НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ШЕВЧЕНКО МАРИЯ ВЛАДИМИРОВНА

УДК: 57.043:611-018.8.085.2

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ НА ПОВЕДЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

03.00.19 – криобиология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Сукач Александр Николаевич

Харьков – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ……...…….…..….. 5
ВВЕДЕНИЕ……..….... 6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…….……..…….… 13
1.1. Характеристика и потенциальное использование нейральных стволовых клеток…….……..…… 13
1.1.1. Фетальные нейральные стволовые клетки …… 14
1.1.2. Постнатальные нейральные стволовые клетки…….. 16
1.1.3. Потенциальное использование нейральных стволовых клеток…….... 19
1.2. Поведение нервных клеток в культуре *in vitro* …….……..... 21
1.3. Роль микроокружения в регуляции функционирования нейральных стволовых клеток……..…….…….…..... 24
1.4. Влияние гипотермических условий хранения на структурно-метаболические характеристики клеток и тканей…..... 27
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ…….…… 33
2.1. Получение суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс……..…… 33
2.2. Культура клеток головного мозга новорожденных крыс…….……..... 33
2.3. Получение сыворотки крови взрослых крыс……..... 34
2.4. Иммуноцитохимический анализ культуры клеток головного мозга новорожденных крыс……..... 34
2.5. Получение агрегатов нервных клеток головного мозга новорожденных крыс…….……..... 35
2.6. Подсчет концентрации клеток в агрегатах……....…… 35
2.7. Оценка размеров агрегатов нервных клеток……..……..……. 35
2.8. Оценка скорости формирования монослоя…… 35
2.9. Количественный микроскопический анализ……..…..... 36

2.10. Гипотермическое хранение суспензии и агрегатов нервных клеток новорожденных крыс……..……...……..….. 36
2.11. МТТ-метод определения метаболической активности нервных клеток новорожденных крыс……...…….. 36
2.11.1. Спектрофотометрический метод определения формазана……. 36
2.11.2. Оценка метаболической активности клеток агрегатов по интенсивности окрашивания формазаном…..…….…….. 38
2.12. Определение жизнеспособности нервных клеток по окрашиванию пропидиум йодидом……..……...…… 38
2.13. Метод получения экстрактов из тканей крыс различного возраста…….…... 38
2.14. Определение содержания белка в экстрактах тканей мозга и печени новорожденных крыс…….. 39
2.15. Определение молекулярно-массового распределения пептидов и белков в экстрактах тканей мозга и печени крыс различного возраста…..... 39
2.16. Световая микроскопия…….…….……..……..... 40
2.17. Статистическая обработка результатов…….……... 40
2.18. Биоэтические протоколы…….……..... 40
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ……...…… 41
3.1. Влияние фетальной сыворотки телят и сыворотки крови взрослых крыс при культивировании нервных клеток новорожденных крыс.…..... 41
3.2. Влияние экстрактов мозга и печени неонатальных крыс на поведение нервных клеток новорожденных крыс в культуре……....… 54
3.2.1. Молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах тканей крыс в зависимости от стадии их развития……..…… 55
3.2.2. Культивирование нервных клеток головного мозга новорожденных крыс в присутствии экстрактов мозга и печени неонатальных крыс…… 59
3.3. Гипотермическое хранение первичной суспензии нервных клеток новорожденных крыс…….……. 69

3.3.1. Гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс в составе суспензии ……..…….…. 69
3.3.2. Влияние экстрактов мозга и печени неонатальных крыс на выживаемость нервных клеток новорожденных крыс в составе суспензии после гипотермического хранения ……...…… 86
3.4. Гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс в составе агрегатов…….……..…….. 101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……... 119
ВЫВОДЫ……. 128
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ……..……. 130

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГХ – гипотермическое хранение

МТТ – метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид

НК – нервная клетка

НСК – нейральная стволовая клетка

ПК – прогениторная клетка

РГ – радиальная глия

СВЗ – субвентрикулярная зона

СК – стволовая клетка

СКВК – сыворотка крови взрослых крыс

СГЗ – субгранулярная зона

СК – стволовая клетка

ССР – сахарозо-содержащий раствор

ФСТ – фетальная сыворотка телят (сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота)

ЦНС – центральная нервная система

ЭМ – экстракт мозга

ЭП – экстракт печени

ЭСК – эмбриональная стволовая клетка

GFAP – glial fibrillary acidic protein – глиальный кислый фибриллярный белок

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Исследование нейральных стволовых и прогениторных клеток имеет большое значение для выяснения особенностей развития нервной системы человека и животных. В настоящее время развитие нервной системы в процессе эмбриогенеза изучено достаточно хорошо. При этом поведение нейральных предшественников в процессе нейро- и глиогенеза в постнатальном и взрослом мозге во многом остается не ясным. В качестве модели для изучения постнатального нейрогенеза, глиогенеза и их взаимосвязи, развития апоптоза, механизмов дифференцировки стволовых (СК) и прогениторных (ПК) клеток могут использоваться культуры клеток, выделенные из тканей головного мозга новорожденных животных [20, 172]. Важным при этом является изучение влияния клеточного микроокружения на функционирование нейральных СК и ПК. Известно, что формирование тканей мозга в неонатальном возрасте характеризуется активной пролиферацией, миграцией и дифференцировкой СК и ПК. Данные процессы происходят при непосредственном участии клеточного микроокружения, в состав которого входят поддерживающие клетки стволовой ниши, факторы роста, молекулы адгезии и межклеточного матрикса [71]. В культуре пространственно-функциональная организация клеточного микроокружения восстанавливается при формировании клетками трехмерных структур, а именно агрегатов и сфероидов [62, 65, 147]. Межклеточные взаимодействия, специфическая гистологическая и трехмерная тканеспецифическая архитектура, механические и биохимические сигналы, которые образуются в данных структурах, являются необходимыми для выживания, пролиферации и дифференцировки СК и ПК [85], что обуславливает актуальность исследования влияния факторов микроокружения и формирования нервными клетками (НК) агрегатов на их последующее выживание и функционирование в культуре *in vitro*.

Использование клеток в медико-биологических исследованиях предполагает разработку эффективных методов их хранения. Как правило, для

этого клетки замораживают до температуры жидкого азота [2, 8], однако для краткосрочного хранения более целесообразным является использование низких положительных температур [101]. Изучение влияния гипотермии на НК новорожденных представляет также интерес для медицины. Известно, что гипотермия является перспективным методом уменьшения воспаления и активации восстановительных процессов в нервных тканях, поврежденных вследствие гипоксии и травм у новорожденных [221]. Однако механизм нейропротекторного действия гипотермии, а также отдаленные последствия ее действия на клетки нервной ткани новорожденных остаются не изученными. Изолированные НК новорожденных можно использовать в качестве модели для изучения влияния гипотермии на клетки нервной ткани *in vitro*, что позволит выяснить механизмы влияния околонулевых температур как на СК и ПК, так и нейрональные и глиальные клетки, а также установить возможность возникновения побочных эффектов гипотермического воздействия и разработать подходы для их устранения. Исходя из вышесказанного, актуальной является разработка протоколов получения, культивирования и хранения НК новорожденных крыс.

Связь с научными программами, планами, темами.

Диссертация выполнена в отделе криобиохимии Института проблем криобиологии и криомедицины (ИПКиК) НАН Украины в рамках научно-исследовательских тем: «Вивчення дії низьких температур на властивості стовбурових клітин та клітин-попередників в умовах експериментальної трансплантації та культивування» (шифр 2.2.6.34, номер государственной регистрации 0107U000538) и «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 государственной регистрации 0112U003132).

Цель и задачи исследования. Цель работы – определение влияния гипотермического хранения на состояние и поведение в культуре нервных клеток головного мозга новорожденных крыс в зависимости от условий микроокружения.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние фетальной сыворотки телят и сыворотки крови взрослых крыс на выживание и поведение в культуре дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток головного мозга новорожденных крыс.

2. Исследовать особенности действия экстрактов тканей мозга и печени неонатальных крыс на поведение нейральных стволовых/прогениторных клеток головного мозга новорожденных крыс в условиях культуры *in vitro*.

3. Определить молекулярно-массовое распределение веществ пептидно-белковой природы в экстрактах тканей мозга и печени крыс различного возраста.

4. Провести оценку эффективности гипотермического хранения дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток головного мозга новорожденных крыс в DMEM/F-12 и в сахарозо-содержащем растворе.

5. Изучить влияние экстрактов тканей мозга и печени неонатальных крыс на эффективность гипотермического хранения суспензии нервных клеток головного мозга новорожденных крыс.

6. Выяснить роль формирования многоклеточных агрегатов на эффективность гипотермического хранения дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток головного мозга новорожденных крыс.

Объект исследования – влияние условий культивирования и гипотермического хранения на морфофункциональные свойства культуры клеток головного мозга новорожденных крыс.

Предмет исследования – культура нервных клеток новорожденных крыс, полученная из ткани головного мозга, до и после гипотермического хранения.

Методы исследования. Материалом исследования служили суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс, свежевыделенных и хранившихся в гипотермических условиях при температуре +4 °С.

Для решения поставленных задач были использованы следующие методы: культивирование, иммуноцитохимия, спектрофотометрия, гель-проникающая хроматография, световая и флуоресцентная микроскопия, морфометрический анализ, методы статистического анализа.

Научная новизна полученных результатов. В работе впервые проведены сравнительные исследования влияния сред внутриклеточного (сахарозо-содержащий раствор (ССР) [19] и внеклеточного типа (DMEM/F-12) на эффективность гипотермического хранения (ГХ) НК, а также влияния сыворотки крови и экстрактов тканей мозга (ЭМ) и печени (ЭП) на особенности поведения НК новорожденных крыс в культуре *in vitro*.

Показано, что среда DMEM/F-12 в присутствии 10% сыворотки крови взрослых крыс (СКВК) и ССР без сыворотки обеспечивают сохранение дифференцированных НК, а также нейральных стволовых и прогениторных клеток на протяжении 2 суток в условиях гипотермии.

В работе получены оригинальные данные о том, что ГХ нервных клеток в виде агрегатов позволяет увеличить время хранения клеток до 4 суток. Показано, что НК при ГХ в виде агрегатов в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия СКВК, и в ССР без сыворотки сохраняют способность формировать монослой, на котором появляются β-тубулин III-положительные нейробласты и колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток.

Установлены минимальные эффективные концентрации ЭМ и ЭП, при которых проявляется их влияние на НК в условиях культуры *in vitro*. Показано, что добавление ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл в среду культивирования НК ускоряет формирование монослоя и появление на нем β-тубулин III-

положительных нейробластов и колоний недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток. Присутствие ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл в среде культивирования НК оказывает отрицательное влияние на формирование монослоя и появление на нем клеток, экспрессирующих β-тубулин III, а также колоний нестин/виментин-положительных клеток.

Было впервые выявлено, что добавление ЭМ или ЭП в среду хранения DMEM/F-12 позволяет эффективно заменять сыворотку крови на протяжении 2 суток ГХ нервных клеток новорожденных крыс.

Практическое значение полученных результатов. Результаты, представленные в работе, свидетельствуют о том, что для эффективного хранения суспензии НК новорожденных крыс в гипотермических условиях на протяжении 2 суток может быть использована среда DMEM/F-12, обогащенная 10% СКВК, или ССР без добавок.

В работе получены данные о том, что ГХ нервных клеток в составе агрегатов увеличивает срок хранения дифференцированных, ПК и СК, по сравнению с суспензией, до 4 суток. При этом присутствие сыворотки крови в среде хранения не влияет на выживание клеток в составе агрегатов, что позволяет избежать ее отрицательного действия как в процессе хранения клеток, так и в случае их возможного последующего экспериментального или клинического использования.

Проведенные исследования могут служить основанием для создания эффективных консервирующих растворов для ГХ изолированных НК, а также для выяснения механизмов повреждения изолированных НК головного мозга в условиях холодовой гипоксии.

Результаты данной работы могут быть использованы для создания протоколов культивирования и ГХ нервных клеток.

Сведения о молекулярно-массовом распределении веществ пептидной и белковой природы в экстрактах можно использовать при изучении механизмов действия экстрактов тканей.

Индивидуальный вклад диссертанта. Автором диссертационной работы самостоятельно проведен анализ литературных данных по теме исследования. При консультативной помощи научного руководителя соискателем определены цель и задачи работы, а также пути их решения. Автором лично получены результаты экспериментальных исследований, проведен первичный анализ данных и их статистическая обработка. Автором лично обработаны экспериментальные данные и сделаны предварительные выводы. Автором совместно с научным руководителем были интерпретированы результаты и сделаны окончательные выводы. Вынесенные для защиты положения и экспериментальные данные получены при непосредственном участии автора диссертационной работы.

Апробация результатов диссертационной работы. Научные результаты, представленные в диссертации, докладывались и обсуждались на научно-практической конференции с международным участием «Генетическая и регенеративная медицина: проблемы и перспективы» (г. Киев, 2010), на конференциях молодых ученых «Холод в биологии и медицине» (г. Харьков, 2010, 2011, 2012, 2013), на VI Международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (г. Харьков, 2011), на научной конференции, посвященной 40-летию ИПКиК НАН Украины «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (г. Харьков, 2012), на VI Всероссийском съезде трансплантологов (г. Москва, 2012), на научно-практической конференции с международным участием «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неопатології та дитячій неврології» (г. Киев, 2013), на IV съезде Украинского общества клеточной биологии с международным участием (г. Ужгород, 2014), на научно-практической конференции с международным участием «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє» (г. Киев, 2014), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» (г. Иркутск, 2015).

Публикации. Результаты диссертационной работы изложены в 17 печатных работах, из них: 5 статей в научных специализированных изданиях, 12 – в сборниках тезисов научных работ и докладов на научных конференциях.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, раздела, посвященного описанию материалов и методов исследования, раздела с результатами собственных исследований и их обсуждением, заключения, выводов и списка использованной литературы. Диссертация изложена на 154 страницах, иллюстрирована 9 таблицами и 50 рисунками (из них – 25 фотографий). Список использованных литературных источников включает 224 наименования (в том числе 172 зарубежных), изложен на 25 страницах.

РАЗДЕЛ 1
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика и потенциальное использование нейральных стволовых клеток

Стволовыми принято считать клетки (СК), которые обладают такими основными характеристиками, как способность к самовозобновлению и дифференцировке более чем в один клеточный тип [56]. Данные клетки должны обладать высоким пролиферативным потенциалом, т.е. образовывать бесконечное число клеток, а также свойством к самообновлению на протяжении всей жизни организма [103]. Самовозобновление СК определяется как способность клеток в процессе деления производить идентичные дочерние элементы, т.е. давать начало клеткам, обладающим аналогичными, по отношению к родительской, цитохимическими и молекулярными характеристиками, а также дифференцировочным и пролиферативным потенциалом [72]. Дифференцировка в различные функциональные типы клеток определяется как мультипотентность. В общем понимании потентность СК, как способность к генерации различных типов клеток, можно качественно охарактеризовать следующими четырьмя уровнями. Тотипотентность – воспроизведение всех клеток и тканей, которые составляют эмбрион, а также тканей внезародышевых оболочек (зигота и бластомеры на стадии морулы). Плюрипотентность – образование различных типов соматических клеток организма (СК внутренней клеточной массы бластоцисты и СК эмбриональной карциномы). Мультипотентность – способность генерировать определенные локальные типы клеток в пределах данной ткани или органа (гепомоэтические и мезенхимальные СК, дающие начало всем линиям клеток крови и соединительно-тканной основы организма). Унипотентность – воспроизведение определенного однородного типа клеток. К данным клеткам относят клетки нормальной ткани, обладающей высокой митотической активностью, не способные к самовозобновлению, и условно разделяют на прогениторные и

прекурсорные. Прогениторные клетки (ПК) являются промежуточными между мультипотентными стволовыми и дифференцированными клетками. Прекурсор – это клетка-предшественница определенного типа, характеризующаяся высокой митотической активностью, и дающая начало определенному виду дифференцированных клеток ткани [145]. В пределах нервной ткани к данным клеткам можно отнести нейробласты.

Нейральные стволовые клетки (НСК) определяются как мультипотентные СК нервной ткани с неограниченным пролиферативным потенциалом, способные к самовозобновлению и генерации мультипотентных потомков, которые впоследствии дают начало трем основным ветвям нейральной дифференцировки: нейронам, астроцитам и олигодендроцитам [81].

1.1.1. Фетальные нейральные стволовые клетки.

Во время эмбрионального развития клетки нервной ткани характеризуются неоднородностью в отношении генетической экспрессии. Уже на стадии однослойного нейроэпителия происходит функциональное обособление клеток, которые сохраняют способность к самовозобновлению, таким образом, являясь стволовыми. Несмотря на высокую пролиферативную активность остальных нейроэпителиальных клеток, со временем их способность к самовозобновлению уменьшается, происходит постепенная дифференцировка клеток или снижение их потентности до уровня ПК [92]. Т.е. количество НСК по отношению к общему числу нейроэпителиальных клеток во время эмбриогенеза постепенно уменьшается.

Нейроэпителиальные клетки дают начало клеткам радиальной глии (РГ), которые, в свою очередь, дифференцируются в ПК, образующие далее два постмитотических нейрона [161]. При этом как нейроэпителиальные клетки, так и клетки РГ, могут непосредственно продуцировать нейроны [113]. Клетки РГ играют важную роль в нейрональной миграции, построении слоёв коры мозга и мозжечка, являясь клетками-предшественниками в процессе нейрогенеза [186]. Они характеризуются многими отличительными признаками

НСК, в частности, по таким молекулярным маркерам, как BLBP, RC2, GLAST и Pax6 [111, 168]. Так, показано, что клетки РГ представляют собой покоящиеся НСК, дающие начало нейронам в обонятельной луковице и гиппокампе, а также олигодендроцитам в мозолистом теле [54, 202]. Некоторые глиальные популяции (Мюллерова глия в сетчатке, таниците в гипоталамусе, Бергмановская глия в мозжечке) сохраняют радиальную морфологию, а также иммунологические и биохимические свойства, присущие РГ, в постнатальном периоде [187]. Первоначально предполагалось, что клетки РГ, которые на ранних этапах онтогенеза представляют собой субстрат для миграции дифференцирующихся НК, затем становятся нейронами. Однако последующие исследования показали, что популяция клеток РГ является гетерогенной. Часть клеток содержит нейральные маркеры, а именно белок промежуточных филаментов цитоскелета нестин [112]. Данные клетки впоследствии становятся нервными. Другая часть клеток содержит кислый фибриллярный белок (GFAP), являющийся маркером глиальных клеток, т.е. являются предшественниками глии. Таким образом, клетки РГ детерминированы к развитию в различных направлениях.

Во время эмбрионального развития ЦНС характеризуется высоким процентным содержанием СК, которые располагаются в определенных областях в составе клеточных пулов. Так, высокое содержание НСК выявлено в области нервной трубки и нервного гребня крыс, а также в нейроэпителии телэнцефалического пузыря мыши [116]. В процессе развития ЦНС как НСК, так и их прямые потомки, могут изменять широту нейрогенного потенциала под влиянием сигналов, которые поступают в клетку извне: *in situ* – из тканевого микроокружения, *in vitro* – при использовании факторов различного происхождения. Для НК млекопитающих показана зависимость повторного вступления в клеточный цикл от внеклеточных сигналов, к которым относятся митогенные стимулы (факторы роста FGF и EGF, тромбин, сыворотка) и факторы дифференцировки (цитокины, стрессорные влияния на клетку). Микроокружение, которое анатомически окружает НСК и функционально

определяет их развитие *in vivo*, называется нишей. С точки зрения морфологии клеток микроокружение НСК является гомогенным [180]. Так, в субвентрикулярной зоне (СВЗ) оно состоит из характерных биполярных клеток, называемых нейроэпителиальными, один из отростков которых контактирует с желудочком, а другой – с пиальной поверхностью нервной ткани. Данные биполярные клетки образуют вентрикулярную область. Главной структурной постоянной микроокружения является желудочек, в то время как толщина нейроэпителия со временем увеличивается. В середине гестации нейроэпителиальные клетки начинают экспрессировать маркеры глии и принимать более удлиненную форму. Отражая этот переход, данный тип СК теперь называют клетками РГ. В процессе развития состав микроокружения усложняется вследствие образования различных типов клеток и появления плотной сети кровеносных сосудов [117]. Иммунологическое окрашивание различными маркерами свидетельствует о совместном существовании подтипов РГ с различными функциями и разной линейной коммитированностью [181].

1.1.2. Постнатальные нейральные стволовые клетки.

В настоящее время доказано существование нейрогенеза в зрелом мозге млекопитающих и человека [81, 102, 206]. В ЦНС взрослых организмов обновление нейронов происходит благодаря сохранению клеток, которые обладают функциональными характеристиками НСК и находятся в определенных ограниченных областях мозга, а именно в СВЗ и субгранулярной зонах (СГЗ) [150, 169]. Данные клетки характеризуются низкой частотой деления и проявляют несколько общих черт, свойственных для астроцитарной глии и нейроэпителиальных клеток, включая морфологические характеристики, экспрессию GFAP, секрецию глиогенных факторов FGF, BMP, TGF, а также экспрессию маркеров нестин, виментин, ноггин и гликопротеина CD133 [103, 149, 198]. В то же время для них характерно отсутствие экспрессии маркеров дифференцированных клеток CD24, O4, NeuN и S100β [149].

