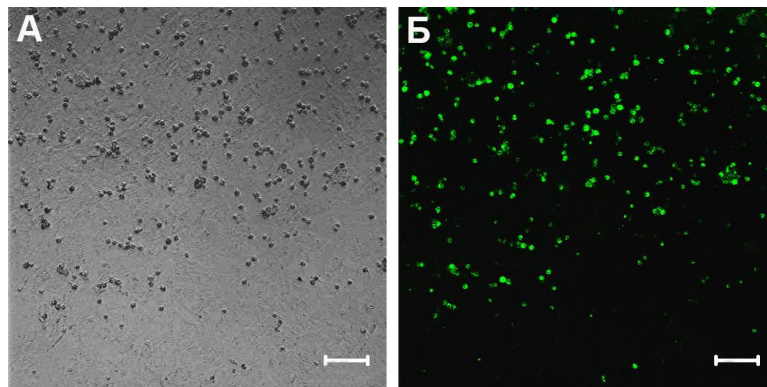


Рис. 3. Експресія β -тубуліна III в культурі НК, 7 діб культивування у присутності СКДЦ. Світлова (А) і флуоресцентна (Б) мікроскопія. Масштаб: 50 мкм.

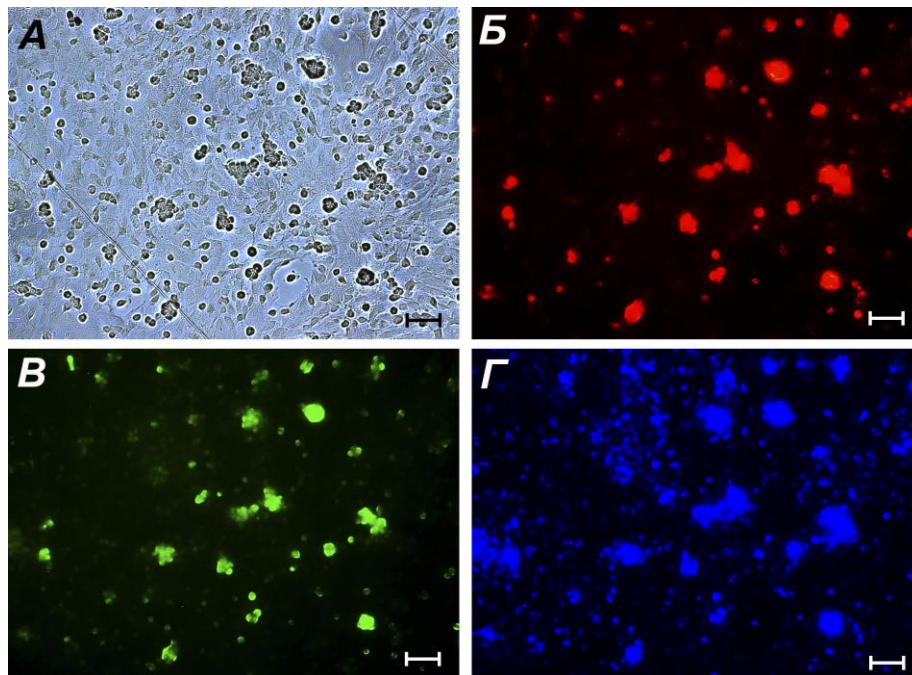


Рис. 4. Первинна культура НК новонароджених щурів, 12 діб культивування у присутності СКДЦ: А – нативний препарат; Б – експресія маркера СК нестина; В – експресія маркера ПК віментина; Г – забарвлення Hoechst. Масштаб: 50 мкм.

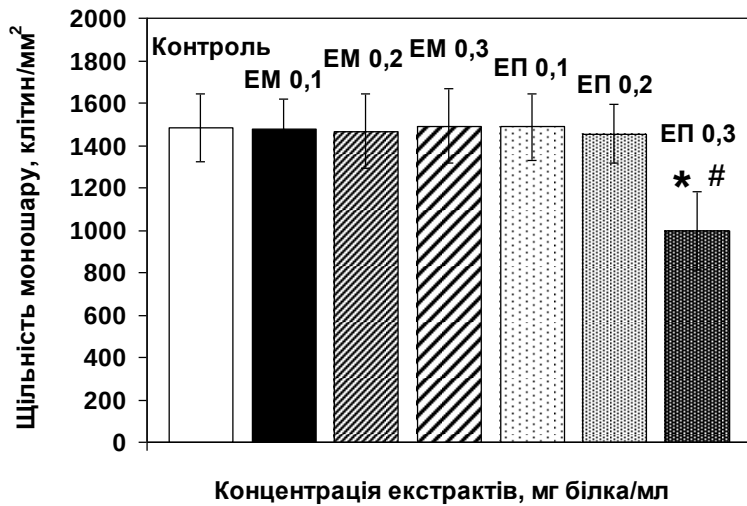


Рис. 5. Щільність моношару НК, 7 діб культивування в присутності ЕМ і ЕП у різних концентраціях.

Примітки:

* — відмінності статистично достовірні відносно контролю, $p < 0,05$; # — відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 з ЕМ, незалежно від концентрації, і з ЕП в концентрації 0,1 и 0,2 мг білка/мл, $p < 0,05$.

З'ясування можливих шляхів реалізації дії екстрактів потребує оцінки їх якісного та кількісного складу. Виходячи з даних про те, що екстракти, отримані з різних тканин, різняться за кількісним та якісним вмістом певних пептидів (Karelin A.A. et al., 1998), ми провели дослідження молекулярно-масового розподілу речовин в екстрактах мозку і печінки новонароджених (ЕМН, ЕПН) і 3-місячних щурів (ЕМ-3м, ЕП-3м), в екстрактах мозку ембріона (ЕМЕ), а також цілого ембріона щура (тотальний екстракт ембріона, ТЕЕ) методом гель-проникної хроматографії.

Результати дослідження показали, що ЕМ плодів і НЩ, а також ТЕЕ вміщують пептидні фракції з подібними молекулярними масами (м.м.) (рис. 6, 7). А саме, для них характерний найвищий відсотковий вміст пептидних фракцій, м.м. яких відповідають м.м. регуляторних пептидів ($44,0 \pm 4,0\%$, $50,0 \pm 3,2\%$ і $49,1 \pm 3,3\%$ фракцій з м.м. від 550 до 5000 Да відповідно), а також найменший вміст фракцій, м.м. яких відповідають м.м. білків ($42,1 \pm 3,0\%$, $42,7 \pm 2,7\%$ і $41,8 \pm 3,1\%$ фракцій з м.м. ≥ 12000 Да відповідно).

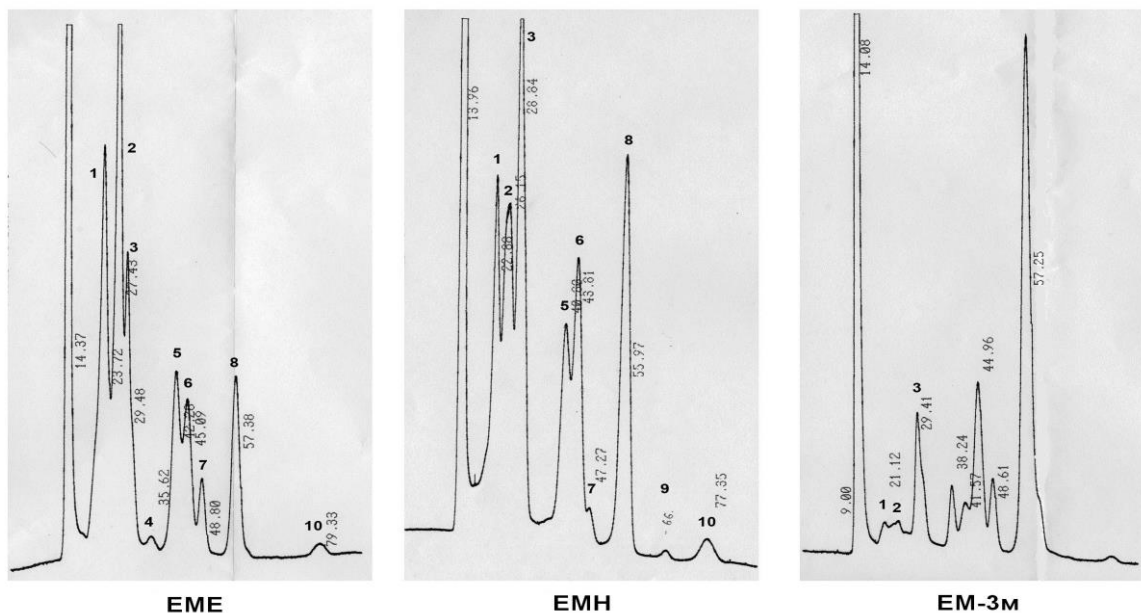


Рис. 6. Типові хроматограми екстрактів тканин мозку щурів (ЕМЕ – ембріонів; ЕМН – новонароджених; ЕМ-3м – 3-х місячних).

В протилежність цьому, екстракти печінки новонароджених і дорослих щурів характеризуються найменшим відносним вмістом пептидних фракцій ($35,7 \pm 2,0\%$ і $18,6 \pm 1,2\%$ відповідно) та найбільшим вмістом фракцій, м.м. яких відповідають білкам ($62,2 \pm 4,5\%$ і $75,8 \pm 5,0\%$ відповідно) (рис. 7).

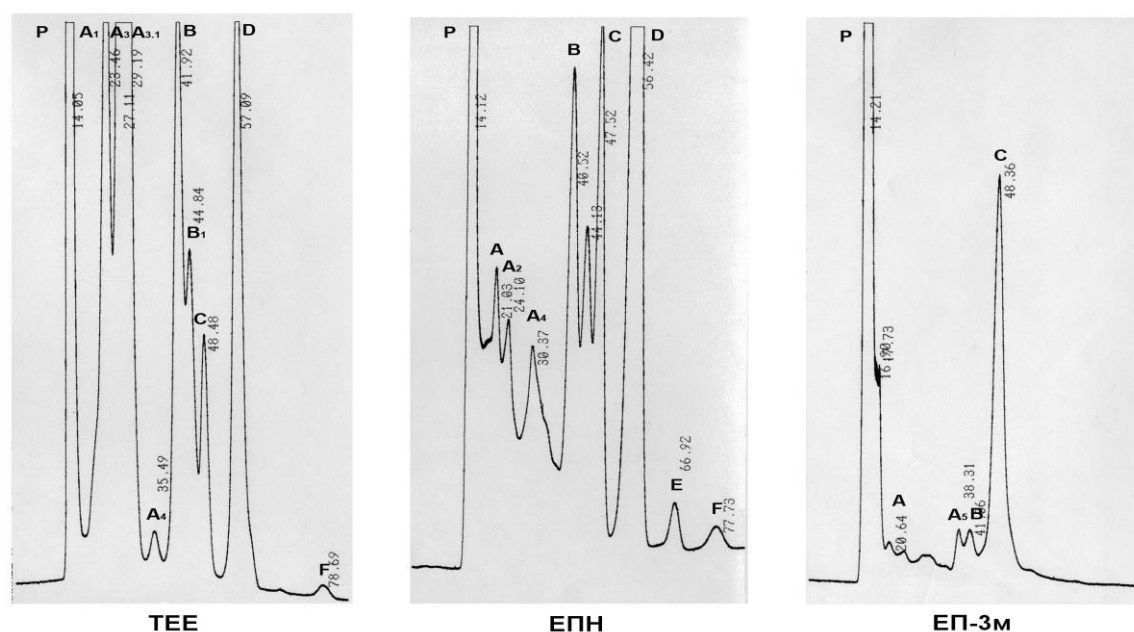


Рис. 7. Типові хроматограми екстрактів тканин печінки (ЕПН – новонароджених; ЕП-3м – 3-х місячних) і тотального екстракту ембріонів (ТЕЕ) щурів.