Область СВЗ представляет собой цитоархитектурно-биохимическую нишу, по ряду признаков отличающуюся от окружающей ее паренхимы ЦНС. В ее состав входят пролиферирующие СК и ПК, выполняющие стромальную функцию; внеклеточный матрикс (ВКМ), модулирующий пролиферацию, адгезию и миграцию клеток; астроцитарные и эпендимальные клетки СВЗ, которые действуют как стромальные элементы ЦНС, продуцируя молекулы, которые оказывают влияние на судьбу СК и ПК [139]. СВЗ является областью зрелого мозга с наиболее высокой скоростью нейрогенеза, из которой НСК были впервые изолированы, а также впервые была охарактеризована их способность к дифференцировке в клетки ненейрональной линии [192]. Эта область представляет собой остаток эмбрионального зародышевого нейроэпителия, который сохраняется на протяжении всей жизни как активный митотический слой в стенке теленцэфалических боковых желудочков и вдоль рострального потока к обонятельной луковице (ОЛ). Показано, что полный кругооборот популяции пролиферирующих клеток происходит каждые 12–28 дней, при этом каждый день образуется около 30000 новых нейральных прекурсоров (нейробластов), которые мигрируют к ОЛ [148]. В СВЗ было выявлено два главных типа клеток: мигрирующие пролиферирующие нейробласты и астроциты. Последние образуют сеть в пределах всей СВЗ и организованы в каналы, которые носят название глиальных трубок [178]. Новообразованные нейробласты, сгруппированные в плотно упакованные цепи, мигрируют вдоль данных трубок в ростральном направлении к ОЛ [148]. Данный «маршрут» клеток получил название рострального миграционного потока. Достигнув дистального конца ОЛ, нейробласты отделяются друг от друга и покидают трубки. После достижения поверхностных слоев ОЛ они окончательно дифференцируются в нейроны. Глиальные трубки представлены клетками астроглии, которые экспрессируют GFAP, виментин и нестин. Присутствие в астроцитарных клетках СВЗ зрелого мозга молекул, которые в большом количестве содержатся в незрелых клетках радиальной глии, направляющих молодые нейроны во время развития ЦНС, свидетельствует о

том, что роль глиальных трубок состоит в регуляции миграции нейробластов. Предполагается также, что часть астроцитов СВЗ, которые называют клетками типа В, представляют собой относительно пассивные СК, которые в обычных условиях пролиферируют с низкой скоростью и образуют нейральные прекурсоры, или клетки типа А [58], путем генерации третьего, промежуточного типа клеток С (или клеток типа D в гиппокампе). Клетки типа С обладают характеристиками быстро пролиферирующих ПК и служат для увеличения количества потомков [94]. Клетки типа А представляют собой мигрирующие нейробласты, которые проходят большие расстояния по ростральному миграционному потоку к ОЛ, где они дифференцируются в гранулярные интернейроны и функционально интегрируют в локальную сеть нейронов [74].

В СГЗ, которая расположена в области зубчатой извилины гиппокампа, медленно делящиеся клетки типа В, положительные к маркерам GFAP, S100β, Sox2 и нестину [149], дают начало клеткам-предшественникам, которые мигрируют в радиальном направлении и становятся гранулярными нейронами или дифференцируются в клетки глии [72].

При культивировании НСК, выделенных из области СВЗ и СГЗ зрелого мозга, в бессывороточной среде в присутствии митогенов EGF и/или FGF, они подвергаются серии делений, образуя плавающие кластеры клеток, получившие название «нейросфер». Клетки нейросфер характеризуются как способностью к самовозобновлению с сохранением мультипотентности, так и к мультилинейной дифференцировке [144, 193]. Каждая из формирующихся нейросфер является гетерогенной по составу, т.к. состоит из НСК, пролиферирующих прекурсоров, дифференцированных нейронов и клеток глии, а также мертвых или погибающих клеток [173]. В условиях культуры при удалении митогенов происходит дифференцировка НСК в три главных клеточных типа ЦНС: нейроны, астроциты и олигодендроцты [67].

Области СВЗ и СГЗ зрелого мозга характеризуются значительной гетерогенностью. Например, клетки радиальной глии в СВЗ дают начало

различным подтипам вставочных нейронов в ОЛ в зависимости от их ростро-каудального расположения [158]. Показано совместное существование покоящихся и активных СК в зрелом мозге млекопитающих. Пролиферирующие нейральные предшественники присутствуют и в других областях ЦНС, где они дают начало олигодендроцитам и астроцитам [136]. Тем не менее, вопрос о том, образуют ли данные предшественники значительное количество нейронов в физиологических условиях в ЦНС взрослого организма, остается открытым.

1.1.3. Потенциальное использование нейральных стволовых клеток.

На сегодняшний день существует два основных направления использования НСК при лечении заболеваний нервной системы. Первое направление связано с трансплантацией НСК и их потомков в поврежденные участки нервной системы, второе направление заключается в разработке методов, которые активируют или модулируют функционирование собственных НСК мозга человека [36, 195, 219].

Наиболее изученным и широко используемым источником НСК для трансплантации является эмбриональная нервная ткань, которую получают из абортированных зародышей человека [120]. В качестве альтернативного источника получения специализированных НК также используются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Так, описана возможность выращивания ЭСК мыши и человека для получения культур, обогащенных дофаминэргическими клетками, двигательными нейронами, олигодендроцитами и клетками сетчатки [220]. Трансплантированные клетки эмбрионального происхождения образуют *in vivo* синаптические связи с резидентными клетками мыши [127]. Однако, несмотря на успешные результаты по использованию ЭСК в терапевтических целях и наличие достаточно четко разработанных методик по получению специализированных нейральных клеток *in vitro*, существует ряд недостатков, которые затрудняют их применение в клинических целях. Среди них наиболее существенными

являются ограниченный запас фетальной ткани человека, а также вероятность формирования клетками, которые являются потомками ЭСК, тератом [75].

Для трансплантации также используются НСК и ПК зрелого мозга. Показано, что после трансплантации данные клетки выживают, мигрируют в область повреждения и образуют функционирующие нейроны, способные формировать связи с клетками реципиента [97]. На моделях болезней Паркинсона и Хантингтона продемонстрирована посттрансплантационная дифференцировка нейральных ПК в НК и клетки глии [60, 208]. Существенное восстановление мозга наблюдалось при трансплантации НСК в область дегенеративных изменений, вызванных гипоксией [175].

Рядом преимуществ обладает метод активации собственных НСК, в частности, отсутствие иммунного ответа, лучшее созревание и функциональная интеграция новообразованных потомков СК. Метод активации СК, находящихся в нейрогенных областях головного мозга, основан на использовании различных факторов, которые стимулируют образование новых нейронов. При этом заболевание или нейродегенеративные процессы сами по себе способны стимулировать НСК к образованию новых клеток. Так, при моделировании ишемии мозга крысы наблюдалась ответная пролиферация собственных НСК и их миграция в область повреждения, а также увеличение скорости пролиферации НСК при инфузии митогенов [166, 209]. При индуцированной гибели нейронов в месте поражения выявлялись новообразованные клетки, положительные к нейрональному маркеру NeuN [77]. В экспериментальных моделях ишемии наблюдалось увеличение нейрогенеза в СВЗ и СГЗ грызунов [223]. В ряде работ, кроме этого, показано, что НСК сами по себе способствуют подавлению воспаления мозга, т.к. являются источником трофических молекул, которые активируют восстановительные процессы [78].

Положительное влияние трансплантации НСК описано для многих заболеваний ЦНС, однако механизмы их клинического действия до сих пор не изучены. Отсутствуют протоколы выделения и экспансии НСК человека.

Остается актуальной необходимость создания запаса НК для их эффективного использования в биологии, медицине и фармакологии, что предполагает, помимо выращивания и экспансии клеток в культуре, возможность их успешного хранения.

1.2. Поведение нервных клеток в культуре *in vitro*

Использование НСК как в исследовательских, так и терапевтических целях, требует разработки оптимальных условий для их культивирования и экспансии. При выборе методики культивирования учитывается видовая принадлежность и возраст донора, а также необходимая конечная плотность клеток в суспензии. Исходя из цели исследования, определяется химический состав среды культивирования и использование факторов, поддерживающих пролиферацию или дифференцировку клеток. Для получения исходной суспензии НК проводится выделение клеток из тканей зрелого головного мозга или головного мозга зародышей на разных стадиях развития. Первичный материал дезагрегируют, используя методы энзиматической или механической диссоциации [216]. Полученную клеточную суспензию переносят в среду определенного химического состава с добавлением веществ, необходимых для выживания и роста определенной популяции клеток. Иногда для улучшения адгезивных свойств поверхность культуральных сосудов обрабатывается рядом субстратов, таких как полилизин, полиорнитин, ламинин [123, 152, 155]. Поддержание культуры НСК предполагает наличие фидерного слоя клеток, в качестве которых, как правило, используются астроциты и фибробласты [123, 161]. Индукция пролиферации НСК в культуре осуществляется с помощью митогенов FGF-2 и EGF, а также при использовании TGF и IGF-I [61, 190, 191, 209]. Для индукции дифференцировки НСК в нейрональном направлении используют ретиноевую кислоту, NGF, NT-3, cAMP, PDGF, инсулин-трансферрин-селенит [73, 199]. CNTF оказывает влияние на дифференцировку НСК в глиальном направлении [68]; BMP2/4 и Sonic hedgehog способствуют дифференцировке в астроциты [154, 174].

Выбор методики последующего культивирования определяется целью и задачами исследования. Для количественного увеличения и обогащения культуры НСК наиболее часто используется метод «нейросфер», или, как его еще называют, метод 3-D культивирования [193]. Для стимуляции сферообразования используются бессывороточные среды при добавлении ростовых факторов, способствующих пролиферации СК [144]. Нейросферы представляют собой клоны пролиферирующих СК, которые выделяют из различных нейрогенных областей как эмбрионального, так и зрелого мозга. На сегодняшний день установлено, что нейросферы являются колониями, образованными одной СК, и представляют собой гетерогенную популяцию клеток, включающую как СК, так и коммитированные ПК и более дифференцированное потомство, что сходно с нейрогенными областями *in vivo*, в которых СК находятся в тесном контакте с дифференцированными клетками [130]. Широкому распространению 3-D культивирования для изучения НК как фетальной, так и взрослой ЦНС, способствовал ряд преимуществ, в частности, возможность исследования пролиферативной и дифференцировочной способности клеток, изучения влияния микроокружения, проведения длительной экспансии и клонального анализа нейральных СК и ПК. Культивирование НК в виде нейросфер способствует сохранению поверхностных молекул и мембрано-связанных рецепторов, которые принимают участие в передаче внутриклеточных сигналов, а также сигналов, необходимых для развития клеток и их взаимодействия. Поэтому поведение клеток в 3-D культуре более сходно с их естественной реакцией на поступающие сигналы из внеклеточного микроокружения *in vivo* [137], что позволяет использовать нейросферы в качестве модели дифференцировки и пространственного взаимодействия как между самими клетками, так и между клетками и их окружением. НК, культивируемые в виде нейросфер, демонстрируют более высокую жизнеспособность и лучшие функциональные характеристики, при этом отсутствует количественное ограничение в получении необходимого числа клеток в течение длительного культивирования

[128]. Представлены работы, в которых 3-D культуры используются в качестве модели для изучения апоптоза клеток, морфогенеза тканей, лечения раковых опухолей [63, 90], они также применяются в тканевой инженерии и регенеративной медицине [122].

Монослойное культивирование наиболее часто используется при изучении процесса дифференцировки НСК, главным образом благодаря тому, что появляется возможность наблюдать за развитием и дифференцировкой клеточного потомства, образованного от одной исходной СК. Преимуществом монослойного культивирования также является легкая пространственная изоляция отдельных клонов для получения очищенных популяций НК, и проведения их количественного и качественного анализа. Улучшенный доступ к факторам роста в монослойных культурах позволяет минимизировать спонтанную дифференцировку, ограничивающую пролиферативный потенциал НСК [77]. Существует возможность изучения роста клеточных отростков и образования синаптических связей, визуализация локализации нейрональных белков. Монослойные культуры также используются для длительной электрофизиологической регистрации, фармакологических манипуляций и микроскопического анализа высокого разрешения при изучении взаимосвязи между морфологией клеток и их активностью [184].

Обязательным этапом культивирования является идентификация и фенотипирование дифференцировавшихся клеток. Для этого, как правило, используются иммуногистохимические методы, которые основываются на выявлении специфических маркеров, характерных для клеток, находящихся на определенных стадиях развития. Наиболее часто используемыми маркерами нейральных ПК являются нестин, белок промежуточных филаментов [135] и Musashi1, РНК-связывающий белок, который экспрессируется в пролиферирующих нейрональных и/или глиальных прекурсорных клетках [125]. Определение НСК или ПК также осуществляется с помощью [H3]-thymidine и BrdU, экзогенных нуклеотидных аналогов, которые включаются в реплицирующуюся ДНК пролиферирующих клеток, и

наследуются их потомством [98]. Маркерами незрелых нейронов являются β-тубулин III – белок цитоскелета, экспрессируемый в постимитотических нейронах [157], doublecortin – связанный с микротрубочками цитоскелета белок, экспрессируемый мигрирующими нейробластами [165], TOAD 64 – цитоплазматический белок, экспрессируемый постмитотическими нейронами [160], PSANCAM и NeuroD – факторы транскрипции, экспрессирующиеся на ранней стадии развития нейронов [131, 200]. Маркерами зрелых нейронов являются NSE, NeuN и MAP-2 [163]. CNP используется для идентификации олигодендроцитов, S100 и GFAP – для выявления астроцитов [93].

1.3. Роль микроокружения в регуляции функционирования нейральных стволовых клеток

В процессе выделения клетки теряют межклеточные связи, а также контакты с внеклеточным матриксом, что может являться стимулом для вступления в апоптоз [10]. Для выживания изолированным клеткам необходимо быстрое восстановление клеточного окружения и внеклеточного матрикса. В культуре *in vitro* условия, в которых клетки контактируют друг с другом, и в которых способен формироваться внеклеточный матрикс, воссоздаются в многоклеточных агрегатах, формируемых изолированными клетками. Показано, что агрегация клеток *in vitro* сопровождается формированием микроокружения, которое является сходным с микроокружением клеток различных тканей *in vivo* [140]. Наличие внеклеточного микроокружения необходимо для нормального развития и функционирования всех типов клеток, в том числе стволовых, т.к. оно оказывает регуляторное влияние на самовоспроизведение клеток, их морфогенез, адгезию, миграцию, предопределяет дифференцировку клеток в развивающихся тканях и органах [162]. На сегодняшний день выявлено большое число молекул, с помощью которых осуществляется взаимодействие НК с их микроокружением, и которые оказывают регулирующее действие на их развитие. К ним относятся хемо- и нейротрофические факторы (NGF и BDNF), молекулы клеточной адгезии

(NCAM и N-cadherin) и молекулы внеклеточного матрикса [105]. Каждый класс молекул оказывает влияние на основные стадии развития НК, включая выживание клеток, спецификацию, миграцию, рост аксонов, образование синапсов и глиальную дифференцировку [76].

Наиболее изученным является взаимодействие НК с молекулами ВКМ. В нервной ткани компоненты ВКМ образуют вокруг нейронов плотные области, известные как перинейральные сети [107]. Они являются комплексным соединением матриксных молекул, представленных протеогликанами, коллагеном, ламинином, фибронектином и нейропептидами [54]. Топографические и биохимические характеристики субстрата имеют решающее значение для роста аксонов и регенерации нейронных сетей в естественных условиях. Показано, что повреждение клеточного микроокружения способствует генерации новых дофаминергических нейронов [104]. Связывание клеток с субстратом является необходимым условием для морфогенеза нейронов, миграции незрелых прекурсоров и их дифференцировки [164]. ВКМ, кроме того, является непосредственным микроокружением СК, которое принимает участие в передаче сигналов, регулирующих пролиферацию клеток, их специализацию, миграцию и развитие [88]. Наиболее важными компонентами ВКМ в пределах ниши НСК являются семейства ламининов и фибронектинов. Высокий уровень экспрессии ламинина характерен как для развивающегося мозга (область миграции нейробластов) [138], так и для мозга взрослых животных (СВЗ и ростральный миграционный поток, пути роста нервных волокон) [127]. Показано, что ламинин способствует экспансии, миграции и дифференцировке НСК и ПК в нейроны и астроциты, оказывает стимулирующее действие на рост отростков НК [99]. Экспрессия фибронектина также наблюдается в эмбриональном и постнатальном периоде, а именно, в областях активного морфогенеза, миграции клеток, и воспаления [177]. Фибронектин совместно с иммуноглобулинами являются доменами NCAM (neural cell adhesion molecule), молекул клеточной адгезии, которые участвуют в регуляции миграции клеток, передаче сигналов из внеклеточного окружения в

клетку, росте и направлении отростков НК [183]. Активная экспрессия молекул адгезии наблюдается в нейрогенных нишах зрелого мозга, что сопровождается значительным увеличением количества пролиферирующих клеток [55, 64]. Еще одним элементом внеклеточного окружения, который принимает участие в адгезии клеток, является тенасцин. Показано его присутствие в коре постнатального головного мозга во время удлинения волокон молекулярного слоя [106], а также участие в связывании протеогликанов НК, что способствует прикреплению к нейронам клеток глии [118]. Протеогликаны являются компонентами ВКМ, регулирующими адгезию и миграцию клеток, рост и регенерацию отростков НК [152].

Связывание клеток с элементами ВКМ происходит благодаря наличию на их поверхности многочисленных рецепторов, относящихся к различным семействам молекул клеточной адгезии. Так, молекулы интегринов опосредуют взаимодействие между внеклеточной средой и цитоплазмой НК, являясь высокоспецифичными поверхностными рецепторами к таким элементам ВКМ, как фибронектин, ламинин и т.д. [108]. Во время эмбрионального развития редукция экспрессии β1-интегрина на ранних стадиях пролиферации и миграции нейробластов оказывает выраженный эффект на их последующее нормальное развитие [84]. Взаимодействие ламинина с интегриновой субъединицей α6β1 является одним из наиболее важных в качестве раннего индуктивного сигнала для регуляции пролиферации НСК/ПК, миграции и дифференцировки как *in vitro*, так и в эмбриональном и зрелом мозге млекопитающих [109, 151]. Взаимодействие интегриновых рецепторов с элементами ВКМ является необходимым условием для образования сфероидов различными типами клеток [194]. Показано, что связывание интегриновых рецепторов с элементами ВКМ является промежуточным звеном быстрой сборки клеток в агрегаты [140]. Формирование между клетками агрегатов более тесных контактов происходит при участии Е-кадгерина, относящегося к семейству Ca^{2+}-зависимых трансмембранных белков [57]. Экспрессия Е-кадгерина инициируется при усилении клеточной адгезии, когда происходит

уплотнение агрегатов и они морфологически изменяются, преобразуясь в компактные сфероиды [140]. Результаты наблюдений за морфологическими изменениями агрегатов согласуются с данными, полученными при изучении морфогенеза ткани *in vivo*, согласно которым взаимодействие между интегриновыми субъединицами и ВКМ сопровождается первоначальным связыванием клеток, которое далее увеличивается благодаря усилению межклеточной адгезии на основе связывания кадгериновых субъединиц [133].

Взаимодействие НК с микроокружением регулируется ростовыми факторами, источником которых могут быть как сами клетки нейрогенных ниш мозга, так и внешние источники, главным образом цереброспинальная жидкость и кровеносные сосуды. Показано, что после инфузии факторов роста FGF, EGF и TGFα, выделенных из цереброспинальной жидкости, происходит увеличение пролиферации клеток в СВЗ [214]. Внутрижелудочковое введение EGF стимулирует пролиферативную активность НСК, введение FGF-2 приводит к увеличению количества нейроклеток в СВЗ и СГЗ [22, 190, 209]. Регуляция пролиферации НСК и ПК осуществляется также ростовыми факторами васкуляторного происхождения, такими как VEGF, PDGF и PEDF [188].

1.4. Влияние гипотермических условий хранения на структурно-метаболические характеристики клеток и тканей

Фундаментальным принципом сохранения клеток для их последующего использования является уменьшение отрицательных эффектов ишемии, которые накапливаются в течение времени хранения. Это, в частности, достигается путем понижения температуры, в результате чего происходит уменьшение скорости биохимических реакций, интенсивности метаболических процессов, а также потребности клеток или тканей в кислороде. Наиболее распространенным способом хранения биологических объектов является криоконсервирование, что объясняется возможностью сохранения их морфо-функциональных характеристик в течение длительного времени. Данный

способ хранения, тем не менее, обладает рядом недостатков, среди которых можно назвать высокую стоимость процедуры криоконсервирования, обязательное наличие специальных материалов, оборудования и подготовленного персонала. При этом наиболее существенным недостатком криоконсервации является необходимость использования криопротекторов и последующая их отмывка, связанная с токсичностью. Определенная степень токсичности криопротекторов приводит к снижению жизнеспособности клеток, ухудшению их метаболических функций, а также обуславливает необходимость восстановительного периода [170, 211]. Альтернативой криоконсервированию может выступать хранение биообъектов в условиях гипотермии. Так, использование околонулевых положительных температур является обязательным условием при заборе биоматериала и выделении клеток, оно предшествует процедуре криоконсервации. Гипотермические условия используются для хранения тканей и органов, которые не могут подвергаться процедуре криоконсервации вследствие получения значительных повреждений при низких субнулевых температурах. ГХ может быть более предпочтительным при кратковременном транспортировании биоматериала из медицинских учреждений в лаборатории для выделения и последующего клинического использования клеток, а также при транспортировке тканей и органов между донорскими центрами.