Отримані дані вказують на те, що пептидно-білковий спектр екстрактів залежить від стадії розвитку тварин і типу тканини, з якої був отриманий екстракт.

Гіпотермічне зберігання первинної суспензії нервових клітин новонароджених щурів. На першому етапі ми досліджували вплив ГЗ нервових клітин в DMEM/F-12 і СМР у присутності або за відсутності 10% СКДЦ на їхню наступну поведінку в культурі *in vitro*.

При ГЗ нервових клітин їхня збереженість інтенсивно знижувалася незалежно від середовища зберігання (рис. 8).

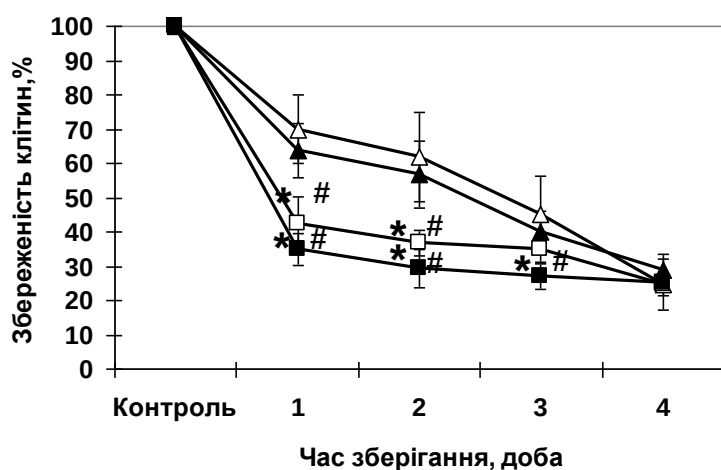


Рис. 8. Збереженість НК при ГЗ у різних середовищах.

Умовні позначення: Δ – DMEM/F-12, $\blacktriangle$ – DMEM/F-12 з СКДЦ, $\square$ – СМР, $\blacksquare$ – СМР з СКДЦ. * – відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 без СКДЦ, $p < 0,05$; # – відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 з СКДЦ, $p < 0,05$.

Найвищі показники збереженості клітин протягом перших 2 діб ГЗ спостерігалися в зразках, які знаходились в гіпотермічних умовах у DMEM/F-12 без

СКДЩ ($61,8 \pm 13,13\%$) і в DMEM/F12 з СКДЩ ($56,31 \pm 9,65\%$). Протягом часу спостереження показники збереженості клітин достовірно знижувалися незалежно від середовища зберігання і присутності в ньому СКДЩ, не відрізняючись між окремими групами ($24,52 \pm 7,5\% \div 28,7 \pm 4,9\%$).

Метаболічна активність нервових клітин в процесі ГЗ поступово знижувалася незалежно від середовища зберігання і присутності в ньому СКДЩ (рис. 9).

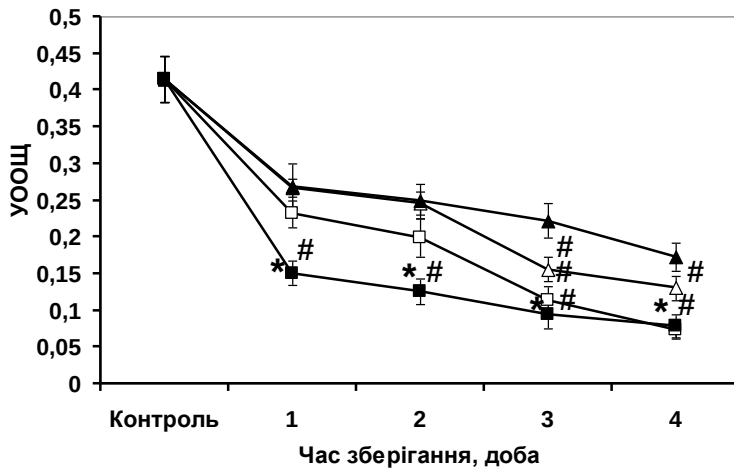


Рис. 9. Метаболічна активність НК за МТТ-тестом при ГЗ у різних середовищах.

Умовні позначення: Δ – DMEM/F-12; ▲ – DMEM/F-12 з СКДЩ; □ – СМР; ■ – СМР з СКДЩ. * – відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 без СКДЩ, $p < 0,05$; # – відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 з СКДЩ, $p < 0,05$.

На 4 добу зберігання нервових клітин у DMEM/F-12 без сироватки показники МТТ-теста знижувалися у 3,2 рази, а в присутності сироватки – у 2,4 рази у порівнянні з контролем. Після 4 діб зберігання нервових клітин у СМР, незалежно від присутності сироватки, інтенсивність утворення формазама зменшувалася у порівнянні зі свіжовиділеними клітинами у 5,5 разів.