Методы ГХ клеток и тканей основываются на снижении их метаболической активности путем хранения при температурах 4–10 °С [215]. Известно, что метаболическая активность большинства ферментов нормотермических животных уменьшается в 1,5–2 раза при снижении температуры на каждые 10 °С; снижение температуры от 37 до 0 °С обеспечивает эффективное замедление метаболических процессов в 5 раз [31]. Замедление обменных процессов позволяет снизить чувствительность клеток к ишемии, при этом не происходит полного прекращения процессов метаболизма, что позволяет избежать развитие необратимых нарушений и способствует поддержанию функциональной активности клеток. В то же время

гипотермия является фактором, индуцирующим ряд патологических процессов в клеточных структурах, в частности, в мембранах клеток. Так, после первоначального возрастания структурного порядка молекул возникают конформационные изменения белков, фосфолипидов, нуклеиновых кислот, что приводит к расслоению и разрывам липидного бислоя мембран, активации процессов их перекисного окисления, к перегруппировке и снижению активности мембрано-связанных ферментов. Структурные перестройки являются причиной следующего за ними нарушения метаболизма клеток и формирования повреждений, которые сходны с ишемическими [50]. С увеличением сроков ГХ происходит нарастание данных нарушений, которые, в конечном счете, приводят к гибели клеток. Недостаток кислорода приводит к первоначальному торможению и последующему блокированию работы митохондрий, что, в свою очередь, ведет к нарушению энергообеспечивающей функции [134]. Дефицит макроэргических соединений является причиной нарушения транспорта ионов и метаболитов, ионного гомеостаза, структуры и функций клеточных органелл, в частности, лизосом, гидролазы которых начинают накапливаться в свободном виде в цитоплазме клеток, что приводит к их повреждению [70]. В процессе ГХ происходит уменьшение значения pH, величина которого играет роль в поддержании объема клетки. Снижение величины pH связано с переходом клеток на анаэробный гликолиз в качестве основного источника энергии. При этом нарушается работа ферментов, которые имеют нейтральный оптимум, что приводит к нарушению работы митохондрий [100]. В исследованиях, посвященных изучению влияния гипотермии на морфо-функциональные характеристики гепатоцитов, показано, что основной причиной гибели клеток в условиях ГХ является нарушение ионного баланса, вызванного снижением активности Na^+-K^+-насоса. Характер повреждения клеток – набухание, предполагает наличие свободного потока внеклеточных ионов Na^+ и Cl^- внутрь клетки, индуцирующего нарушение осмотического равновесия между клеткой и внеклеточной средой. Это свидетельствует о возможности увеличения сроков ГХ гепатоцитов в средах

внутриклеточного типа, которые характеризуются повышенным содержанием K^+ и пониженным содержанием Na^+. Также показано, что решающую роль в предотвращении набухания гепатоцитов и поддержании функционирования митохондрий играют ионы Ca^{2+}, сохранение низкой внутриклеточной концентрации которых является решающим для сохранения ионного гомеостаза и предотвращения активации процессов клеточной смерти [95]. Изменение в процессе ГХ концентрации ионов Ca^{2+}, которые являются одними из основных регуляторов структурно-функционального состояния белков цитоскелета и цитозоля, может приводить к их модификации, что, в свою очередь, является причиной увеличения объема клеток и образования на поверхности мембраны везикул. Последствием хранения может быть повреждение плазматической и внутриклеточных мембран, приводящее к нарушению их избирательной проницаемости, изменению ионного гомеостаза и вследствие этого – к нарушению метаболических процессов в клетке и ее функциональной активности [153].

Вследствие высокого уровня метаболизма, основанного на потреблении большого количества кислорода и глюкозы, нервная ткань характеризуется повышенной уязвимостью к внезапному началу ишемических повреждений. Понижение температуры позволяет уменьшить темпы метаболизма и потребность тканей в кислороде и энергетических субстратах. Исходя из этого многие хирургические процедуры, особенно в области нейро- и кардио-сосудистой хирургии, основываются на использовании гипотермии как относительно безопасного способе для эффективной биологической защиты во время остановки работы сердца или циркуляции крови [210]. Все большее значение в качестве метода для лечения повреждений мозга приобретает клеточная трансплантация, неотъемлемым этапом которой является хранение НК. В данном случае изолированные НК, которые подвергаются ГХ, могут использоваться в качестве модели в экспериментальной биологии для усовершенствования методов холодового хранения клеток. ГХ нервных клеток может также выступать в качестве одного из подходов, позволяющих

объяснить механизмы защиты от ишемических и травматических повреждений мозга при использовании гипотермии. Так, выявлено положительное влияние гипотермии на восстановление ткани мозга после ишемических повреждений [80], а также нейрозащитное действие умеренной и мягкой гипотермии в моделях травмы головного мозга [82]. Показано, что гипотермия модулирует воспалительный ответ после черепно-мозговой травмы, снижая эндогенную воспалительную реакцию и уменьшая уровень инфильтрации нейтрофилов в области воспаления [119, 217]. Использование гипотермии способствует снижению метаболических и энергетических потребностей, а также поддержанию нормальных уровней цитоплазматической АТФ, нейромедиаторов и трансмембранных градиентов ионов [213]. Метаболические эффекты умеренной гипотермии связаны с сокращением или задержкой метаболического спроса во время и после острой травмы ЦНС [143]. Глубокая гипотермия сохраняет жизнеспособность нейронов и астроцитов во время длительной гипоксии мозга, без неврологических или когнитивных нарушений у животных [53]. Использование гипотермии после ишемического повреждения мозга крыс предотвращает развитие апоптоза нейронов, нейральных прекурсоров [96], а также сохраняет основные характеристики НСК [197, 212].

На сегодняшний день исследования влияния условий ГХ на морфофункциональные показатели НК представлены небольшим числом работ. Так, при изучении жизнеспособности суспензий клеток нервных тканей эмбрионов человека 7–12 недель гестации в процессе длительного ГХ показана более высокая устойчивость клеток эмбрионального происхождения по сравнению с клетками взрослого организма [24], что, по мнению авторов, связано с преобладанием в клетках эмбрионального происхождения гликолитического пути генерации энергии. Показано, что использование ССР для ГХ эмбриональных НК на протяжении 3 суток и нервной ткани в течение 1 суток позволяет сохранять жизнеспособность клеток на уровне, близком к уровню свежевыделенных клеток [23]. Эффективность ССР обусловлена наличием в растворе непроникающих в клетку компонентов, таких как

сахароза, альбумин и лактобионат. Они предотвращают набухание клеток и сдерживают дальнейшее развитие повреждений, ингибируя поток воды в клетку, таким образом, способствуя поддержанию барьерной функции мембран и водного баланса в клетке [12, 203]. Исследование глиальных клеток мозга 1–3 суточных новорожденных крыс показали, что первоначальной причиной набухания клеток во время мягкой и умеренной гипотермии является внутриклеточная аккумуляция Na^+, эффекты которой могут быть полностью обратимы при инкубации клеток в Na^+-свободной среде [182]. Ингибирование работы Na^+/K^+-насоса во время ГХ происходит главным образом в результате снижения образования АТФ или развивающегося несоответствия между путями пополнения АТФ и его потребления [205].

Механизм, лежащий в основе положительного действия гипотермии, до конца не ясен, и требует дополнительных исследований, которые могут проводиться с использованием изолированных НК новорожденных крыс.

РАЗДЕЛ 2
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Получение суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс

В экспериментах использовались НК головного мозга 80 новорожденных беспородных крыс. В стерильных условиях проводили декапитацию новорожденных животных, интактный мозг извлекали из черепной коробки и переносили в чашку Петри. Ткань мозга отмывали от крови средой DMEM/F-12 («Sigma», США) и энзиматически диссоциировали, используя 0,25% раствор трипсина и 5-минутную инкубацию при 37 °С. Для инактивации трипсина ткань промывали средой DMEM/F-12, обогащенной 10% СКВК, после чего проводили механическую дезагрегацию ткани на единичные клетки с использованием вибрации [179]. Полученную суспензию пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм («BD Falcon», США) и отмывали от трипсина центрифугированием (3 мин, 100g) (T24, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем трипановым синим и выражали в процентах [201]. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева.

2.2. Культура клеток головного мозга новорожденных крыс

НК культивировали в концентрации 1, 2, 4 и 6 млн/мл в 24-луночных пластиковых планшетах («Corning», США) в ростовой среде DMEM/F-12, дополненной 0,6% глюкозы, 2 мМ глутамина, 3 мМ бикарбоната натрия. В среду добавляли 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Среду обогащали 10% СКВК. Культивирование клеток проводили в CO_2-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO_2, влажности воздуха 95%. Половину объема среды культивирования заменяли на свежую каждые 4–5 суток.

Клеточный монослой открепляли от подложки с использованием смеси растворов трипсина и Версена в соотношении 1:1 при 37 °С в течение 3 мин.

Клетки отмывали от трипсина средой DMEM/F-12, обогащенной 10% СКВК с последующим центрифугированием (3 мин, 100g) (T24, Германия). Полученная суспензия клеток использовалась для пересева.

2.3. Получение сыворотки крови взрослых крыс

Для получения СКВК животных декапитировали под эфирным наркозом. Собранную кровь помещали в холодильник на 15 мин для активации процессов свертывания. Свернувшуюся кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (ОПН–3, РФ). Полученную сыворотку стерилизовали пропусканием через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore», США), аликвотировали и хранили при температуре –18 °С.

В экспериментах также использовалась сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота 3 различных фирм-производителей: «Биолот» (РФ), «Sigma» (США) и «Gold» (Австрия).

2.4. Иммуноцитохимический анализ культуры клеток головного мозга новорожденных крыс

Иммуноцитохимические исследования культур НК проводили после их предварительной фиксации в растворе 4% параформальдегида. Фиксированные клетки пермеабилизировали абсолютным спиртом, блокировали 5% козлиной сывороткой («Sigma», США) и инкубировали с первичными антителами на протяжении ночи при +4 °С. Затем клетки промывали фосфатным буфером и культивировали с вторичными антителами в течение 40 мин. В культурах определяли присутствие специфических маркерных белков: нейронов – β-тубулина III; НСК – нестина; нейральных ПК – виментина, клеток глии – GFAP. В качестве первичных антител были использованы моноклональные анти-β-тубулин III антитела мыши («Sigma», США), моноклональные анти-GFAP антитела мыши («Abcam», Великобритания), моноклональные анти-нестин антитела мыши («Abcam», Великобритания), моноклональные анти-виментин антитела кролика («Abcam», Великобритания), а также вторичные

антитела: FITC-конъюгированный IgG («Sigma», США), Chromeo 546-конъюгированные антитела козы к IgG мыши («Abcam», Великобритания) и Chromeo 488-конъюгированные антитела козы к IgG кролика («Abcam», Великобритания). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 («Sigma», США).

2.5. Получение агрегатов нервных клеток головного мозга новорожденных крыс

Агрегаты получали в процессе краткосрочного культивирования НК. Клетки высевали в концентрации 4 млн/мл в среду DMEM/F-12, обогащенную 10% СКВК. После посева НК формировали плавающие многоклеточные агрегаты, которые, для предотвращения их прикрепления к подложке, несколько раз пипетировали с интервалом 30 мин. Затем агрегаты НК пересевали в свежую среду для последующего культивирования или ГХ.

2.6. Подсчет концентрации клеток в агрегатах

Тщательно собирали все сформированные агрегаты (в объеме 200 мкл), переносили в стерильные пробирки и диспергировали на единичные клетки. Далее проводили подсчет концентрации клеток по окрашиванию витальным красителем трипановым синим и выражали в процентах [201].

2.7. Оценка размеров агрегатов нервных клеток

Оценку размеров агрегатов проводили морфометрическим методом на световом инвертированном микроскопе MT3000 («AmScope», США) измеряя площадь сечения проекции агрегатов с помощью программы Zeiss Image Examiner.

2.8. Оценка скорости формирования монослоя

Оценку площади монослоя проводили морфометрическим методом на световом инвертированном микроскопе MT3000 («AmScope», США). Площадь

монослоя рассчитывали как отношение площади поверхности, занимаемой распластанными клетками, к общей площади поверхности в поле зрения, и выражали в процентах.

2.9. Количественный микроскопический анализ

Плотность монослоя определяли по количеству прикрепленных и распластанных клеток на единицу площади путем подсчета количества клеточных ядер после окрашивали красителем Hoechst 33342 («Sigma», США).

2.10. Гипотермическое хранение суспензии и агрегатов нервных клеток новорожденных крыс

ГХ суспензии НК осуществляли при температуре +4 °С в ростовой среде DMEM/F-12 и ССР [19] в концентрации 40–50 млн/мл в криопробирках («Nunc», США). В среды добавляли 10% СКВК, или ЭМ/ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл. ГХ агрегатов НК осуществляли в тех же условиях, что и хранение суспензии клеток, для чего образованные в 1 лунке агрегаты после нескольких пересевов тщательно собирали и переносили в стерильные пробирки. Объем суспензии агрегатов при этом составлял 200 мкл. После этого к суспензии агрегатов добавляли 1,8 мл среды ГХ. После хранения клеточные агрегаы переносили в 24-луночные планшеты, которые помещали в CO_2 инкубатор. Через 1 час культивирования заменяли 2/3 среды культивирования на свежую. В дальнейшем замену среды осуществляли через каждые 3 суток культивирования.

2.11. МТТ-метод определения метаболической активности нервных клеток новорожденных крыс

2.11.1. Спектрофотометрический метод определения формазана.

Жизнеспособность НК в суспензии и агрегатах после ГХ оценивали с помощью МТТ теста путем окрашивания метилтиазолилдифенил-тетразолиум

бромидом (МТТ) («Sigma», США) [168]. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами.

Для приготовления рабочего раствора 10 мг МТТ растворяли в 2 мл 0,9% NaCl и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Далее стерилизовали раствор, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и аликвотировали. Концентрация МТТ составляла 5 мг/мл раствора.

После ГХ суспензии НК проводили замену среды хранения путем центрифугирования и осаждения клеток при 150 g в течение 3 мин. Клетки ресуспендировали в среде DMEM/F-12 и высевали в концентрации $0,1 \times 10^5$ клеток на одну лунку в 100 мкл культуральной среды. В среду культивирования добавляли 20 мкл рабочего раствора МТТ/мл и инкубировали в течение 2 часов при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO_2. Затем добавляли 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и инкубировали на протяжении 20 мин. Образцы пипетировали и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотофлуориметре TECAN GENios («GMI», Австрия).

После ГХ агрегатов НК среду хранения заменяли путем центрифугирования и осаждения агрегатов при 150 g в течение 3 мин. Агрегаты диспергировали на единичные клетки и высевали в концентрации $0,1 \times 10^5$ клеток на одну лунку в 100 мкл культуральной среды. В среду добавляли 20 мкл рабочего раствора МТТ/мл и инкубировали в течение 2 часов при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO_2. Затем добавляли 100 мкл ДМСО и инкубировали на протяжении 20 мин. Образцы пипетировали и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотофлуориметре TECAN GENios.

В качестве холостой пробы использовали среду культивирования без индикатора и клеток, с ДМСО. В качестве контроля – культуральную среду с МТТ без клеток. Оценку результатов МТТ теста проводили путем

сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных пробах и выражали в условных единицах оптической плотности:

УЕОП = О – К,

где О – оптическая плотность в опыте, К – оптическая плотность в контроле.

2.11.2. Оценка метаболической активности клеток агрегатов по интенсивности окрашивания формазаном.

Для проведения МТТ теста к 500 мкл суспензии агрегатов НК добавляли 50 мкл МТТ-реактива с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С в CO_2 инкубаторе. После этого проводили микрофотосъемку агрегатов и анализировали степень окрашивания клеток агрегатов формазаном. Для этого подсчитывали количество не окрашенных, частично и полностью окрашенных агрегатов, и выражали полученные результаты в процентах.

2.12. Определение жизнеспособности нервных клеток по окрашиванию пропидиум йодидом

Окрашивание клеток пропидиум йодидом проводили согласно [83]. Для этого 1 мкл исходного раствора пропидиум йодида (2 мг/мл дистиллированной воды) («Sigma», США) добавляли к 1 мл суспензии НК (конечная концентрация пропидиум йодида 2 мкг/мл) и инкубировали в течение 5 мин в темноте на холоде. После чего проводили микрофотосъемку клеток, используя флуоресцентный микроскоп Observer Z1 («Carl Zeiss», Германия) при волне возбуждения 488 нм, эмиссии >550 нм и подсчитывали жизнеспособность клеток.

2.13. Метод получения экстрактов из тканей крыс различного возраста

Экстракты получали из тканей эмбрионов крыс, а также мозга и печени новорожденных крыс по стандартной методике [6]. Ткани мозга, печени и целого эмбриона отмывали от крови фосфатным буфером и гомогенизировали в равном объеме среды DMEM/F-12 («Sigma», США). Полученные гомогенаты

центрифугировали 10 мин при 7000g (T24, Германия), после чего отбирали супернатант и стерилизовали, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipor», США).

Стандартизация супернатанта проводилась по содержанию белка (1 ± 0,2 мг/мл). Все манипуляции по получению экстрактов проводили в стерильных условиях при температуре +4 °С. Экстракты хранили при температуре –20 °С.

2.14. Определение содержания белка в экстрактах тканей мозга и печени новорожденных крыс

Содержание белка в образцах экстрактов определяли по методу Лоури [146]. Для этого 2,5 мл щелочного раствора меди добавляли к 0,5 мл белковой пробы (0,1 мл белкового раствора, смешанного с 0,4 мл дезоксихалата Na) и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Далее в смесь добавляли 0,25 мл раствора Фолина и выдерживали 90 мин в темноте при комнатной температуре. После чего измеряли экстинцию белковых проб на спектрофотометре Cary 50 («Varian», Австралия) при длине волны 740 нм. Для построения калибровочного графика использовали 10% раствор бычьего сывороточного альбумина.

2.15. Определение молекулярно-массового распределения пептидов и белков в экстрактах тканей мозга и печени крыс различного возраста

Молекулярно-массовое распределение пептидных и белковых фракций экстрактов проводили с помощью гель-проникающей хроматографии [4]. Для этого использовали колонку (400 × 16 мм), заполненную поливиниловым гелем TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine («Toyo Soda Manufacturing Co», Япония), в котором полипептидные молекулы распределяются линейно в диапазоне от 12000 до 200 Да. В колонку вводили 200 мкл экстракта; в качестве элюента использовали фосфатно-солевой буфер (Na_2HPO_4 – 18 мМ, NaH_2PO_4 – 12 мМ, NaCl – 100 мМ, pH – 7,4). Элюент подавался в колонку через петлевой

инжектор (0,2 мл) со скоростью потока 100 мл/час. Хроматограммы регистрировали ультрафиолетовым детектором 2238-Uvicord S II («LKB», Швеция) при длине волны 254 нм. Анализ времени удерживания и количественного распределения отдельных фракций в экстрактах проводили при помощи интегратора Waters-746 («Waters Corporation», США). Колонку калибровали стандартными пептидами с известной молекулярной массой.

2.16. Световая микроскопия

Микроскопический анализ культур проводился на световом инвертированном микроскопе MT3000 («AmScope», США). Микрофотосъемку культур НК проводили на флуоресцентном микроскопе Observer Z1 («Carl Zeiss», Германия).

2.17. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программы «Statistica 7.0» («StarSoft», США). Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали параметрический t-критерий Стьюдента [25]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

2.18. Биоэтические протоколы

В исследованиях использовались новорожденные белые беспородные крысы, содержащиеся в стандартных условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Работа с животными проводилась в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2013), согласованными с положением «IV Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (ETS 123, Страсбург, 1986) и разрешением Комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

РАЗДЕЛ 3
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние фетальной сыворотки телят и сыворотки крови взрослых крыс при культивировании нервных клеток новорожденных крыс

В данном подразделе представлены результаты исследования поведения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в процессе их культивирования в присутствии фетальной сыворотки телят и сыворотки крови взрослых крыс. Исследования проводили с помощью методов культивирования, флуоресцентной микроскопии и иммуноцитохимического окрашивания.

Для успешного выживания и функционирования изолированных клеток в условиях *in vitro* необходимо создание условий, приближенных к тем, в которых клетки находились *in vivo*. Для этого используются среды культивирования, обеспечивающие клетки питательными веществами, гормональными и регуляторными факторами. Все среды культивирования представляют собой солевые растворы определенного состава, к которым добавляются компоненты биологического происхождения (плазма, сыворотка крови, тканевые экстракты) [171, 189] или синтетические добавки [115]. В качестве источника биологических добавок, как правило, используют сыворотку [86], что объясняется тем, что она является источником гормональных факторов, стимулирующих рост и функционирование клеток; факторов роста, специфически стимулирующих клеточное деление; факторов прикрепления и распластывания клеток; транспортных белков, переносящих гормоны; минеральных веществ, липидов и т.д. На сегодняшний день при культивировании клеток млекопитающих наиболее широко используется сыворотка телят, которую получают либо из эмбрионов, либо от новорожденных животных. Среди недостатков сывороток можно назвать значительную вариабельность состава, оказывающую влияние на способность

поддерживать рост первичных культур и клеточных линий, возможную токсичность, приводящую к дегенерации клеток [185], а также межвидовые различия состава эмбриональных сывороток и сывороток новорожденных животных [18], которые необходимо учитывать при использовании для культивирования клеток животных и человека.

Для оценки эффективности использования сывороток различного происхождения изолированные клетки мозга новорожденных крыс культивировали в среде DMEM/F-12, обогащенной 10% ФСТ 3 различных производителей или СКВК.

В экспериментах использовали свежевыделенные НК новорожденных крыс, жизнеспособность которых составляла 20–70%. Размеры свежеизолированных клеток колебались в пределах от 9 до 16 мкм (рис. 3.1.1).

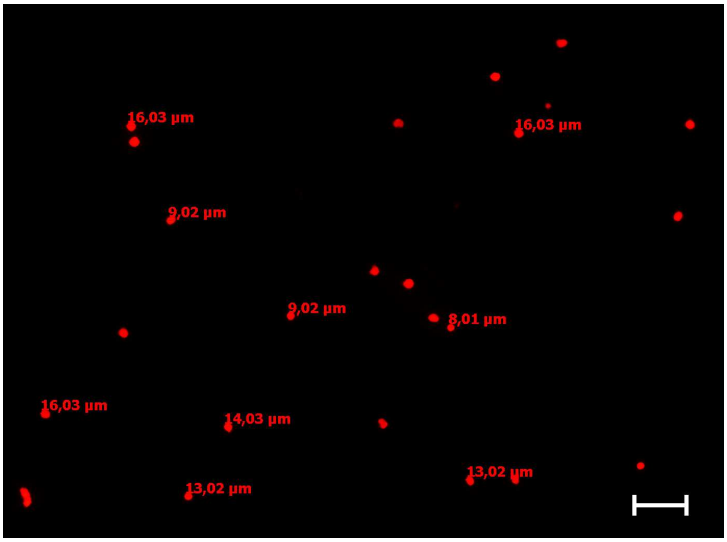


Рис. 3.1.1. Иммунофлуоресцентная микроскопия НК новорожденных крыс с использованием пропидиум йодида (диапазон измерения от 9 до 16 мкм). Масштаб: 100 мкм.

Клетки высевали в концентрациях 1, 2, 4, 6 и 8 млн/мл. В присутствии в среде культивирования DMEM/F-12 как СКВК, так и ФСТ через несколько часов после посева НК наблюдалось формирование плавающих многоклеточных агрегатов.

При культивировании НК новорожденных крыс среде без добавления сыворотки клетки не были способны к формированию агрегатов. Наблюдалось прикрепление и распластывание на подложке небольшого количества единичных клеток, характеризующихся глиальной морфологией. Однако они не были способны к формированию монослоя и в конечном итоге погибали.

Количество и размер образующихся агрегатов (в среде культивирования, обогащенной сывороткой) зависели от концентрации посеянных клеток. Так, при культивирования НК в концентрации 1 млн/мл формировалось небольшое количество мелких агрегатов. Культивирование клеток в концентрациях 6 и 8 млн/мл сопровождалось образованием агрегатов большого размера, которые сливались друг с другом. Плотность суспензии образованных агрегатов была очень высокой, что приводило к быстрому закислению среды. Кроме того, высокая плотность агрегатов затрудняла наблюдение за ними. При культивировании НК в концентрациях 2 и 4 млн/мл происходило формирование агрегатов, размер которых в среднем составлял 100 мкм (рис. 3.1.2). Сформированные агрегаты, как правило, характеризовались неправильной формой и рыхлой структурой, что было обусловлено неплотной упаковкой составляющих их клеток.

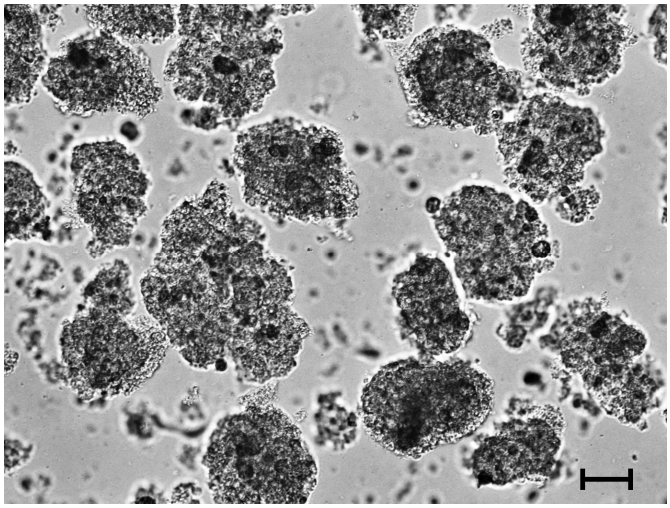


Рис. 3.1.2. Культура НК новорожденных крыс, 2 часа культивирования в присутствии СКВК. Формирование плавающих многоклеточных агрегатов. Прижизненное наблюдение. Масштаб: 50 мкм.

Структура агрегатов зависела от жизнеспособности посеянных клеток. При культивировании плавающих агрегатов, образованных клетками с жизнеспособностью выше 20%, через несколько часов после посева наблюдалось уплотнение упаковки составляющих их клеток, в течение 1–2 суток культивирования некоторые агрегаты морфологически становились похожими на сфероиды (рис. 3.1.3). Если жизнеспособность свежевыделенных НК была ниже, чем 15–20%, после их посева формировалось небольшое количество мелких, рыхлых агрегатов, структура которых в процессе культивирования не изменялась.

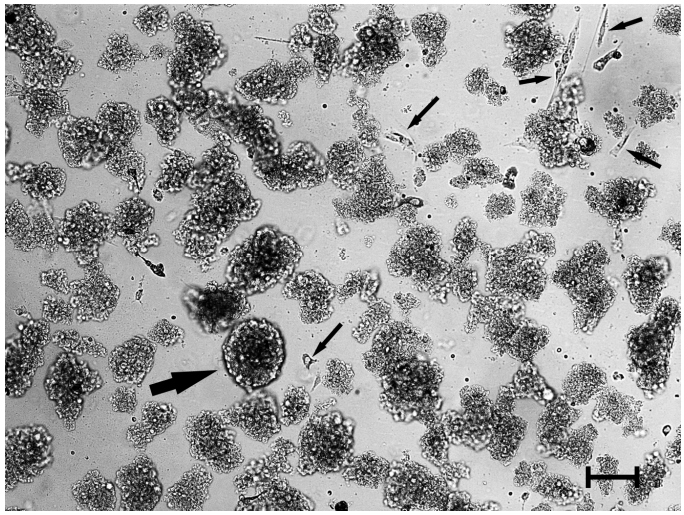


Рис. 3.1.3. Культура НК новорожденных крыс, 1 сутки культивирования в присутствии СКВК. Образование сфероидов (большая стрелка), единичные распластанные клетки с морфологией астроцитов (маленькие стрелки). Масштаб: 100 мкм.

В течение 1 суток культивирования жизнеспособность составляющих агрегаты клеток увеличивалась до 85–97%.

После посева НК также наблюдалось прикрепление к подложке части единичных клеток суспензии, которые не формировали агрегаты. В процессе культивирования они распластывались (рис. 3.1.3). Морфологически данные клетки были похожи на астроциты.

В течение 1 суток культивирования НК в среде, обогащенной ФСТ фирм «Биолот» и «Gold», количество агрегатов, которые увеличивались в размерах и приобретали более плотную упаковку клеток, не превышало 15% от их общего количества (рис. 3.1.14). В присутствии в среде культивирования ФСТ «Sigma» компактную упаковку клеток в течение 1 суток культивирования приобретало около 40% агрегатов, некоторые из агрегатов характеризовались сферической формой (рис. 3.1.4, 3.1.5).

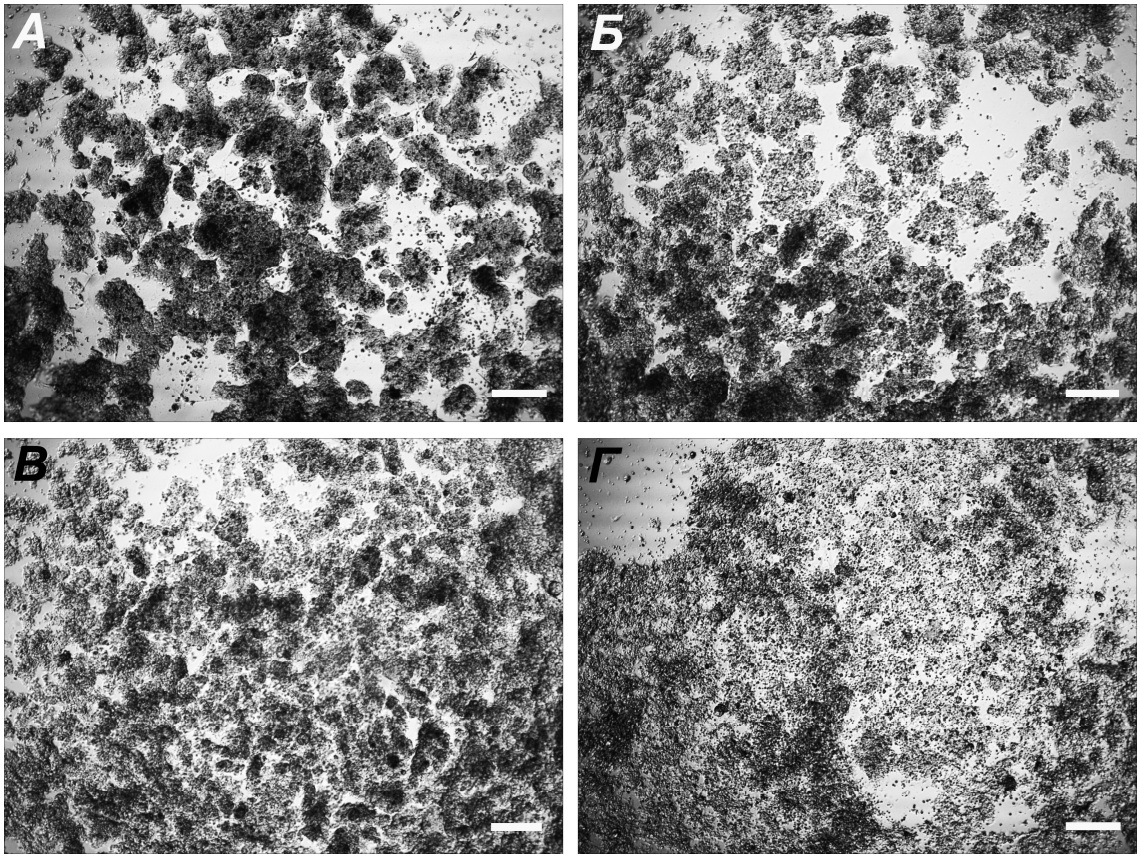


Рис. 3.1.4. Культура НК новорожденных крыс, 6 часов культивирования в присутствии СКВК (А) и ФСТ фирм «Sigma» (Б), «Gold» (В) и «Биолот» (Г). Формирование плавающих многоклеточных агрегатов. Масштаб: 200 мкм.

В то же время в присутствии в среде DMEM/F-12 СКВК в течение 1 суток культивирования НК более плотную упаковку клеток приобретало около 70% агрегатов, некоторые из агрегатов приобретали сферическую форму, морфологически становясь похожими на сфероиды (рис. 3.1.4, 3.1.5).

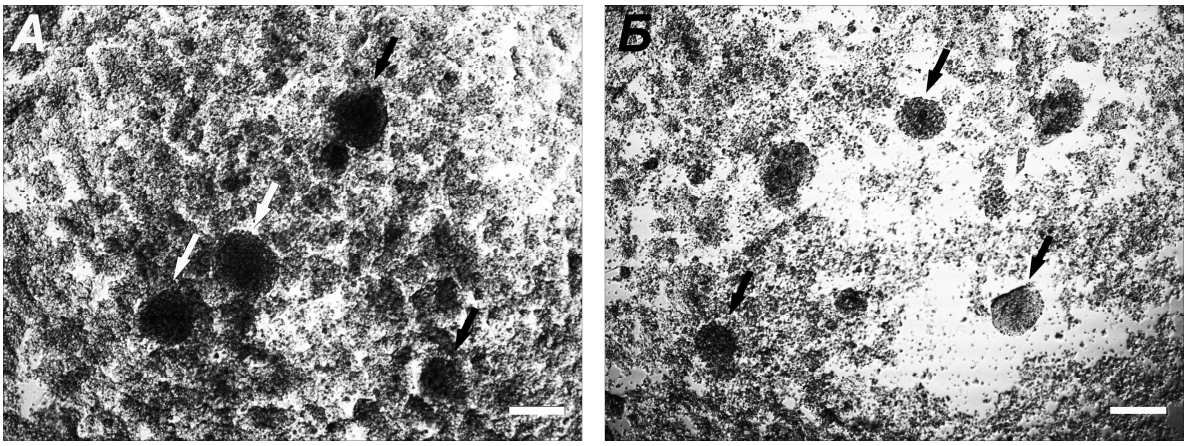


Рис. 3.1.5. Культура НК новорожденных крыс, 1 сутки культивирования в присутствии СКВК (А) и ФСТ «Sigma» (Б). Формирование сферических агрегатов. Прижизненное наблюдение. Масштаб: 200 мкм.

Способность клеток агрегатов прикрепляться к подложке и формировать монослой зависели от типа сыворотки, которой обогащалась среда культивирования НК. Так, в течение всего времени культивирования НК в присутствии ФСТ «Gold» и «Биолот» к поверхности лунки прикреплялось не более 60% агрегатов (табл. 3.1).

Таблица. 3.1.

Влияние различных сред на стадии культивирования агрегатов НК новорожденных крыс (n = 5)

Среда культивирования	Стадии культивирования НК, сутки					
	Начало прикрепления агрегатов	Прикрепление > 80% агрегатов	Миграция клеток от агрегатов	Формирование 70% монослоя	Появление нейробластов	Формирование колоний
DMEM/F-12 + СКВК	1	4	3–4	6–7	6 – 7	9–12
DMEM/F-12 + ФСТ («Sigma», США)	2	5–6	4–5	8–9	8	–
DMEM/F-12 + ФСТ («Биолот», Россия)	3	–	4–5	10–12	9–10	–
DMEM/F-12 + ФСТ («Gold», Австрия)	3	–	4–5	10–12	9–10	–

В присутствии ФСТ «Sigma» большая часть клеток агрегатов (более 80%) прикреплялись к подложке на 6 сутки культивирования (табл. 3.1). В присутствии СКВК большинство агрегатов прикреплялись к поверхности лунок на 4 сутки культивирования (табл. 3.1, рис. 3.1.6).

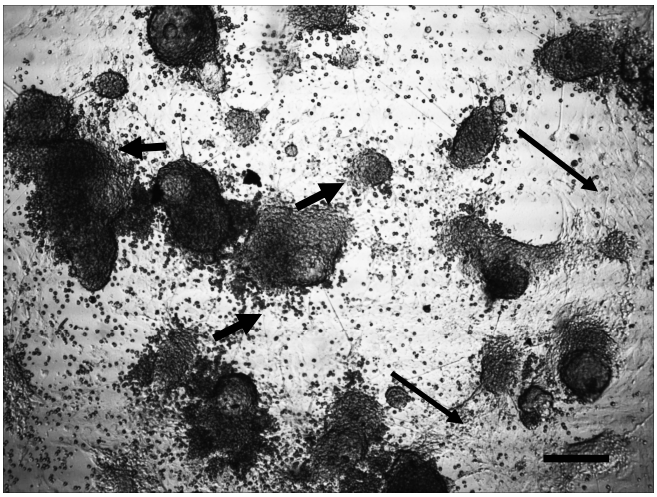


Рис. 3.1.6. Культура НК, 4 суток культивирования в присутствии СКВК. Миграция клеток из прикрепившихся агрегатов (короткие стрелки), формирование участков монослоя (длинные стрелки). Масштаб: 100 мкм.

После прикрепления агрегатов к подложке клетки агрегатов формировали длинные β-тубулин III положительные отростки (рис. 3.1.7).

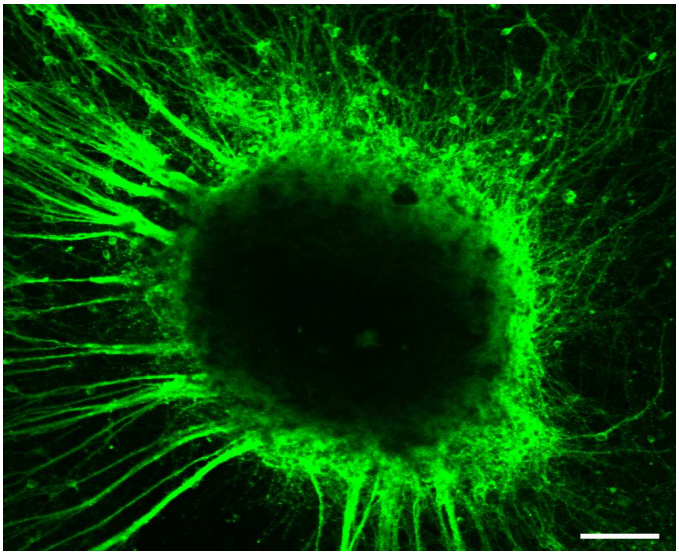


Рис. 3.1.7. Экспрессия β-тубулина III клетками прикрепленного к подложке агрегата, 5 суток культивирования НК в присутствии СКВК. Масштаб: 100 мкм.

На 4–5 сутки культивирования НК по отросткам агрегатов начинали мигрировать недифференцированные клетки (рис. 3.1.8).

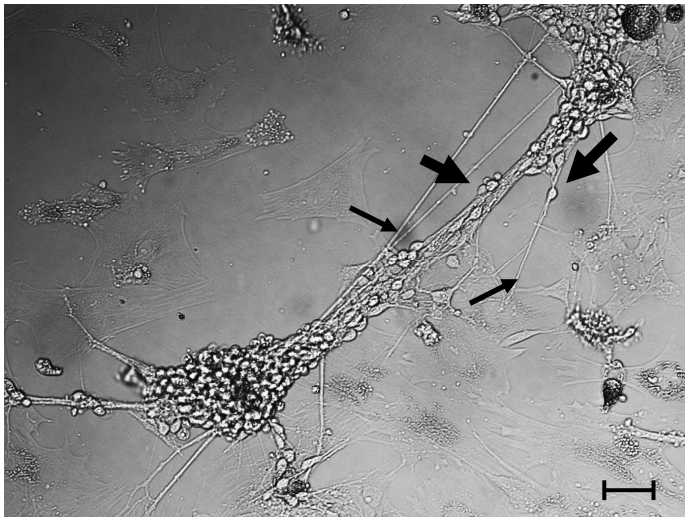


Рис. 3.1.8. Культура НК новорожденных крыс, 5 суток культивирования в присутствии СКВК. Миграция недифференцированных клеток (толстые стрелки) по отросткам прикрепившихся к подложке агрегатов (тонкие стрелки). Прижизненное наблюдение. Масштаб: 50 мкм.

Мигрирующие от агрегатов клетки распластывались и формировали участки монослоя. Клетки монослоя были GFAP-положительными (рис. 3.1.9).

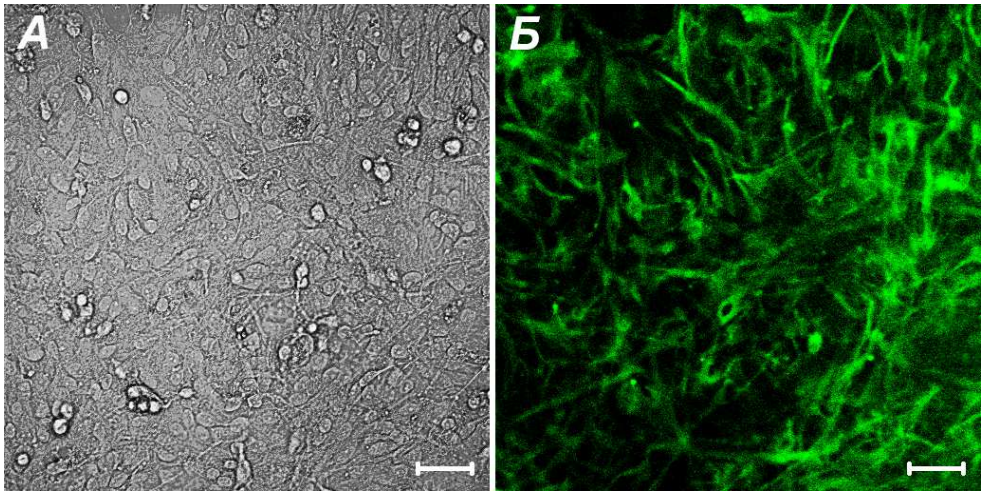


Рис. 3.1.9. Культура НК новорожденных крыс, 6 суток культивирования в присутствии СКВК. Экспрессия GFAP, маркера астроцитов. Световая (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия. Масштаб: 50 мкм.