Поміщення в умови культивування суспензій НК, які перенесли ГЗ, дозволило виявити відмінності в їх поведінці в залежності від середовища, в якому відбувалося зберігання. Якщо суспензії НК зберігали протягом 1 доби в СМР без сироватки або в DMEM/F-12, незалежно від присутності сироватки, то поведінка клітин практично не відрізнялася від поведінки свіжовиділених клітин, щільність моношару НК через 7 діб культивування складала $1422,0 \pm 156,0 \div 1458,0 \pm 153,0$ клітин на мм^2 , що достовірно не відрізнялось від значень відповідного показника у контролі. При цьому спостерігалися формування конфлюентного моношару та поява на моношарі β-тубулін III-позитивних клітин і колоній нестин/віментин-позитивних клітин. Якщо нервові клітини зберігались у СМР, збагаченому сироваткою, то вже після 1 доби ГЗ, в культурі вони були здатними утворювати лише дрібні рихлі агрегати, які при подальшому культивуванні не прикріплювалися до поверхні лунок.

Зберігання НК протягом 2 діб у DMEM/F-12 з сироваткою і в СМР без сироватки призводило до збільшення часу формування конфлюентного моношару, у порівнянні зі свіжовиділеними клітинами, на 2 і 4 доби відповідно. При цьому щільність моношару в культурах НК, які зберігали в СМР без сироватки, була у 1,4 рази меншою, ніж у контролі (рис. 10). При подальшому культивуванні НК, які зберігали протягом 2 діб у DMEM/F-12 з сироваткою і в СМР без сироватки, на моношарі з'являлися β-тубулін-III позитивні нейробластоподібні клітини і колонії нестин/віментин-позитивних клітин.

Після 2 діб зберігання НК в DMEM/F-12 без сироватки на поверхні лунок розпластувалася невелика кількість клітин, які формували окремі ділянки моношару (рис. 10), експресія β -тубуліна III, нестина та віментина не виявлялася.

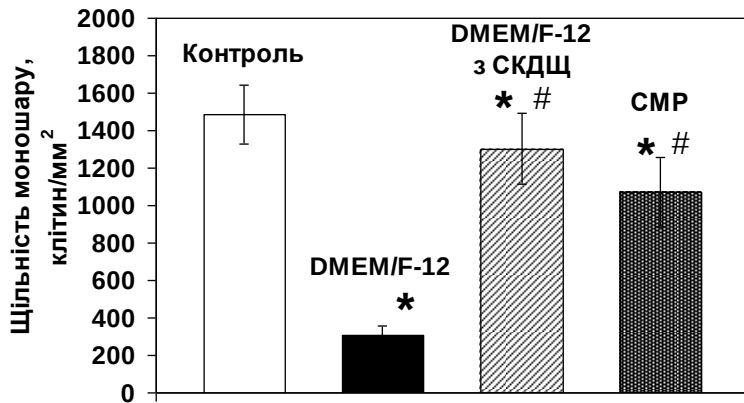


Рис. 10. Щільність моношару НК після 2 діб ГЗ у середовищах різного складу, 10 діб культивування.

Примітки: * – відмінності статистично достовірні відносно свіжевиділених НК, $p < 0,05$; # – відмінності статистично достовірні відносно середовища DMEM/F-12 без СКДЦ, $p < 0,05$.

При ГЗ нервових клітин протягом 3 і більше діб, незалежно від середовища зберігання, клітини втрачали здатність відновлювати свої властивості в умовах культивування.

Вплив екстрактів мозку і печінки неонатальних щурів на виживання нервових клітин новонароджених щурів у складі суспензії після гіпотермічного зберігання. Для оцінки впливу ЕМ та ЕП на ефективність зберігання НК в гіпотермічних умовах у середовищах DMEM/F-12 і СМР екстракти додавали в концентрації 0,3 мг білка/мл.

Присутність ЕМ або ЕП у СМР не впливала на характер змін показників збереженості та метаболічної активності НК в процесі ГЗ. А саме, після 4 діб ГЗ нервових клітин у СМР показники збереженості клітин, незалежно від присутності в ньому як ЕМ, так і ЕП, коливались у межах $24,62 \pm 6,8\% \div 26,23 \pm 5,4\%$. Метаболічна активність НК після 4 діб зберігання в СМР, незалежно від присутності екстрактів, знижувалася у порівнянні зі свіжовиділеними клітинами у 5,2–5,6 разів.

Присутність екстрактів у середовищі DMEM/F-12 негативно впливала на показники збереженості та метаболічної активності НК в процесі ГЗ (рис. 11).

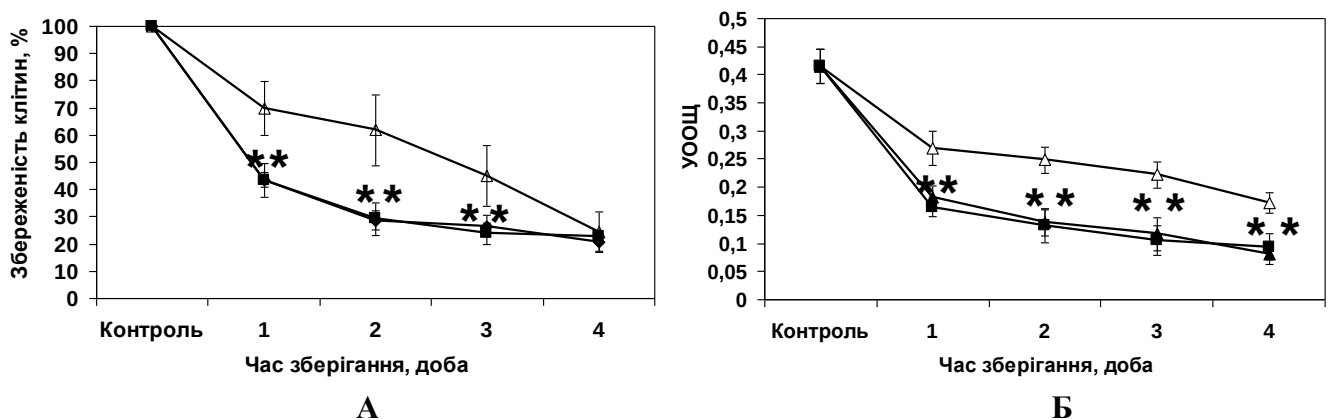


Рис. 11. Збереженість (А) і метаболічна активність (Б) нервових клітин новонароджених щурів при ГЗ у середовищі DMEM/F-12: Δ – у присутності СКДЦ; ▲ – у присутності ЕМ; ■ – у присутності ЕП. Примітка: * – відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 з СКДЦ, $p < 0,05$.