На монослое выявлялось большое количество β-тубулин III-положительных клеток с морфологией нейронов; клетки локализовались в местах прикрепления агрегатов к поверхности лунки (рис 3.1.10.).

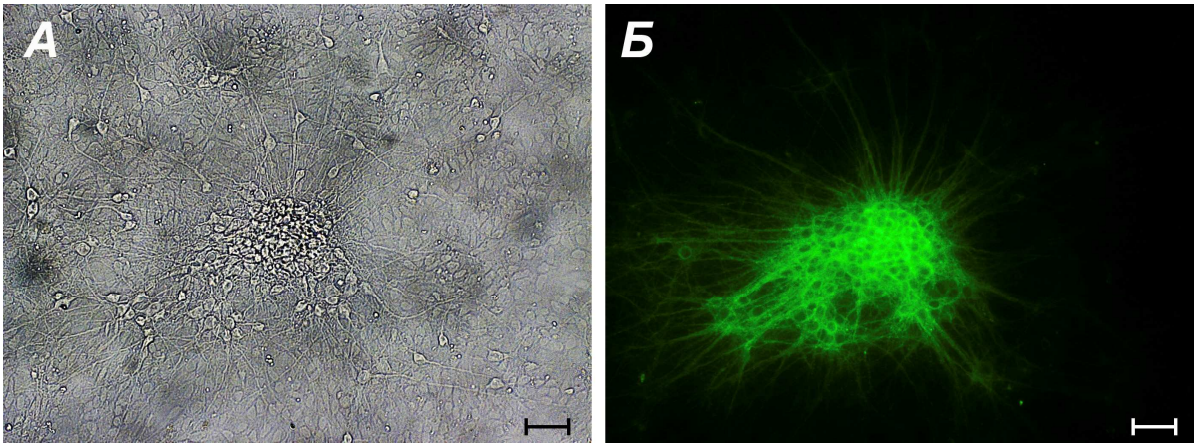


Рис. 3.1.10. Культура НК, 5 суток культивирования в присутствии СКВК. Формирование клетками прикрепленных к подложке агрегатов монослоя, на котором наблюдаются β-тубулин III-положительные клетки с морфологией нейронов. Световая (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия. Масштаб: 50 мкм.

Особенности формирования монослоя НК и его плотность зависели типа использованной сыворотки. Так, в среде, обогащенной ФСТ фирм «Биолот» и «Gold», участки монослоя начинали появляться на 5–6 сутки культивирования, а формирование конфлюэнтного монослоя, занимающего более 70% поверхности лунки, происходило в течение 10–12 суток культивирования (табл. 3.1). В присутствии в среде культивирования ФСТ «Sigma» клетки начинали формировать участки монослоя на 4–5 сутки, при этом конфлюэнтный монослой образовывался на 8–9 сутки культивирования. В то же время в присутствии СКВК клетки формировали конфлюэнтный монослой в течение 5–6 суток культивирования, т.е. на 2–6 суток раньше, чем в присутствии ФСТ.

Плотность формируемого клетками монослоя также зависела от типа используемой сыворотки. Так, в присутствии ФСТ фирм «Биолот» и «Gold»

плотность монослоя на 7 сутки культивирования НК новорожденных крыс составляла 996,0 ± 144,0 и 1041,0 ± 132,0 клеток на мм^2 (рис. 3.1.11).

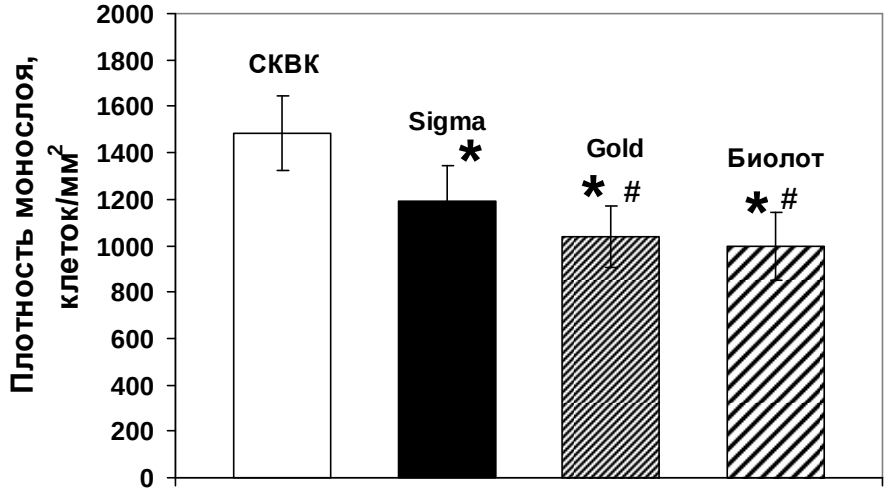


Рис. 3.1.11. Плотность монослоя НК, 7 суток культивирования в присутствии СКВК, ФСТ «Sigma», ФСТ «Gold» и ФСТ «Биолот». * – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12, обогащенной СКВК; $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12, обогащенной ФСТ «Sigma», $p < 0,05$.

В присутствии в среде культивирования НК ФСТ «Sigma», плотность монослоя составляла 1194,0 ± 153,0 клеток на мм^2. При культивировании НК на протяжении того же времени в присутствии СКВК плотность монослоя составляла 1485,0 ± 159,0 клеток на мм^2, что в среднем в 1,4 раза превышало количество клеток, которые составляли монослой в присутствии ФСТ.

Использование иммуноцитохимических маркеров позволило установить, что после достижения 70–80% конфлюэнта на монослое выявляются клетки, которые имеют признаки нейробластов (клетки округлой формы с светлой цитоплазмой, размерами 9–12 мкм, с короткими отростками) и являются положительными к β-тубулину III, маркеру незрелых нейрональных клеток (рис. 3.1.12). Это позволяет отнести их к незрелым клеткам-предшественникам нейрональной линии дифференцировки.

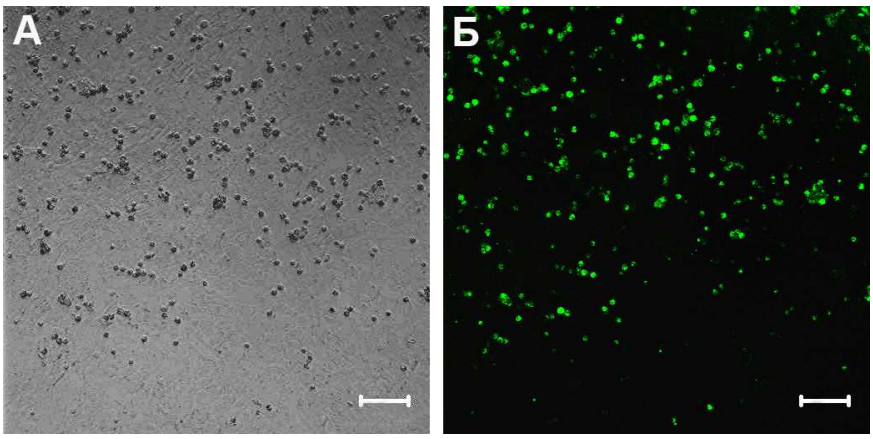


Рис. 3.1.12. Экспрессия β-тубулина III в культуре НК новорожденных крыс, 7 суток культивирования в присутствии СКВК. Световая (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия. Масштаб: 50 мкм.

Плотность β-тубулин III-положительных клеток на 9 сутки культивирования НК в присутствии СКВК составляла 1910,0 ± 185,0 на мм^2. В присутствии ФСТ различных производителей, β-тубулин III-положительные клетки появлялись на монослое на 2–4 суток позже, при этом максимальное количество данных клеток наблюдалось на 13 сутки культивирования, оно составляло 1630,0 ± 175,0, 1100,0 ± 114,0 и 920,0 ± 115,0 клеток на мм^2 для ФСТ «Sigma», «Gold» и «Биолот» соответственно. В процессе культивирования нейробластоподобные клетки формировали отростки. В среде культивирования в присутствии СКВК происходило увеличение размеров отростков и последующее формирование клеточной сети (рис. 3.1.13).



Рис. 3.1.13. Культура НК новорожденных крыс, 14 суток культивирования в присутствии СКВК. Формирование клеточной сети. Масштаб: 50 мкм.

Наличие НСК и ранних клеток-предшественников данного направления, которое определяют с помощью маркеров нестина и виментина, выявлялось уже на 9–12 сутки культивирования НК в среде, обогащенной СКВК. При этом на монослое выявлялись колонии нестин/виментин-положительных клеток (рис. 3.1.14). При культивировании НК в среде, обогащенной ФСТ, подобные колонии не выявлялись.

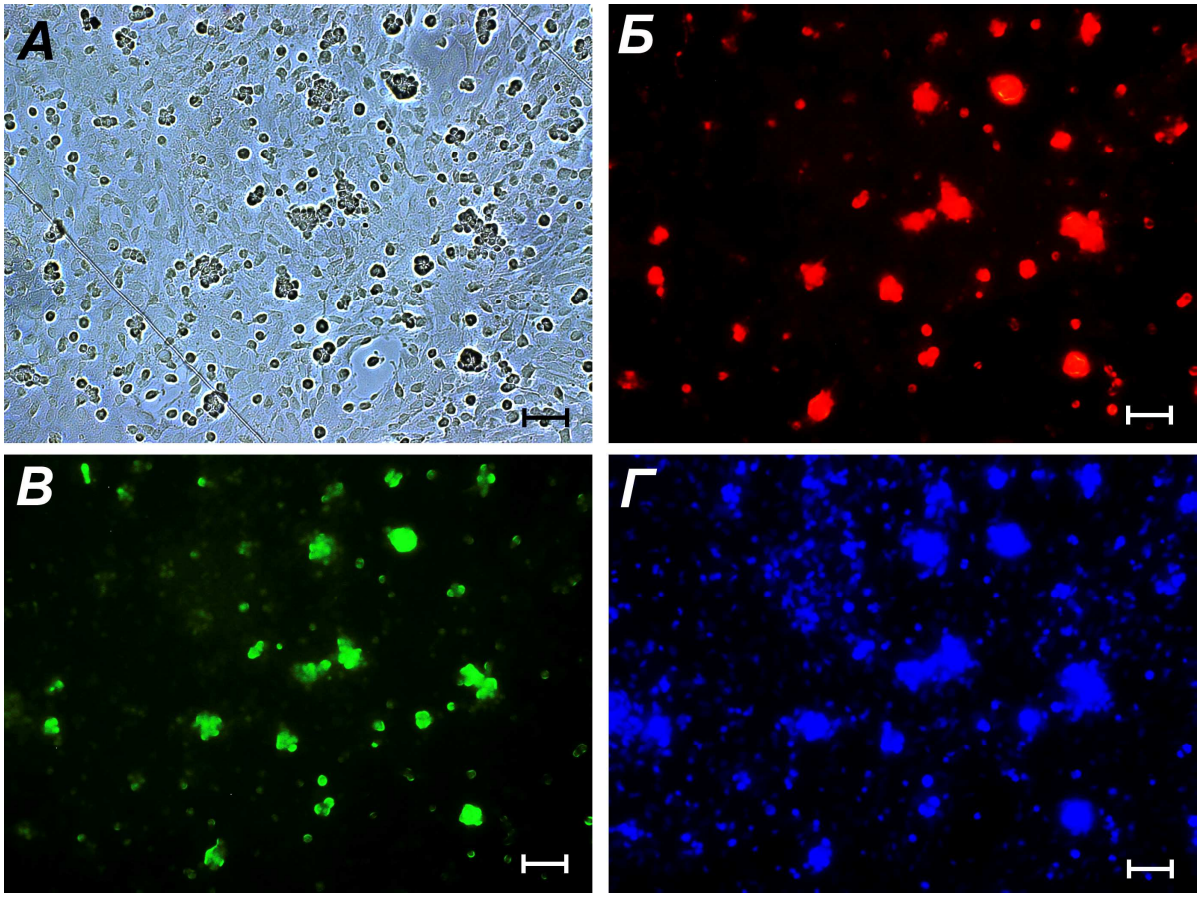


Рис. 3.1.14. Первичная культура НК новорожденных крыс, 12 суток культивирования в присутствии СКВК: А – нативный препарат, Б – экспрессия маркера СК нестина; В – экспрессия маркера ПК виментина; Г – окрашивание Hoechst. Масштаб: 50 мкм.

Колонии нестин/виментин-положительных клеток в процессе культивирования в среде DMEM/F-12 присутствии СКВК увеличивались в размерах и формировали между собой контакты с помощью длинных отростков (рис. 3.1.15).

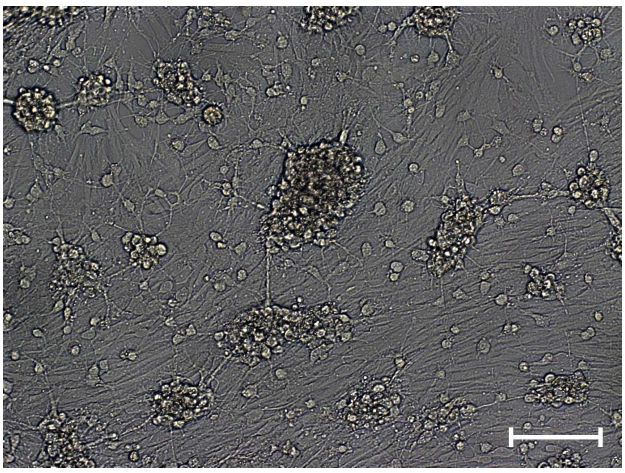


Рис. 3.1.15. Культура НК новорожденных крыс, 16 суток культивирования в присутствии СКВК. Формирование контактов между растущими колониями клеток. Масштаб: 50 мкм.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что НК, изолированные из ткани головного мозга новорожденных крыс, представляют собой гетерогенную суспензию, в состав которой входят окончательно дифференцированные и нейральные СК/ПК, которые в условиях культивирования *in vitro* способны пролиферировать и дифференцироваться в нейроны и клетки глии.

Представленные результаты также показывают, что для успешного культивирования гетерогенной суспензии НК новорожденных крыс необходимо присутствие в среде культивирования сыворотки. Продемонстрирована зависимость эффективности выживания, прикрепления, и распластывания дифференцированных, а также пролиферации нейральных СК и ПК от видовой принадлежности используемой сыворотки. Наличие в среде культивирования СКВК создает более благоприятные условия для эффективного функционирования окончательно дифференцированных, коммитированных, а также СК и ПК в условиях *in vitro* по сравнению с ФСТ, независимо от фирмы производителя. Очевидно, СКВК дополняет среду культивирования специфическими факторами роста, белками, гормонами в более оптимальном качественном и количественном соотношении, чем ФСТ.

Кроме того, в ФСТ, вероятно, отсутствуют или содержатся в недостаточном количестве факторы, которые способствуют пролиферации нейральных СК и ПК. На это указывает отсутствие формирования колоний СК и ПК в процессе культивирования НК новорожденных крыс в присутствии ФСТ. Действительно, парнокопытные, к которым принадлежат телята, филогенетически находятся довольно далеко от грызунов, к которым относятся крысы, и характеризуются видовыми различиями, что отражается на качественном и количественном составе сывороток их крови [18]. Помимо этого, на состав сыворотки также могут оказывать влияние условия среды обитания вида, которые у коров и крыс отличаются в достаточно большой степени. Следует также отметить, что использование СКВК позволяет получать стабильные воспроизводимые результаты культивирования НК новорожденных крыс.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать вывод о том, что добавление сыворотки крови взрослых крыс в среду культивирования создает более благоприятные условия для выживания, прикрепления, и распластывания дифференцированных, а также пролиферации нейральных СК и ПК новорожденных крыс в процессе культивирования *in vitro* по сравнению с фетальной сывороткой телят.

Результаты, представленные в данном подразделе, опубликованы в следующих работах: [15, 27, 28, 29, 44, 207].

3.2. Влияние экстрактов мозга и печени неонатальных крыс на поведение нервных клеток новорожденных крыс в культуре

В данном подразделе представлены результаты исследования молекулярно-массового распределения веществ белково-пептидной природы в экстрактах, полученных из тканей мозга и печени крыс различных стадий развития, а также результаты изучения поведения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в процессе их культивирования в присутствии экстрактов тканей мозга и печени неонатальных крыс. Исследования проводили

с использованием методов гель-проникающей хроматографии, спектрофотометрии, культивирования, иммуноцитохимического окрашивания.

3.2.1. Молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах тканей крыс в зависимости от стадии их развития.

В последнее время все большее значение в лечении целого ряда заболеваний приобретает использование тканевой и клеточной терапии. При этом трансплантация клеток и тканей используется как для замены поврежденных клеток, так и для стимуляции процессов репарации тканей собственными клетками. Существует достаточно большое количество данных как о положительном действии таких трансплантаций, так и об отсутствии клинического эффекта при их использовании [167]. Причина противоречивости получаемых результатов не вполне ясна. В основе процесса регенерации, как правило, находится действие (функционирование) СК и ПК (как трансплантированных, так и собственных), кроме того, положительный эффект трансплантации реализуется благодаря широкому спектру биологически активных веществ, которые данные клетки производят [204, 218]. Известно, что функционирование СК и ПК находится под влиянием большого количества растворимых регуляторных факторов, выделяемых как самими СК, так и клетками их микроокружения [91], и которые, как правило, представлены пептидами с молекулярными массами до 10 кДа, проявляющими физиологическую активность в ультрамалых дозах [34, 126].

Для понимания условий, при которых возможно достижение клинического эффекта в тканевой и клеточной терапии, необходимы идентификация данных факторов и механизмов их действия, выявление степени специфичности для различных тканей, а также изменения состава в зависимости от возраста. Одним из подходов при проведении таких исследований может быть изучение влияния экстрактов на клеточном уровне *in vitro*. При этом для выяснения механизмов реализации действия экстрактов возникает необходимость оценки их качественного и количественного состава.

Таким образом, для определения качественного и количественного состава экстрактов, действие которых предполагалось изучать в дальнейших экспериментах, мы исследовали молекулярно-массовое распределение веществ белково-пептидной природы в экстрактах мозга и печени неонатальных крыс (ЭМН, ЭПН) методом гель-проникающей хроматографии. Для выявления, изменяется ли состав экстрактов тканей животных в зависимости от стадии их развития, мы также исследовали молекулярно-массовое распределение веществ в экстрактах мозга и печени взрослых крыс (ЭМ-3м, ЭП-3м), в экстракте эмбрионального мозга (ЭМЭ), а также целого эмбриона крысы 15 суток гестации (тотальный экстракт эмбриона, ТЭЭ).

В результате были получены хроматограммы, которые отличались по количеству хроматографических пиков для каждого отдельного экстракта (рис. 3.2.1). Данный спектр пиков воспроизводился при проведении повторных экспериментов. На хроматограммах экстрактов одинаковыми буквенными символами обозначены пики, которые соответствуют веществам с одинаковой молекулярной массой (м.м.). При этом вещества с м.м. $\leq$ 5000 Да идентифицировали как низкомолекулярные пептиды, а вещества, м.м. которых превышала 12000 Да – как белки.

Хроматограммы экстрактов отличались качественным и количественным содержанием разделенных компонентов. Распределение пиков зависело от типа ткани и стадии развития животного (табл. 3.2.1). На всех хроматограммах присутствовали пик P, который соответствует веществам белковой природы с молекулярной массой $\geq$ 12000 Да, пик B (м.м.~1700 Да), и пик C (м.м. ~1200). Также во всех экстрактах, исключая печень 3-х месячных животных, присутствовали пики B_1 и D (м.м. 1400 Да и 900 Да).

ЭМ эмбрионов и новорожденных крыс, а также ТЭЭ характеризовались присутствием фракций со сходными молекулярными массами, кроме фракции с м.м. ~ 3500 Да, которая отсутствовала в ЭМ новорожденных крыс, и фракции с м.м. ~ 3800 Да, которая присутствовала в ТЭЭ и также отсутствовала в ЭМ новорожденных животных (рис. 3.2.1, табл. 3.2.1).

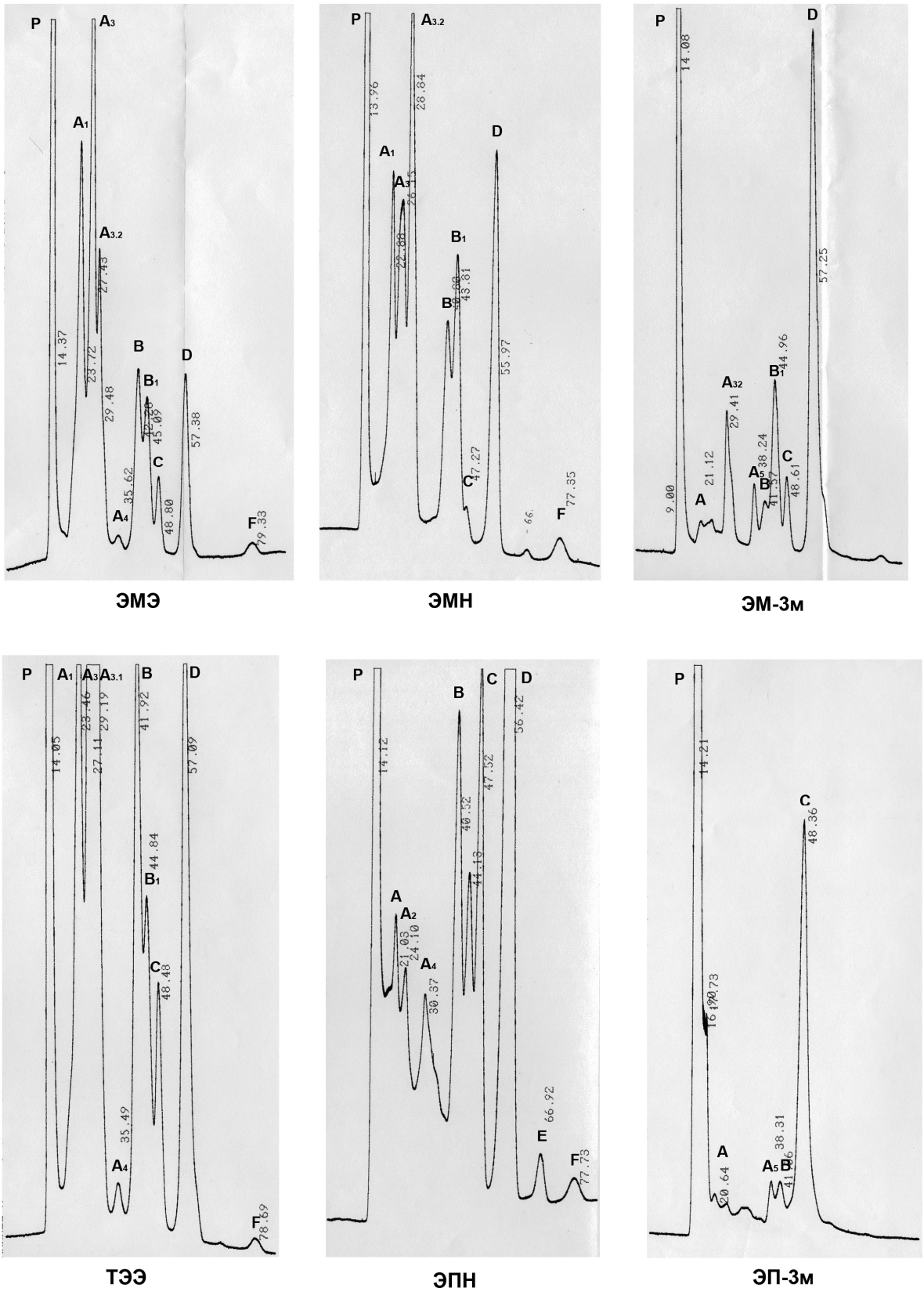


Рис. 3.2.1. Хроматограммы экстрактов тканей мозга (ЭМЭ – эмбрионов; ЭМН – новорожденных; ЭМ-3м – 3-месячных), печени (ЭПН – новорожденных; ЭП-3м – 3-месячных) и тотального экстракта эмбрионов (ТЭЭ) крыс.

Таблица 3.2.1.

Процентное содержание пептидных фракций в экстрактах тканей мозга и печени крыс различных стадий развития (n = 3, M ± m)

Фракция	М.м., Да	Относительное содержание фракций, %					
		ЭМЭ	ЭМН	ЭМ-3м	ТЭЭ	ЭПН	ЭП-3м
P	≥ 12000	42,1±3,0	42,7±2,7	50,2±2,9	41,8±3,1	62,2±4,5	75,8±5,0
A	6800	–	–	2,3±0,4	–	0,9±0,1	1,2±0,1
A_1	5800	13,9±0,8	7,4±0,8	–	8,8±0,9	–	–
A_2	5300	–	–	–	–	0,8±0,2	–
A_3	4500	16,6±0,9	9,3±0,7	–	14,7±0,8	–	–
$A_{3.1}$	3800	–	–	–	11,3±0,6	–	–
$A_{3.2}$	3600	7,1±0,7	13,5±0,5	5,5±0,6	–	–	–
A_4	3300	–	–	–	–	1,8±0,2	–
$A_{4.1}$	2500	1,1±0,2	–	–	0,37±0,09	–	–
A_5	1960	–	–	2,0±0,2	–	–	1,0±0,2
B	1700	6,4±0,8	5,9±0,7	2,0±0,15	7,6±0,9	5,0±0,4	1,4±0,3
B_1	1400	4,7±0,5	8,1±0,8	8,2±0,9	3,7±0,4	3,2±0,5	–
C	1200	2,2±0,3	0,6±0,09	2,6±0,4	2,5±0,4	5,3±0,6	16,2±0,7
D	900	5,5±0,5	11,6±0,2	27,2±0,3	8,9±0,15	19,9±0,2	–
E	680	–	–	–	–	0,5±0,07	–
F	550	0,4±0,1	1,0±0,2	–	0,2±0,05	0,4±0,08	–

ЭМ 3-месячных крыс значительно отличался от экстрактов мозга эмбрионов и новорожденных крыс. В нем отсутствовали пики A_1, A_2, A_3, $A_{3.1}$, A_4, $A_{4.1}$ и F с м.м. ~ 5800, 5300, 4500, 3800, 3300, 2500 и 550 Да соответственно. Кроме того, в ЭМ 3-месячных крыс присутствовали пики А и A_5 с м.м. ~ 6800 и 2000 Да, которые не выявлялись в экстрактах мозга эмбрионов и новорожденных животных (рис. 3.2.1, табл. 3.2.1).

Экстракты печени новорожденных и 3-месячных крыс значительно отличались по содержанию фракций как от экстрактов мозга, независимо от стадии развития животных, так и между собой (табл. 3.2.1). Так, экстракты

печени, независимо от возраста крыс, характеризовались более высоким, по сравнению с экстрактами мозга, содержанием белковой фракции. ЭП новорожденных крыс имел лишь одну пептидную фракцию, которая присутствовала в экстрактах мозга эмбрионов, новорожденных крыс и ТЭЭ (фракция F с м.м. 550 Да). ЭП 3-месячных крыс характеризовался самым высоким относительным содержанием белковой фракции (75,8%) и наименьшим количеством пептидных фракций, как по количеству, так и по их процентному содержанию. ЭП 3-месячных крыс содержал 4 фракции, из которых только две (B и C) являлись общими для всех исследованных экстрактов, и две (A и A_5) – общими с ЭМ 3-месячных крыс, из которых фракция А была также общей с ЭП новорожденных животных.

Согласно полученным данным, в исследованных экстрактах тканей мозга и печени присутствуют вещества с молекулярными массами, соответствующими массам регуляторных пептидов, содержащих от 5 до 55 аминокислот. Пептидно-белковый спектр экстрактов зависит от стадии развития животного и типа ткани, из которого получен экстракт. Наибольшее количество пептидных фракций присутствует в нервной ткани крыс различных стадий развития и тканях эмбрионов. Полученные данные также показали, что с увеличением возраста животных в экстрактах возрастает количество высокомолекулярных веществ (белков) и снижается количество низкомолекулярных (регуляторных пептидов).

3.2.2. Культивирование нервных клеток головного мозга новорожденных крыс в присутствии экстрактов мозга и печени неонатальных крыс.

На сегодняшний день представлено большое количество работ, подтверждающих процесс непрерывного образования новых НК в определенных областях постнатального головного мозга. Этот динамичный процесс находится под влиянием как положительного, так и отрицательного воздействия многочисленных факторов роста, цитокинов, нейротрансмиттеров как внутриклеточного, так и внеклеточного происхождения [87]. Высокий

уровень экспрессии различных факторов нейрального происхождения в различных структурах зрелого мозга говорит об их функциональной роли в процессах выживания, роста, метаболизма и пролиферации НК и клеток глии. Более того, многие исследования свидетельствуют о решающем влиянии данных факторов в выживании и развитии клеток [79, 142]. Одной из характерных особенностей данных факторов является специфичность действия, которая проявляется в узкой направленности влияния на поведение различных линий клеток нервной ткани. Это позволяет выдвинуть предположение о возможном влиянии веществ пептидной природы в составе экстракта ткани головного мозга на НК в культуре. Данное предположение, кроме того, подкрепляется результатами исследований, свидетельствующих о том, что экстракты различных тканей характеризуются ткане- и видоспецифичностью, а также высокой биологической активностью [11, 17]. Они обладают широким спектром действия, оказывая стимулирующий эффект на пролиферативные процессы и процессы регенерации в различных тканях и органах, способствуют восстановлению клеточного метаболизма и осуществляют поддержку клеточного гомеостаза [3, 7, 32]. Основываясь на данные о стимулирующем характере действия тканевых экстрактов, мы поставили целью данного исследования изучить влияние экстракта ткани мозга неонатальных крыс на поведение НК новорожденных крыс при культивировании. Для выявления специфичности действия ЭМ, мы обогащали среду культивирования НК экстрактом, полученным из ткани печени неонатальных крыс. Для выявления концентрационной зависимости действия ЭМ и ЭП, среду культивирования НК обогащали экстрактами в концентрации 0,1, 0,2 и 0,3 мг белка/мл. Контролем служили НК, которые культивировали в среде DMEM/F-12, обогащенной 10% СКВК, без добавления экстрактов.

Эксперименты проводили на свежевыделенной суспензии НК, жизнеспособность которых составляла 32,0 ± 2,9%. При культивировании НК в присутствии как сыворотки, так и экстрактов, через несколько часов после посева наблюдалось формирование свободно плавающих многоклеточных

агрегатов. Через 1 сутки культивирования в среде, обогащенной сывороткой, а также в присутствии ЭМ, независимо от концентрации, около 75% агрегатов приобретали более компактную упаковку и увеличивались в размерах за счет слияния. В среде, обогащенной ЭП в концентрации 0,2 и 0,3 мг белка/мл, количество агрегатов, которые уплотнялись и увеличивались в размерах, составляло 20–30% от их общего количества (рис. 3.2.2.1).

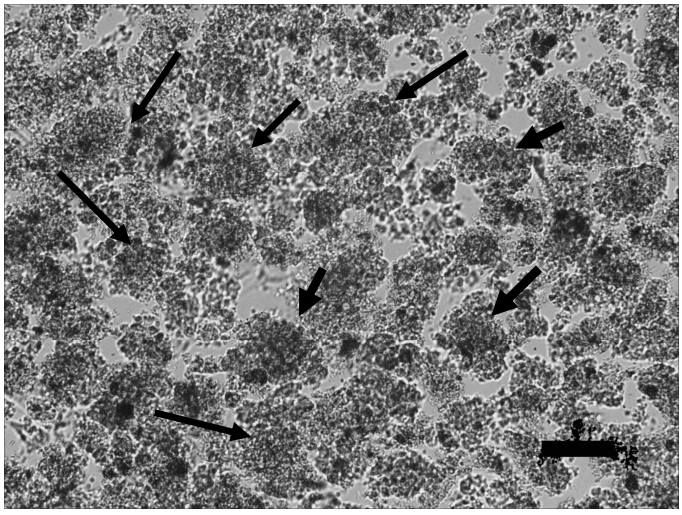


Рис. 3.2.2.1. Культура НК, 1 сутки культивирования в присутствии ЭП в концентрации 0,2 мг белка/мл. Формирование многоклеточных агрегатов (длинные стрелки), некоторые из которых приобретали более плотную упаковку клеток (короткие стрелки). Масштаб: 100 мкм.

Морфометрические измерения агрегатов после 2 суток культивирования НК показали, что агрегаты, которые культивировали в присутствии ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл, характеризовались меньшими, по сравнению с контролем, размерами (рис. 3.2.2.2). Средняя площадь сечения проекции агрегатов НК, которые культивировали в присутствии ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл, составляла 25525,0 ± 4138,0 мкм^2, тогда как средняя площадь сечения проекции агрегатов в контроле составляла 51586,0 ± 6804,0 мкм^2. Добавление в среду ЭМ, независимо от концентрации, и ЭП в концентрации 0,1 и 0,2 мг белка/мл, не оказывало влияния на размеры формируемых агрегатов по сравнению с контролем.

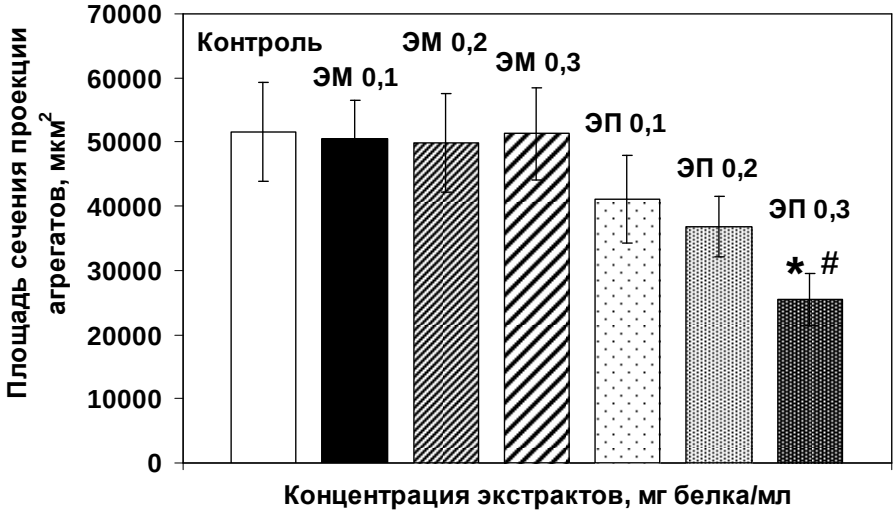


Рис. 3.2.2.2. Размер агрегатов НК, 2 суток культивирования в присутствии ЭМ и ЭП в разных концентрациях. * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,01$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с DMEM/F-12 с ЭМ, независимо от концентрации, $p < 0,05$.

В течение 4–5 суток культивирования в контроле, в присутствии ЭМ, независимо от концентрации, и ЭП в концентрации 0,1 мг белка /мл, большая часть клеток агрегатов (> 80%) прикреплялись к подложке (табл. 3.2.2).

Таблица 3.2.2.

Влияние различных концентраций ЭП и ЭМ на стадии культивирования НК новорожденных крыс (n = 6)

Экстракт	Концентрация, мг белка/мл	Стадии культивирования НК, сутки						
		Начало прикрепления агрегатов	Прикрепление >80% агрегатов	Миграция клеток	Начало формирования монослоя	Формирование 70% монослоя	Появление нейробластов	Формирование колоний
Контроль		1	4–5	3–4	2	6–7	6–7	9–13
ЭМ	0,1	1–2	4–5	4	2	7	6–7	13
	0,2	1–2	4–5	4	2	6–7	6–7	13
	0,3	1–2	4–5	3–4	2	5–6	6	9–11
ЭП	0,1	1–2	5	4	2	7	6–7	13
	0,2	3	–	5–6	4	7–8	6–7	–
	0,3	3	–	5–6	4	–	–	–

В течение всего времени культивирования НК в присутствии ЭП в концентрации 0,2 и 0,3 мг белка/мл к подложке прикрепилось не более 70% клеток агрегатов.

На 3–4 сутки культивирования в контроле, а также в присутствии ЭМ, независимо от концентрации, и ЭП в концентрации 0,1 мг белка /мл, клетки прикрепившихся агрегатов начинали мигрировать по подложке, распластываться и формировать участки монослоя (табл. 3.3.2, рис. 3.2.2.3).

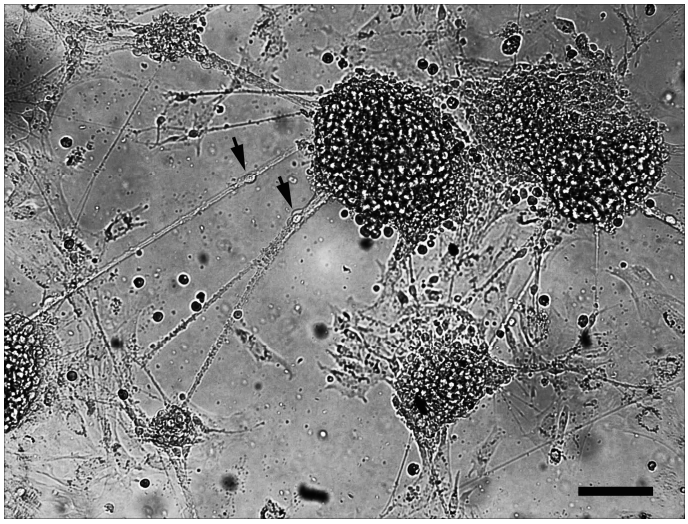


Рис. 3.2.2.3. Культура НК новорожденных крыс, 4 сутки культивирования в присутствии ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл. Миграция недифференцированных клеток по отросткам прикрепившихся к подложке агрегатов (стрелки). Прижизненное наблюдение. Масштаб: 50 мкм.

В присутствии в среде культивирования нервных клеток ЭП в концентрациях 0,2 и 0,3 мг белка/мл клетки агрегатов начинали мигрировать по подложке и формировать монослой на 2 суток позже (табл. 3.3.2).

Присутствие в среде культивирования НК экстракта мозга в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,3 мг белка/мл, а также ЭП в концентрации 0,1 и 0,2 мг белка/мл, не оказывало влияние на скорость формирования монослоя и его плотность. Плотность монослоя, который формировали клетки в присутствии ЭМ, независимо от концентрации, не отличалась от контроля, колеблясь в пределах 1467,0 ± 141,0 ÷ 1491,0 ± 177,0 клеток на мм^2 (рис. 3.2.2.4).

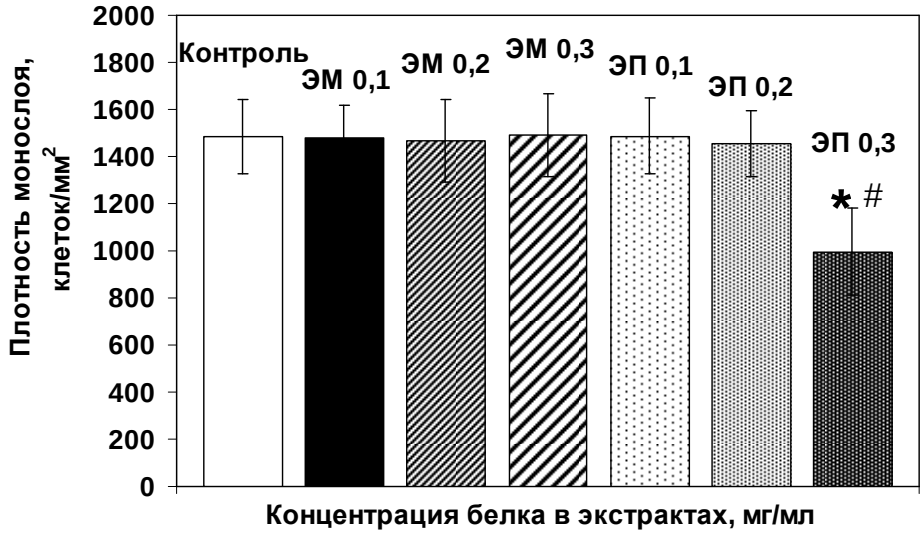


Рис. 3.2.2.4. Плотность монослоя НК новорожденных крыс, 7 суток культивирования в присутствии ЭМ и ЭП в различных концентрациях. * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12 в присутствии ЭМ, независимо от концентрации, и в присутствии ЭП в концентрации 0,1 и 0,2 мг белка/мл, $p < 0,05$.

В присутствии ЭП в концентрациях 0,1 и 0,2 мг белка/мл плотность монослоя составляла 1487,0 ± 159,0 и 1455,0 ± 141,0 клеток на мм^2 соответственно, и также не отличалась от контроля. В присутствии в среде культивирования ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл НК не были способны к формированию конфлюэнтного монослоя, при этом количество распластанных на подложке клеток составляло 996,0 ± 183,0 клеток на мм^2, что в 1,5 раза меньше, чем в контроле (рис. 3.2.2.4).

На 6–7 сутки культивирования НК в контроле, а также при добавлении в среду культивирования ЭМ, независимо от концентрации, и ЭП в концентрациях 0,1 и 0,2 мг белка/мл, на монослое появлялись β-тубулин III-положительные нейробластоподобные клетки (табл. 3.2.2, рис. 3.2.2.5), количество которых в процессе последующего культивирования увеличивалось. Так, на 10 сутки культивирования количество β-тубулин III-положительных клеток в контроле составляло 1895,0 ± 190,0 на мм^2. В

присутствии в среде культивирования НК ЭМ в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,3 мг белка/мл количество β-тубулин III-положительных клеток колебалось в пределах 1780 ± 163,0 ÷ 1980 ± 192,0 клеток на мм^2, не отличаясь от контроля. В присутствии в среде культивирования НК ЭП в концентрациях 0,1 и 0,2 мг белка/мл количество β-тубулин III-положительных клеток было ниже, чем в контроле, составляя 1196,0 ± 110,0 и 1210 ± 124,0 клеток на мм^2 соответственно. В присутствии ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл β-тубулин III-положительные клетки в культуре не выявлялись.