Незважаючи на негативну динаміку представлених вище показників, при перенесенні НК з умов гіпотермії в умови культивування не спостерігалось суттєвих змін у поведінці клітин, якщо строк зберігання у DMEM/F-12 з екстрактом мозку або печінки, і в СМР з екстрактом мозку не перевищував 2 діб. Клітини формували конфлюентний моношар, на якому з'являлися β -тубулін III-позитивні нейробластоподібні клітини і колонії нестин/віментин-позитивних клітин.

НК, які зберігали в присутності ЕП у СМР протягом 2 діб, в процесі культивування не прикріплювалися до поверхні лунок і моношар не формували.

Таким чином, отримані результати показали, що ЕМ і ЕП в концентрації 0,3 мг білка/мл, подібно сироватці, сприяють виживанню нервових клітин при ГЗ у середовищі DMEM/F-12. Але при зберіганні в СМР екстракт мозку має позитивний, а екстракт печінки – негативний вплив на виживання НК.

Гіпотермічне зберігання нервових клітин новонароджених щурів у складі агрегатів. Наведені вище результати ГЗ первинної суспензії НК новонароджених щурів свідчать про недостатньо високу збереженість морфофункціональних властивостей клітин за використаних умов. Міжклітинні контакти і взаємодії, як обов'язковий компонент нормального клітинного мікрооточення *in vivo*, відсутні у випадку зберігання суспензії ізольованих клітин. У зв'язку з цим видалось доцільним дослідити стан клітин при ГЗ у вигляді агрегатів, які формувались у короткостроковій культурі НК. В якості функціональних показників використали МТТ-тест та поведінку агрегатів НК в умовах культивування після ГЗ.

При ГЗ агрегатів НК спостерігалось поступове зниження метаболічної активності клітин за МТТ-тестом протягом усього часу зберігання, незалежно від середовища зберігання і присутності в ньому сироватки (рис. 12). Присутність у СМР сироватки призводила до різкого падіння інтенсивності формування формаза. Вже після однієї доби зберігання агрегатів цей показник був у 2,4 рази менше відносно початкових значень, а після 5 діб зберігання клітини агрегатів повністю втрачали здатність до перетворення МТТ в формазан.

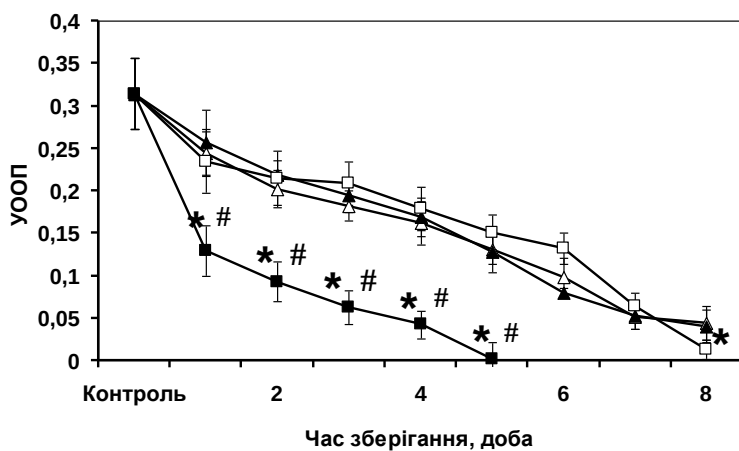


Рис. 12. Метаболічна активність клітин агрегатів при ГЗ у різних середовищах.

Умовні позначення: Δ – DMEM/F-12; $\blacktriangle$ – DMEM/F-12 з СКДЦ; $\square$ – СМР; $\blacksquare$ – СМР з СКДЦ. * – відмінності статистично достовірні відносно DMEM/F-12 у присутності та за відсутності СКДЦ, $p < 0,05$; # – відмінності статистично достовірні відносно СМР без СКДЦ, $p < 0,05$.

В культурі НК агрегатів, що зберігалися в СМР у присутності сироватки протягом лише 1 доби, не формували конфлюентний моношар. Кількість клітин, які

формували ділянки моношару, складала $610,0 \pm 58,0$ клітин на мм^2 , що у 2,5 рази менше відносно контролю (рис. 13). При подальшому культивуванні на моношарі з'являлися поодинокі нейробластоподібні клітини, кількість яких не збільшувалася.

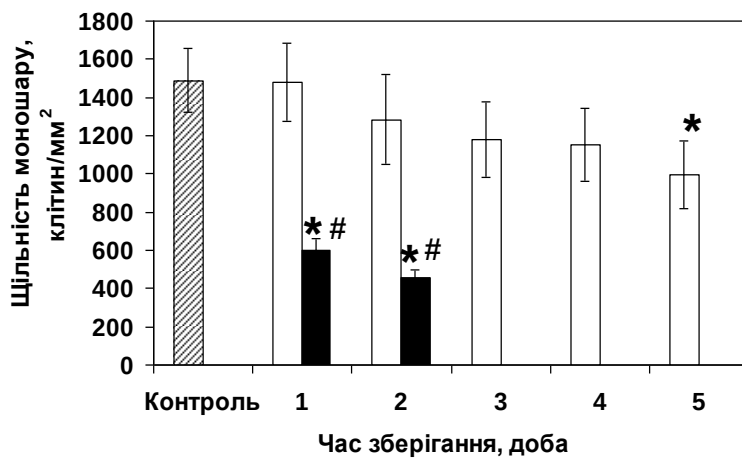


Рис. 13. Щільність моношару, утворюваного НК агрегатів після їх ГЗ у СМР, 10 діб культивування.

Умовні позначення: □ – без СКДЦ; ■ – у присутності СКДЦ. * – відмінності статистично достовірні відносно агрегатів свіжовиділених клітин, $p < 0,05$; # – відмінності статистично достовірні відносно клітин агрегатів після ГЗ у СМР без СКДЦ, $p < 0,05$.

Агрегати НК, що зберігалися в DMEM/F-12, незалежно від присутності сироватки, і у СМР без сироватки, при культивуванні були здатні прикріплюватися до поверхні лунок і формувати конфлюентний моношар, якщо строк їх зберігання не перевищував 5 діб. Щільність моношару, який формували клітини агрегатів в культурі після 4 діб ГЗ в DMEM/F-12 у присутності та у відсутності сироватки, і в СМР без сироватки, залишалася на рівні контролю, складаючи $1314,0 \pm 159,0$, $1269,0 \pm 174,0$ і $1151,0 \pm 192,0$ клітин на мм^2 відповідно (рис. 13, 14). У процесі подальшого культивування на моношарі з'являлися β -тубулін III-позитивні клітини і колонії нестин/віментин-позитивних клітин.

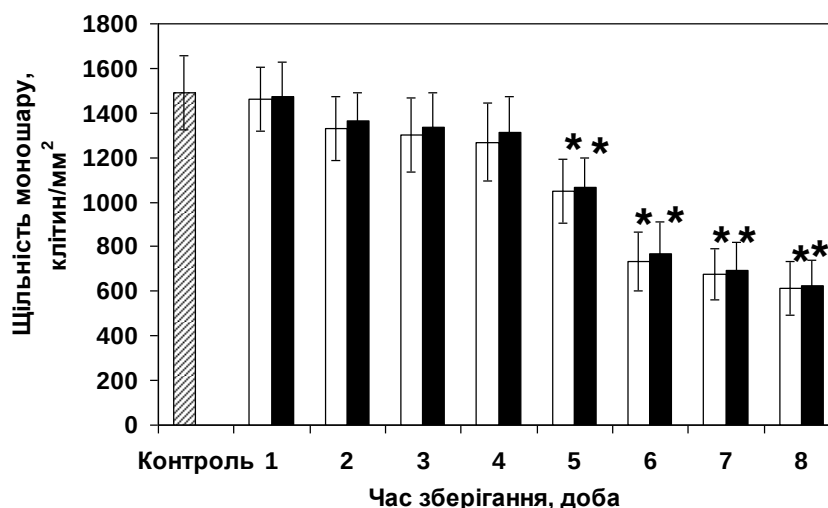


Рис. 14. Щільність моношару, утворюваного НК агрегатів після ГЗ у DMEM/F-12, 10 діб культивування: □ – без СКДЦ; ■ – у присутності СКДЦ. * – відмінності статистично достовірні відносно агрегатів свіжовиділених клітин, $p < 0,05$.

Таким чином, проведені дослідження показали, що ГЗ нервових клітин у складі агрегатів збільшує час зберігання при використанні як середовища DMEM/F-12, так і СМР, до 4 діб.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлено теоретичне узагальнення та нові експериментальні підходи для вирішення проблеми гіпотермічного зберігання нервових клітин головного мозку новонароджених щурів.

1. Уведення алогенної сироватки крові дорослих щурів у середовище культивування DMEM/F-12 забезпечує клітинам головного мозку новонароджених щурів умови більш повної реалізації їхніх властивостей порівняно з застосуванням фетальної сироватки телят, а саме: прискорює прикріплення утворених клітинних агрегатів на 2 доби, сприяє формуванню більш щільного моношару (в 1,4 рази), забезпечує більш ранню появу нейробластоподібних клітин, здатних до експресії β -тубуліна III (на 2–4 доби) та здатність до формування на моношарі колоній нестин- і віментин-позитивних клітин.

2. Додавання екстракту мозку неонатальних щурів у концентрації 0,3 мг білка/мл для збагачення середовища культивування клітин головного мозку новонароджених щурів прискорює формування конфлюентного моношару на 1–2 доби і появу на ньому клітин, що експресують β -тубулін III, а також колоній нестин- і віментин-позитивних клітин. Додавання екстракту печінки неонатальних щурів у концентрації 0,3 мг білка/мл пригнічує формування моношару і появу на ньому β -тубулін III-позитивних клітин та колоній нестин- і віментин-позитивних клітин.

3. Екстракти тканин мозку і печінки щурів різного віку містять речовини пептидної та білкової природи з молекулярною масою $550 \div 12000$ Да. Із збільшенням віку тварин в екстрактах зростає кількість білків і зменшується кількість пептидів. Екстракти печінки, незалежно від віку щурів, характеризуються більшим вмістом білкових фракцій.

4. При гіпотермічному зберіганні первинної суспензії клітин головного мозку новонароджених щурів у середовищі DMEM/F-12 або в сахарозомісткому розчині, незалежно від присутності сироватки крові, спостерігається поступове зниження показників збереженості та метаболічної активності клітин. При цьому гіпотермічне зберігання до 2 діб у середовищі DMEM/F-12 у присутності сироватки крові або в сахарозомісткому розчині без сироватки не призводить до змін поведінки клітин при культивуванні у порівнянні з культурою свіжовиділених клітин головного мозку, а саме: відбувається формування багатоклітинних агрегатів, прикріплення їх до підложки, міграція клітин і формування моношару, на якому виявляються β -тубулін III-позитивні клітини і колонії нестин- і віментин-позитивних клітин.