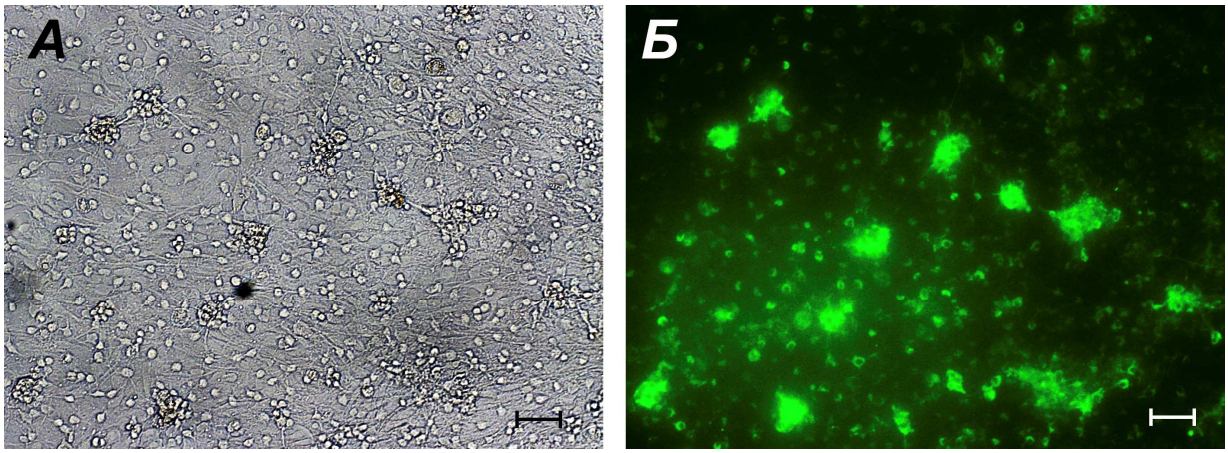


Рис. 3.2.2.5. Экспрессия β-тубулина III в культуре НК новорожденных крыс, 8 суток культивирования в присутствии ЭМ в концентрации 0,2 мг белка/мл. Световая (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия. Масштаб: 50 мкм.

После 11–13 суток культивирования в контроле, а также при добавлении в среду культивирования ЭМ в концентрациях 0,1 и 0,2 мг белка/мл и ЭП в концентрации 0,1 мг белка/мл на монослое появлялись колонии нестин/виментин-положительных недифференцированных клеток (табл. 3.2.2). В присутствии ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл появление колоний отмечалось уже на 9 сутки культивирования. При культивировании НК в присутствии ЭП в концентрациях 0,2 и 0,3 мг белка/мл колонии нестин/виментин-положительных клеток в культуре не выявлялись.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие в среде культивирования нервных клеток ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл приводит к увеличению скорости формирования монослоя и появления на нем β-тубулин III-положительных клеток и колоний нестин/виментин-положительных недифференцированных клеток. Добавление в среду культивирования ЭП в концентрации, превышающей 0,2 мг белка/мл, оказывает отрицательное влияние на формирование и прикрепление агрегатов, миграцию и распластывание составляющих агрегаты клеток, а также последующее формирование монослоя. Отсутствие нейробластов в культурах НК, среда которых содержала ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл, а также отсутствие колоний нестин/виментин-положительных клеток при его добавлении в концентрациях 0,2 и 0,3 мг белка/мл, свидетельствует об отрицательном влиянии ЭП на нейрогенез. Исходя из полученных данных, можно предположить, что экстракт ткани головного мозга крыс содержит биологически активные компоненты, которые оказывают положительное влияние на НК в культуре, в частности, на формирование клетками монослоя. При этом отрицательное влияние ЭП на прикрепление агрегатов НК, их миграцию, распластывание и формирование монослоя свидетельствуют о тканеспецифичности действия экстракта, основанном на присутствии веществ, не характерных для нервной ткани головного мозга. Это подтверждается полученными нами данными о молекулярно-массовом распределении пептидов в экстрактах тканей мозга и печени крыс. Показано, что пептидно-белковый спектр экстрактов зависит от типа ткани, из которого был получен экстракт, а также от стадии развития животных. Экстракты отличаются качественно и количественно по составу пептидных и белковых фракций. Вероятно, качественное и количественное соотношение компонентов экстракта, полученного из ткани печени, является не характерным для клеток головного мозга и свойственного им клеточного и внеклеточного микроокружения. Полученные результаты подтверждаются данными работ по изучению состава и биологической активности экстрактов различного происхождения. Показано

различие в аминокислотном составе компонентов экстрактов [38], а также участие данных компонентов в регуляции тканеспецифических функций [34]. Установлено, что фракции низкомолекулярных компонентов экстрактов различных тканей характеризуются стабильным набором веществ пептидной природы, что позволяет считать определенные группы тканеспецифических пептидов характеристикой соответствующей ткани [121, 126].

Полученные нами результаты также свидетельствуют о наличии в экстрактах веществ, молекулярные массы которых соответствуют массам регуляторных пептидов. Согласно [13, 38] к регуляторным пептидам относят вещества с м.м. до 10 кДа, проявляющие физиологическую активность в ультрамалых дозах. Тканеспецифичность действия регуляторных пептидов и их высокая эффективность в лечении ряда различных нарушений подтверждена многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями. В частности, применение церебролизина, препарата, получаемого из головного мозга свиней, который содержит низкомолекулярные биологически активные нейропептиды с молекулярной массой, не превышающей 10 кДа, способствует улучшению синаптической передачи, увеличению эффективности аэробного энергетического метаболизма НК и улучшению внутриклеточного синтеза белков [9, 110]. Повышение эффективности энергетического метаболизма нейронов, улучшение внутриклеточного синтеза белка, формирование новых межнейронных связей [5] показаны при использовании Кортексина, препарата, который получают путем ферментативного гидролиза тканей головного мозга телят или свиней, и для которого также характерно наличие активных нейропептидов с м.м. до 10 кДа [37]. Объяснить положительное влияние присутствия ЭМ в среде культивирования НК на скорость формирования монослоя и появление на нем β-тубулин III-положительных клеток и колоний нестин/виментин-положительных недифференцированных клеток, достаточно сложно**.** В ряде работ показано влияние пептидов различной природы на функционирование стволовых и прогениторных клеток. Так, пептиды, которые выделяли из органов крупного рогатого скота, способствовали пролиферации и

последующей дифференцировке МСК человека [14]. Показано влияние пептидов на пролиферативный и дифференцировочный потенциал клеток различных линий человека и мыши [21, 33, 129]. Предполагается, что влияние пептидов на пролиферативную активность и дифференцировку клеток осуществляется на основе регуляции экспрессии различных транскрипционных факторов путем связывания с промотерными областями их генов [141]. Проникновение пептидов в клетку происходит на основе механизма, близкого к пиноцитозу. Так, гидрофильные короткие пептиды могут связываться с гидрофильными группами фосфолипидов на внешней стороне цитоплазматической мембраны, группироваться и входить в клетку. Далее пептиды с помощью системы микрофиламентов цитоскелета или белков-переносчиков могут транспортироваться к ядру клетки. Внутренний диаметр нуклеопор составляет 42 нм, а внешний – 50 нм. Следовательно, они проницаемы для диффундирующих молекул с м.м. до 5 кДа [141].

Более высокое содержание низкомолекулярных веществ в экстрактах эмбрионов и новорожденных животных может свидетельствовать о большем количестве регуляторных факторов пептидной природы по сравнению с экстрактами, полученными из тканей взрослых животных. Клетки нервной ткани мозга ранних эмбрионов продуцируют и содержат большое количество медиаторов, гормонов, пептидов и других высокоактивных веществ, которые оказывают стимулирующее влияние на процессы репарации и метаболизм клеток [1]. Часть пептидов тканей новорожденных животных могут являться пептидами, характерными для тканей эмбрионов. Это подтверждается работами, в которых показано, что в неонатальном возрасте в мозге сохраняются достаточно высокие уровни различных нейротрофических факторов, продукция которых с возрастом постепенно уменьшается [30]. Нами также была выявлена зависимость действия экстрактов от используемой концентрации. Действительно, в ряде работ показано, что действие веществ пептидной природы характеризуется не только тканевой и органной специфичностью, но и выраженной зависимостью от используемых

концентраций [34, 35], однако механизм такого действия на сегодняшний день недостаточно изучен.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что присутствие в среде культивирования НК ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл оказывает положительное влияние на формирование монослоя и появление на нем β-тубулин III-положительных клеток и колоний нестин/виментин-положительных недифференцированных клеток. Добавление в среду культивирования ЭП в концентрации, превышающей 0,2 мг белка/мл, оказывает отрицательное влияние на формирование НК агрегатов и прикрепление их к подложке, миграцию, распластывание составляющих агрегаты клеток, формирование монослоя и появление на нем клеток, экспрессирующих β-тубулин III, а также колоний нестин/виментин-положительных недифференцированных клеток.

Результаты, которые представлены в данном подразделе, опубликованы в следующих работах: [45, 46, 47, 49].

3.3. Гипотермическое хранение первичной суспензии нервных клеток новорожденных крыс

В данном подразделе представлены результаты оценки влияния гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре. Исследования проводили с использованием методов культивирования, световой и флуоресцентной микроскопии, морфометрии и иммуноцитохимии.

3.3.1. Гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс в составе суспензии.

Исследование влияния гипотермии на НК представляет интерес для криобиологии и медицины. Изолированные НК новорожденных могут потенциально использоваться в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний и повреждений ЦНС [172], что требует разработки эффективных

способов хранения данных клеток. Как правило, изолированные клетки хранят при низких температурах, однако хранение в гипотермических условиях может дополнять или быть альтернативой криоконсервированию. Кроме того, изолированные НК новорожденных можно использовать в качестве модели для изучения влияния гипотермии на клетки нервной ткани. Гипотермия является перспективным методом уменьшения воспаления и активации восстановления нервных тканей, возникающих вследствие гипоксии и травм [89, 224], в частности у новорожденных, головной мозг которых может подвергаться действию гипоксии при рождении [124, 221]. Однако механизм нейропротекторного действия гипотермии, а также ее отдаленные последствия остаются недостаточно изученными. Исследование влияния условий гипотермии на поведение изолированных НК новорожденных в культуре *in vitro* позволит выяснить механизмы положительного влияния околонулевых температур на стволовые, прогениторные, нейрональные и глиальные клетки, а также установить возможные побочные эффекты, которые могут при этом возникать. Исходя из вышеизложенного, мы проводили исследование влияния ГХ изолированных НК головного мозга новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре *in vitro*.

Хранение НК осуществляли в среде DMEM/F-12 и ССР в присутствии или в отсутствии 10% СКВК. Среды хранения обогащали 10% гомологичной СКВК, основываясь на данных исследований, показавших, что замораживание гемопоэтических СК костного мозга в присутствии 10% гомологичной сыворотки увеличивает как число жизнеспособных клеток после замораживания, так и показатели колониеобразующей способности по сравнению с данными показателями клеток после хранения в среде, обогащенной ФСТ [114].

Суспензию НК в концентрации 40–50 млн/мл хранили при температуре +4 °С в течение 1, 2, 3 и 4 суток. Каждые 24 ч хранения производили оценку жизнеспособности, сохранности и метаболической активности НК. В культуре отмечали начало формирования клетками агрегатов, изменение их размеров и

плотности упаковки, прикрепление к подложке, миграцию клеток агрегатов по подложке, скорость формирования и размеры монослоя, время появления на монослое β-тубулин III-положительных клеток и колоний нестин/виментин-положительных недифференцированных клеток.

Жизнеспособность свежевыделенных НК составляла 31,1 ± 2,4%. После одних суток ГХ в ССР жизнеспособность НК резко увеличивалась, независимо от присутствия в среде хранения сыворотки. В присутствии сыворотки в ССР жизнеспособность клеток увеличивалась до 71,2%, а в ее отсутствии – до 57,0% (рис. 3.3.1.1). В процессе дальнейшего хранения в ССР жизнеспособность клеток достоверно не изменялась.

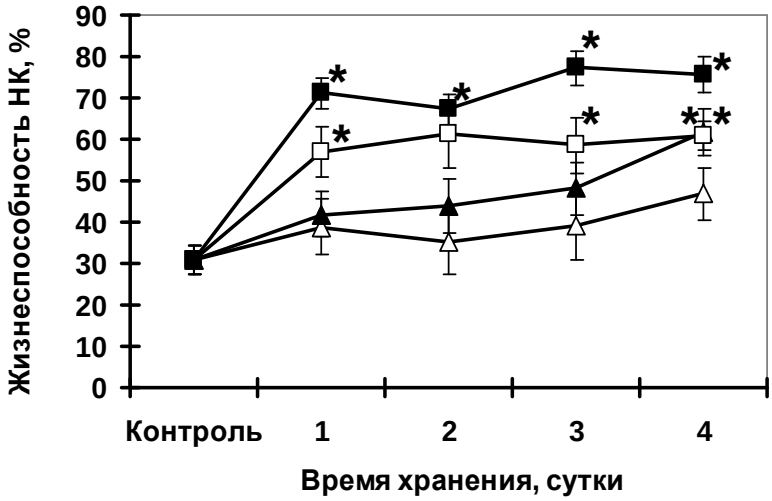


Рис. 3.3.1.1. Жизнеспособность НК при ГХ в разных средах: Δ – DMEM/F-12; ▲ – DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР; ■ – ССР с СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению со свежевыделенными НК, $p < 0,05$.

После 1 суток ГХ нервных клеток в DMEM/F-12 происходило незначительное увеличение их жизнеспособности независимо от присутствия сыворотки. При дальнейшем хранении НК в DMEM/F-12 в присутствии сыворотки их жизнеспособность постепенно увеличивалась, после 4 суток ГХ она составляла 61,7%. Хранение клеток в среде DMEM/F-12 без сыворотки на протяжении 2, 3 и 4 суток не приводило к достоверному изменению жизнеспособности.

Метаболическая активность НК в процессе ГХ постепенно снижалась независимо от среды хранения и присутствия в ней сыворотки (рис. 3.3.1.2). Наиболее выраженное снижение интенсивности формирования формазана, независимо от среды хранения и присутствия в ней сыворотки, наблюдалось после 1 суток ГХ. Так, после хранения НК в среде DMEM/F-12, в присутствии сыворотки или без нее, интенсивность формирования формазана снижалась в 1,5 раза. После одних суток хранения НК в ССР без сыворотки интенсивность формирования формазана снижалась в 1,8 раза, а после хранения клеток в ССР с сывороткой – в 2,7 раза.

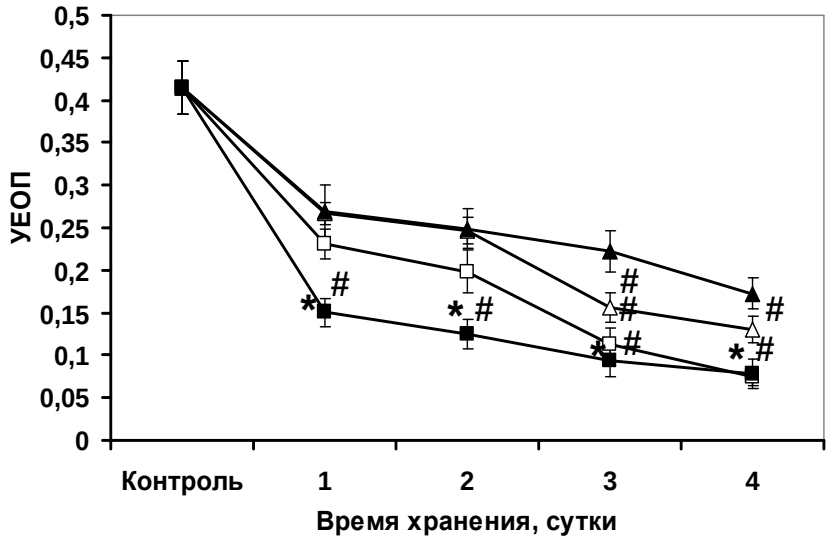


Рис. 3.3.1.2. Метаболическая активность НК по МТТ-тесту при ГХ в различных средах: Δ – DMEM/F-12; ▲ – DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР; ■ – ССР с СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению с DMEM/F-12 без СКВК, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с DMEM/F-12 с СКВК, $p < 0,05$.

Присутствие сыворотки в среде DMEM/F-12 оказывало незначительное положительное влияние на метаболическую активность НК после 3 и 4 суток ГХ. Так, в присутствии в среде DMEM/F-12 сыворотки интенсивность формирования клетками формазана после 3 и 4 суток ГХ снижалась в 1,9 и 2,4 раза по сравнению со свежевыделенными клетками, а в отсутствии в среде хранения сыворотки – в 2,7 и 3,2 раза соответственно (рис. 3.3.1.2).

После 2 суток ГХ нервных клеток в ССР без сыворотки скорость преобразования клетками МТТ в формазан снижалась в 2,1 раза, и в 3,3 раза – если в ССР присутствовала сыворотка. После 3 и 4 суток ГХ в ССР, независимо от присутствия в нем сыворотки, интенсивность формирования клетками формазана уменьшалась в 4 и 5,3 раза соответственно.

Данные по оценке жизнеспособности и метаболической активности НК в процессе ГХ отличаются. Результаты трипанового теста показали, что жизнеспособность НК увеличивалась на протяжении всего срока ГХ, независимо от среды хранения и присутствия в ней сыворотки. Результаты МТТ-теста показали, что в процессе ГХ происходило снижение интенсивности образования клетками формазана, что свидетельствует об уменьшении их метаболической активности. Данное различие можно объяснить тем, трипановый тест не в полной мере отображает морфофункциональное состояние клеток. Так, при наличии микроповреждений мембран, которые клетки получают в процессе выделения, краситель может проникать в клетку вместе с водой и внеклеточными растворами вследствие нарушения осмотического равновесия. Таким образом, клетки, проницаемые для красителя, могут считаться потенциально жизнеспособными [159]. Кроме того, в процессе хранения может происходить разрушение (лизис) погибших клеток, соответственно, общее количество клеток в суспензии уменьшается. Поэтому, несмотря на снижение количества живых клеток, отношение их количества к количеству погибших клеток увеличивается, таким образом, увеличивается жизнеспособность клеток суспензии, что также подтверждается данными по оценке сохранности клеток в процессе хранения.

Сохранность НК в процессе ГХ снижалась независимо от используемой среды и присутствия в ней сыворотки. После 4 суток хранения она составляла 30% от исходного значения (рис. 3.3.1.3). Как в присутствии, так и в отсутствии сыворотки в ССР происходило резкое снижение сохранности НК после 1 суток ГХ и ее незначительное снижение в процессе дальнейшего хранения. После 1 суток ГХ в ССР в присутствии сыворотки сохранность клеток снижалась на

65,3%, в течение последующих 3 суток хранения – на 9,8%. В отсутствии сыворотки в ССР в течение 1 суток хранения сохранность клеток снижалась на 57,5%, в течение последующих 3 суток хранения – на 17,9%. При ГХ нервных клеток в DMEM/F-12, независимо от присутствия в ней сыворотки, сохранность клеток интенсивно снижалась на протяжении всего срока хранения.

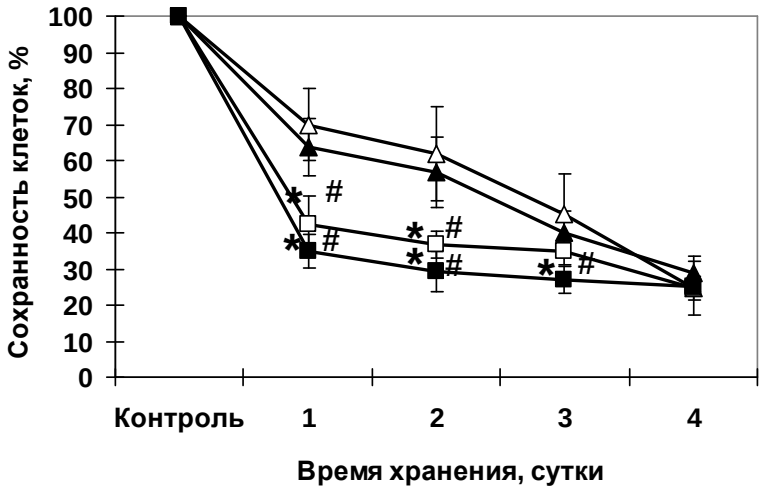


Рис. 3.3.1.3. Сохранность НК новорожденных крыс при ГХ в разных средах: Δ – DMEM/F-12; ▲– DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР; ■ – ССР с СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12 без СКВК, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12 с СКВК, $p < 0,05$.

Мы также проанализировали изменение в процессе ГХ количества жизнеспособных клеток, для чего использовали показатель, представляющий собой отношение клеток, не прокрашиваемых красителем трипановым синим, к общему количеству клеток, выраженный в процентах. Проведенный анализ показал, что количество непрокрашенных клеток в процессе ГХ постепенно уменьшалось (рис. 3.3.1.4). ГХ на протяжении 1 суток приводило к уменьшению количества НК, не прокрашиваемых трипановым синим, в 1,2 раза в среде DMEM/F-12 и в 1,2–1,3 раза в ССР, независимо от присутствия сыворотки. Хранение в течение 2 суток характеризовалось уменьшением количества непрокрашенных клеток в 1,3–1,4 раза в среде DMEM/F-12, и в 1,3–1,6 раза в ССР, независимо от присутствия в средах хранения сыворотки.