5. Додавання екстрактів мозку або печінки неонатальних щурів у концентрації 0,3 мг білка/мл до середовища DMEM/F-12 при гіпотермічному зберіганні первинної суспензії клітин головного мозку новонароджених щурів забезпечує збереження диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин протягом 2 діб.

6. Гіпотермічне зберігання клітин головного мозку новонароджених щурів у вигляді багатоклітинних агрегатів у середовищі DMEM/F-12, незалежно від присутності сироватки крові, або в сахарозомісткому розчині без сироватки подовжує час ефективного збереження диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин до 4 діб.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сукач А.Н. Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре / А.Н. Сукач, Т.Д. Ляшенко, М.В. Шевченко // *Biotechnologia acta*. – 2013. – Vol. 6, N3. – P. 63–68.
2. Sukach A.N. Comparative study on influence of fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural cells / A.N. Sukach, M.V. Shevchenko, T.D. Liashenko // *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, N5. – P. 394–399.
3. Шевченко М.В. Влияние гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре / М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // *Проблемы криобиологии*. – 2012. – Т. 22, № 4. – С. 423–432.
4. Шевченко М.В. Влияние экстрактов нервной ткани и печени на эффективность гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс / М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // *Проблемы криобиологии*. – 2015. – Т. 25, № 1. – С. 13–23.
5. Шевченко М.В. Молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах тканей крыс в зависимости от стадии их развития / М.В. Шевченко, А.Н. Сукач, А.Ю. Семенченко // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2013. – Вип. 3. – Т. 2. – С. 103–107.
6. Шевченко М.В. Особенности влияния экстрактов печени и нервной ткани новорожденных крыс на культивирование постнатальных нервных клеток / М.В. Шевченко // *Материалы конференции молодых ученых ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине»*. – Харьков, 2010. – С. 46.
7. Шевченко М.В. Гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс в составе агрегатов / М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии»*, июнь 2015 г.: тезисы докладов. – Иркутск, 2015. – С. 279–286.
8. Шевченко М.В. Особенности действия экстрактов ткани мозга и печени на нервные клетки новорожденных крыс, культивируемые *in vitro* / М.В. Шевченко // *Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*. – Харків, 2011. – С. 118.
9. Шевченко М.В. Чувствительность фетальных и неонатальных клеток крыс к гипотермическому хранению / М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // *Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 40-летию ИПКиК НАН Украины «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины»*. – *Проблемы криобиологии*. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 343.
10. Шевченко М.В. Гипотермическое хранение изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава / М.В. Шевченко // *Материалы конференции молодых ученых ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине»*. – Харьков, 2012. – С. 21.
11. Сукач О.М. Гіпотермічне зберігання ізольованих нервових клітин щурів / О.М. Сукач, М.В. Шевченко, О.В. Оченашко, О.С. Лебединський // 4-й з'їзд

- Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом. – Ужгород, 2014. – С. 105.
12. Сукач А.Н. Роль формирования многоклеточных агрегатов в выживании изолированных нервных клеток крыс / А.Н. Сукач, М.В. Шевченко, Т.Д. Ляшенко // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє». – Київ, 2014. – С. 36.
 13. Шевченко М.В. Влияние экстрактов тканей мозга и печени на гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс / М.В. Шевченко // Материалы конференции молодых ученых ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине». – Харьков, 2013. – С. 31.
 14. Ляшенко Т.Д. Сравнительная характеристика суспензии нервных клеток, полученных из мозга плодов и новорожденных крыс / Т.Д. Ляшенко, М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи». – Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16, додаток. – С. 115–116.
 15. Шевченко М.В. Экстракт печени оказывает угнетающее действие на нервные клетки новорожденных крыс, культивируемые *in vitro* / М.В. Шевченко // Материалы конференции молодых ученых ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине». – Харьков, 2011. – С. 35.
 16. Шевченко М.В. Изолированные клетки нервной ткани новорожденных крыс как модель постнатального мозга / М.В. Шевченко, Т.Д. Ляшенко, А.Н. Сукач // Науково-практична конференція з міжнародною участю «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неопатології та дитячій неврології». – Київ, 2013. – С. 26.
 17. Сукач А.Н. Многоклеточные агрегаты изолированных нервных клеток как 3D-микромодель нервной ткани / А.Н. Сукач, Т.Д. Ляшенко, М.В. Шевченко // Материалы VI всероссийского съезда трансплантологов, сентябрь 2012, Москва. – Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т. 14, приложение. – С. 290.

АНОТАЦІЯ

Шевченко М.В. Вплив гіпотермічного зберігання на поведінку ізолюваних нервових клітин новонароджених щурів при культивуванні. – На правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2015.

Дисертація присвячена вивченню впливу гіпотермічного зберігання на поведінку ізолюваних нервових клітин новонароджених щурів у культурі в залежності від клітинного мікрооточення і складу середовища зберігання.

В роботі показано, що при культивуванні клітин, отриманих з тканини головного мозку новонароджених щурів, у середовищі, що містить 10% сироватки крові дорослих щурів, спостерігається утворення багатоклітинних агрегатів, які прикріплюються до поверхні лунок, після чого відбувається формування моношару. На моношарі з'являються β -тубулін III-позитивні клітини і колонії нестин/віментин-позитивних клітин. Ці властивості зберігаються після 2 діб гіпотермічного

зберігання суспензії нервових клітин новонароджених щурів у середовищі DMEM/F-12 у присутності сироватки крові і в сахарозомісткому розчині без сироватки, а також після 4 діб зберігання нервових клітин у вигляді агрегатів у середовищі DMEM/F-12, незалежно від присутності сироватки крові, і в сахарозомісткому розчині без сироватки. Додавання екстракту мозку або екстракту печінки в концентрації 0,3 мг білка/мл до середовища DMEM/F-12 дозволяє ефективно замінити сироватку крові протягом 2 діб гіпотермічного зберігання суспензії нервових клітин новонароджених щурів.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, нервові клітини, екстракти тканин мозку і печінки, багатоклітинні агрегати.

АННОТАЦИЯ

Шевченко М.В. Влияние гипотермического хранения на поведение изолированных нервных клеток новорожденных крыс при культивировании. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины, Харьков, 2015.

Диссертация посвящена изучению влияния гипотермического хранения (ГХ) на поведение изолированных нервных клеток (НК) новорожденных крыс в культуре в зависимости от клеточного микроокружения и состава среды хранения.

Для нормального функционирования клеток важным является их микроокружение, включающее в себя регуляторные и ростовые факторы, молекулы адгезии и внеклеточного матрикса. При изоляции клеток происходит частичная утрата компонентов их микроокружения, что может приводить к повреждению клеток и их гибели, особенно в процессе хранения. Многие из факторов микроокружения, включая энергетические субстраты, факторы роста, цитокины и гормоны, содержатся в сыворотке крови и экстрактах тканей животных и человека (Ямсков И.А. и др., 2001; Vorisenko A.V. et al., 2007), добавка которых к средам для ГХ может способствовать повышению эффективности хранения изолированных НК в гипотермических условиях. Также для выживания НК важным является восстановление пространственно-функциональной организации клеточного микроокружения, что происходит при формировании агрегатов (Lu H. et al., 2012).

В работе установлены роль формирования клеточных агрегатов, как условия обеспечения межклеточных взаимодействий, а также значение присутствия в средах культивирования и гипотермического хранения растворимых факторов микроокружения (сыворотки и экстракты) для сохранения морфофункциональных характеристик дифференцированных, прогениторных и стволовых нейральных клеток головного мозга новорожденных крыс при культивировании и ГХ.

Показано, что при культивировании НК в среде, содержащей 10% сыворотки крови взрослых крыс (СКБК), происходит образование многоклеточных агрегатов, которые прикрепляются к поверхности лунок, после чего происходит формирование монослоя, представленного GFAP положительными глиальными и β -тубулин III-положительными нейроноподобными клетками. На монослое появляются β -тубулин III-положительные нейробластоподобные клетки и колонии недифференцированных

нестин/виментин-положительных клеток. В присутствии фетальной сыворотки телят колонии нестин/виментин-положительных клеток в культуре не выявляются.

Установлено, что присутствие в среде культивирования НК экстракта мозга в концентрации 0,3 мг белка/мл способствует увеличению скорости формирования конфлюэнтного монослоя, появлению на нем β -тубулин III-положительных нейробластоподобных клеток и колоний нестин/виментин-положительных клеток. В присутствии ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл клетки утрачивают способность к формированию конфлюэнтного монослоя, в культуре не выявляются нейробластоподобные клетки и колонии нестин/виментин-положительных клеток.

Показано, что среда DMEM/F-12 в присутствии СКВК и сахарозо-содержащий раствор без СКВК обеспечивают сохранение популяций дифференцированных НК, а также нейральных стволовых и прогениторных клеток на протяжении 2 суток в условиях гипотермии. Добавление экстрактов тканей мозга или печени в концентрации 0,3 мг белка/мл в DMEM/F-12 позволяет эффективно заменять сыворотку крови на протяжении 2 суток ГХ нервных клеток. ГХ нервных клеток в виде агрегатов увеличивает время хранения до 4 суток. НК сохраняют способность в условиях культуры формировать конфлюэнтный монослой, на котором появляются β -тубулин III-положительные нейробластоподобные клетки и колонии нестин/виментин-положительных клеток. При этом сохраняется структурно-функциональное состояние дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток на уровне свежесыводенных без использования сыворотки.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, нервные клетки, экстракты тканей мозга и печени, многоклеточные агрегаты.

ANNOTATION

Shevchenko M.V. The influence of hypothermic storage on the behavior of isolated neural cells of new-born rats during the culturing. – A manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2015.

The thesis is devoted to the study of the influence of hypothermic storage on the behavior of isolated neural cells of new-born rats during the culturing depending on the cellular microenvironment and composition of the storage media.

It is shown that the formation of multicellular aggregates and monolayer, and the emergence of cells expressing β -tubulin III as well as nestin/vimentin positive cell colonies are observed, when cells obtained from the newborn rats' brain tissue are cultured in a medium containing 10% adult rat serum. These properties are maintained after 2 days of hypothermic storage of neural cells' suspension in medium DMEM/F-12 in the presence of serum or in sucrose-containing solution without serum, and after 4 days of hypothermic storage of neural cells in the form of aggregates in DMEM/F-12, regardless of the presence of serum, or in sucrose-containing solution without serum. Adding of the brain or liver extract in concentration 0,3 mg of protein/ml to DMEM/F-12 can effectively replace serum during 2 days of hypothermic storage of neural cells' suspension.

Key words: hypothermic storage, neural cells, brain and liver extracts, multicellular aggregates.

Відповідальний за випуск д.б.н., проф. Г.О. Бабійчук

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,9. Тир. 100 прим. Зам. 374-15.

Підписано до друку 13.10.15. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.

61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп. 1, к. 19. Т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30

Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру

видавців та виготовників виробничої продукції серія ДК 3587 від 23.09.09 р.