При ГХ на протяжении 3 суток количество непрокрашенных НК уменьшалось в 1,6–1,7 в среде DMEM/F-12 и в 1,5 раза – в ССР. При этом присутствие сыворотки оказывало незначительное положительное влияние на сохранение количества непрокрашенных клеток после 4 суток ГХ как в среде DMEM/F-12, так и в ССР. Так, хранение НК на протяжении 4 суток в DMEM/F-12 и ССР, содержащих сыворотку, приводило к уменьшению количества непрокрашенных клеток в 1,7 и 1,6 раза соответственно. Отсутствие сыворотки в средах характеризовалось уменьшением количества непрокрашенных клеток в 2,6 раза при хранении в среде DMEM/F-12 и в 2 раза – в ССР.

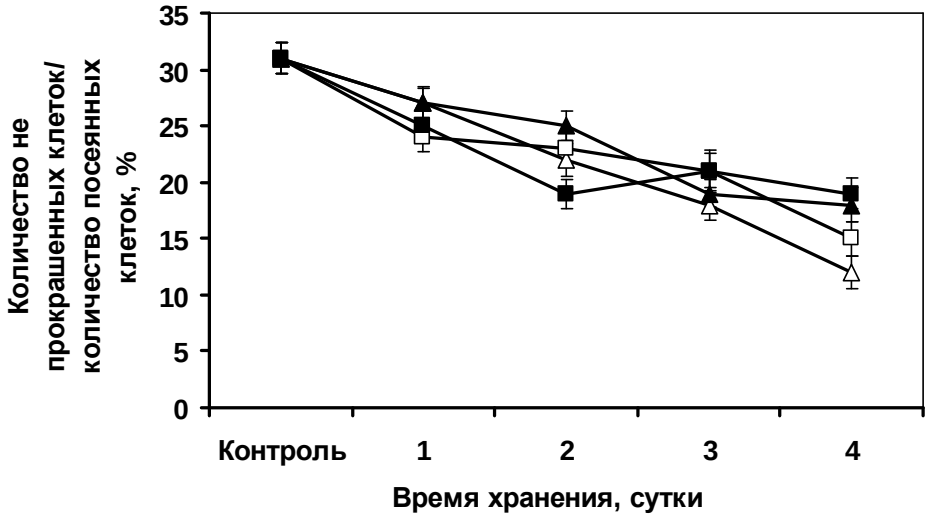


Рис. 3.3.1.4. Влияние ГХ на количество НК, которые не прокрашивались красителем трипановым синим: Δ – DMEM/F-12; ▲ – DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР; ■ – ССР с СКВК.

Исходя из того, что оценка жизнеспособности НК по исключению красителя трипанового синего и данные МТТ-теста могут не в полной мере отражать их структурно-функциональное состояние, мы проводили культивирование клеток. Свежевыделенные НК (контроль) через несколько часов после посева начинали формировать многоклеточные агрегаты, которые характеризовались мелкими размерами и рыхлой упаковкой клеток. В течение 2 суток культивирования агрегаты приобретали более компактную упаковку и увеличивались в размерах. В это же время агрегаты начинали активно

прикрепляться к подложке. На 4 сутки культивирования наблюдалось прикрепление более 80% агрегатов к подложке (табл. 3.3.1).

Таблица 3.3.1.

Влияние ГХ нервных клеток новорожденных крыс на стадии их культивирования (n = 5)

Время ГХ, сутки	Среда хранения	Стадии культивирования НК					
		Начало прикрепления агрегатов	Прикрепление > 80% агрегатов	Миграция клеток от агрегатов	Формирование 70% монослоя	Появление нейробластов	Формирование колоний
–	Контроль	1–2	4	4–5	5–6	5–6	9–13
1	DMEM/F-12	3	6	5	6–7	5–6	9–15
	DMEM/F-12 с СКВК	3	6	5	6–7	5–6	9–13
	ССР	3	6	5	6–7	5–6	9–15
	ССР с СКВК	–	–	–	–	–	–
2	DMEM/F-12	–	–	–	–	–	–
	DMEM/F-12 с СКВК	3	7	6	8	7–8	9–10
	ССР	3	10	6	9–10	8	12
	ССР с СКВК	–	–	–	–	–	–
3	Все среды	–	–	–	–	–	–
4	Все среды	–	–	–	–	–	–

После прикрепления клетки агрегатов формировали отростки, мигрировали, распластывались и формировали участки монослоя (рис. 3.3.1.5). На 5–6 сутки культивирования на монослое, состоящем из клеток глии, появлялись недифференцированные β-тубулин III-положительные клетки, которые имели морфологию нейробластов (табл. 3.3.1).

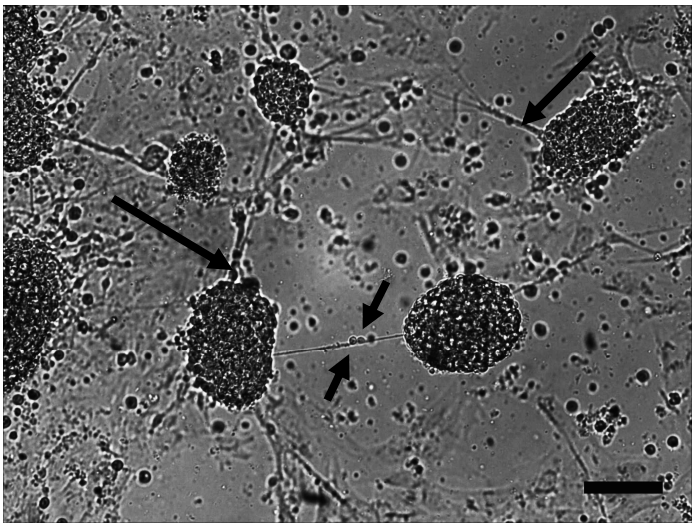


Рис. 3.3.1.5. Культура НК новорожденных крыс, 4 суток культивирования. Формирование отростков (длинные стрелки) и миграция клеток (короткие стрелки) прикрепленных агрегатов НК. Масштаб: 100 мкм.

Поведение в культуре НК, которые подвергались ГХ на протяжении 1 суток в среде DMEM/F-12 с сывороткой и без нее, а также в ССР без сыворотки, практически не отличалось от контроля (табл. 3.3.1). Агрегаты начинали прикрепляться к подложке на 3 сутки культивирования. В это же время наблюдалось формирование мигрирующими и распластывающимися клетками прикрепленных агрегатов небольших участков монослоя. Формирование конфлюэнтного монослоя происходило на 1–2 суток позже, чем в контроле. Однако плотность монослоя, которые формировали клетки в культуре после ГХ в DMEM/F-12 без и с сывороткой и в ССР без сыворотки, не отличалась от соответствующего показателя в контроле, составляя 1422,0 ± 156,0, 1458,0 ± 153,0 и 1440 ± 162 клеток на мм^2 соответственно (рис. 3.3.1.6).

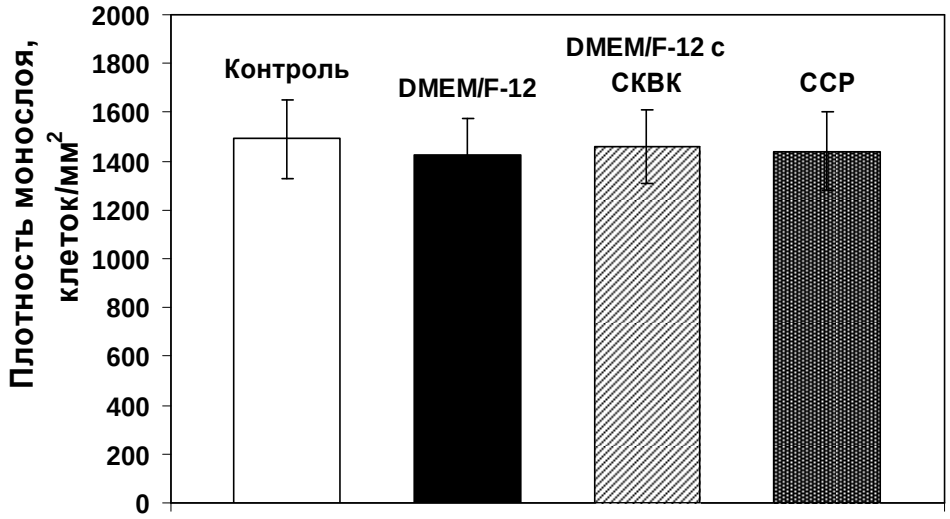


Рис. 3.3.1.6. Плотность монослоя НК новорожденных крыс после 1 суток ГХ в средах различного состава, 7 суток культивирования.

На 5–6 сутки культивирования на монослое, сформированном клетками глии, как и в контроле, появлялись β-тубулин III-положительные клетки с морфологией нейробластов (табл. 3.3.1).

В культурах НК, которые подвергались ГХ на протяжении 1 суток в ССР с сывороткой, происходило образование мелких рыхлых агрегатов, структура и размеры которых в процессе культивирования не изменялись, к подложке агрегаты не прикреплялись. При этом наблюдалось прикрепление и распластывание единичных клеток, которые характеризовались глиальной морфологией. В процессе культивирования количество распластанных клеток не изменялось, монослой они не формировали.

НК, которые подвергались ГХ на протяжении 2 суток в среде DMEM/F-12 с сывороткой и в ССР без сыворотки, подобно свежевыделенным клеткам, формировали агрегаты в течение 1 суток культивирования. Однако прикрепляться к подложке агрегаты начинали позже, чем в контроле (табл. 3.3.1). Прикрепление к подложке большей части агрегатов НК, хранившихся в DMEM/F-12 с сывороткой, происходило на 2 суток позже по сравнению со свежевыделенными клетками. После 2 суток хранения в ССР в культуре около 70% агрегатов НК прикреплялось к подложке на 10 сутки

культивирования, остальные агрегаты к подложке не прикреплялись и в процессе дальнейшего культивирования погибали. После прикрепления агрегатов к подложке составляющие их клетки мигрировали, распластывались и начинали формировать монослой. Время появления участков монослоя не отличалось от контроля, однако скорость его формирования была ниже. Так, в культурах НК, которые хранили в среде DMEM/F-12 в присутствии сыворотки и в ССР без сыворотки, на 6 сутки культивирования монослой занимал 45% и 30% площади лунки соответственно. Формирование конфлюэнтного монослоя клетками, которые хранили в DMEM/F-12 в присутствии сыворотки, происходило на 8 сутки, а в ССР без сыворотки – на 9–10 сутки культивирования.

Плотность монослоя в культуре НК новорожденных крыс, которые хранили на протяжении 2 суток в среде DMEM/F-12 с сывороткой, составляла 1302,0 ± 189,0 клеток мм^2, что в 1,2 раза меньше, чем в контрольных образцах (рис. 3.3.1.7). После хранения НК в ССР без сыворотки плотность монослоя, который клетки формировали в культуре, составляла 1071,0 ± 183,0 клеток на мм^2, что в 1,4 раза меньше, чем в контроле.

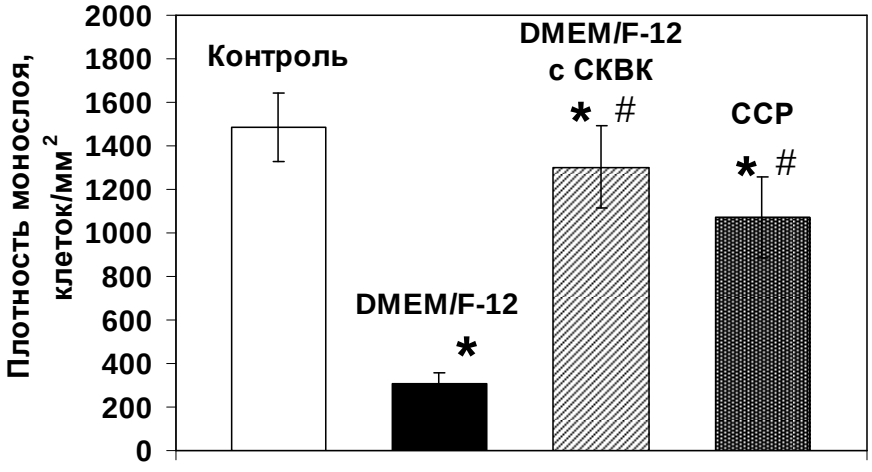


Рис. 3.3.1.7. Плотность монослоя НК после 2 суток ГХ в средах различного состава, 10 суток культивирования. * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12 без СКВК, $p < 0,05$.

При последующем культивировании НК, которые хранили на протяжении 2 суток в DMEM/F-12 с сывороткой и в ССР без сыворотки, на монослое появлялись β-тубулин III-положительные клетки с морфологией нейробластов.

После 2 суток хранения НК в DMEM/F-12 без сыворотки на поверхности лунок распластывалось небольшое количество клеток (рис. 3.3.1.7), которые не обеспечивали формирование монослоя, экспрессия β-тубулина III, нестина и виментина не выявлялась.

НК, которые хранили на протяжении 2 суток в ССР с сывороткой, в процессе культивирования формировали мелкие, рыхлые агрегаты, которые к подложке не прикреплялись и в конечном итоге погибали (табл. 3.3.1).

При культивировании НК, которые хранили в гипотермических условиях на протяжении 3 и 4 суток, независимо от среды хранения и присутствия в ней сыворотки, происходило образование мелких рыхлых агрегатов, которые к подложке не прикреплялись и в процессе культивирования погибали (рис. 3.3.1.8). Небольшое количество единичных клеток прикреплялись к подложке, но они не распластывались и монослой не формировали.

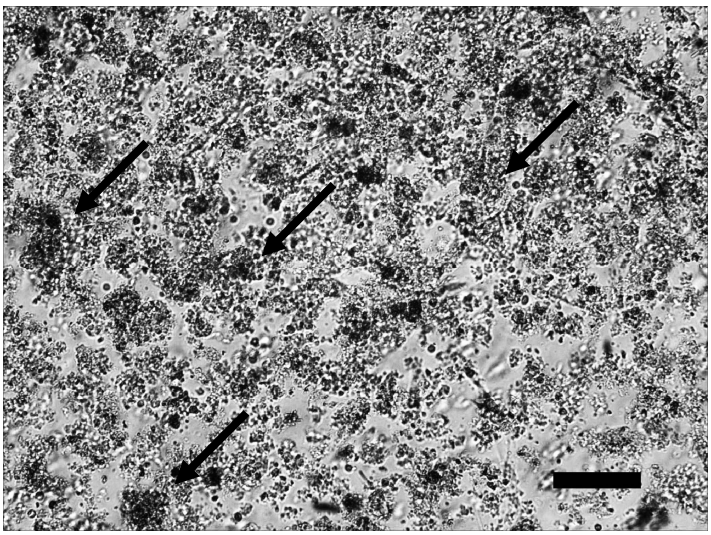


Рис. 3.3.1.8. Культура НК новорожденных крыс после 3 суток ГХ в DMEM/F-12 с СКВК, 4 суток культивирования. Плавающие рыхлые агрегаты (стрелки). Прижизненное наблюдение. Масштаб: 100 мкм.

Как уже было описано ранее, на 9–13 сутки культивирования на монослое, образованном свежевыделенными НК, появлялись колонии недифференцированных клеток, большинство которых были нестин/виментин-положительными. Время появления колоний в культурах НК, которые подвергались ГХ в течение 1 и 2 суток, практически не отличалось от времени появления колоний в контрольных культурах (табл. 3.3.1). Следует отметить, что после 1 суток ГХ колонии нестин/виментин-положительных клеток формировались в культурах НК, которые хранили в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия в ней сыворотки (рис. 3.3.1.9), и в ССР без сыворотки. Если срок ГХ составлял 2 суток, то колонии нестин/виментин-положительных клеток выявлялись только в культурах НК, которые хранили в среде DMEM/F-12 в присутствии сыворотки и в ССР без сыворотки.

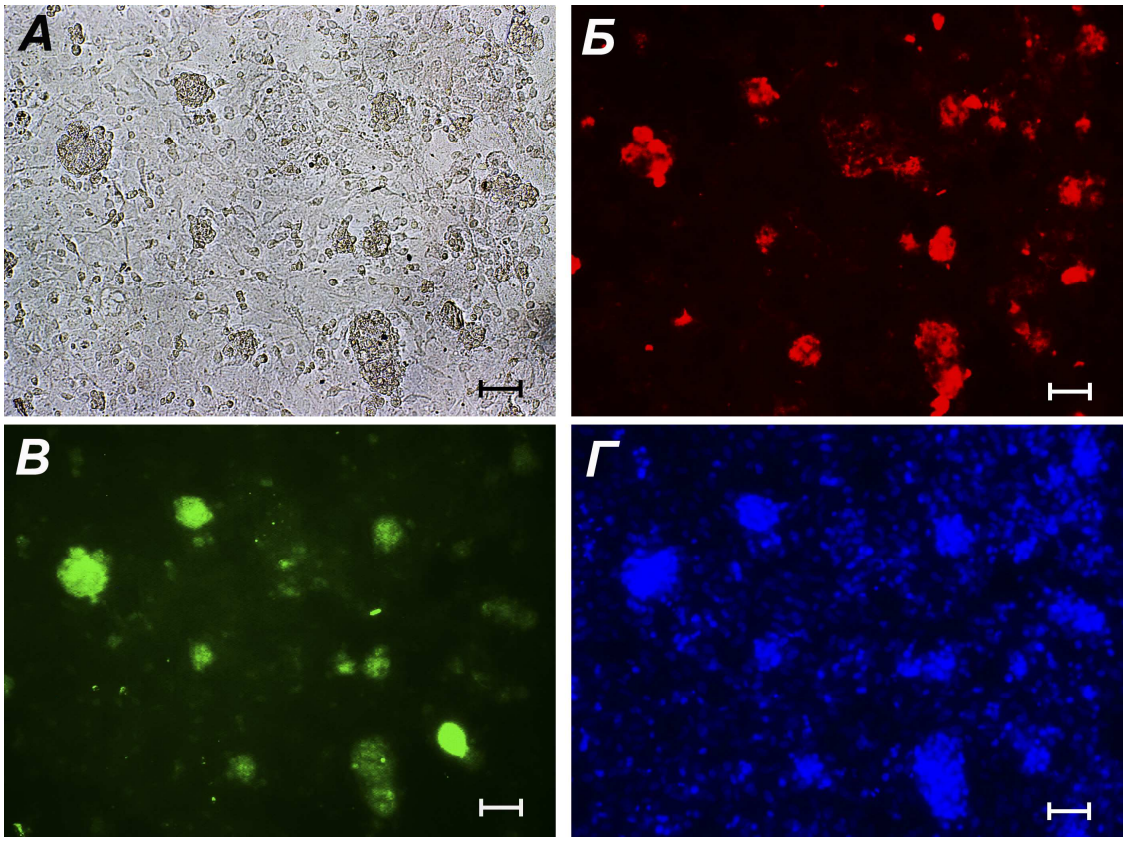


Рис. 3.3.1.9. Культура НК новорожденных крыс после 1 суток ГХ в среде DMEM/F-12 в присутствии СКВК, 14 суток культивирования: А – нативный препарат; Б – экспрессия маркера СК нестина; В – экспрессия маркера ПК виментина; Г – окрашивание Hoechst. Масштаб: 50 мкм.

В процессе культивирования происходило увеличение количества и размеров колоний недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток (рис. 3.3.1.10).

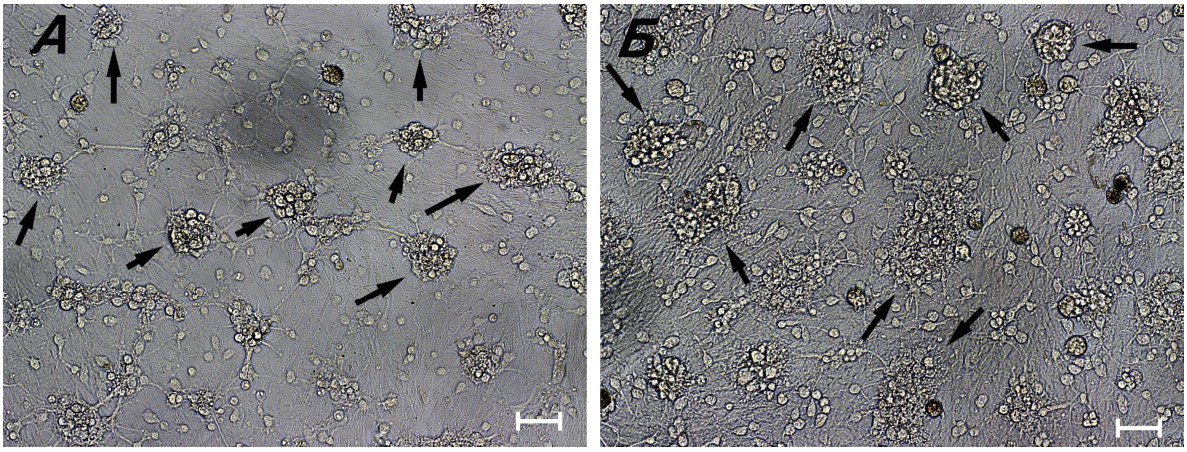


Рис. 3.3.1.10. Культура НК новорожденных крыс после 1 суток ГХ в среде DMEM/F-12 в присутствии СКВК. Формирование колоний недифференцированных клеток (стрелки): А – 16 сутки культивирования НК после появления на монослое колоний нестин/виментин-положительных клеток; Б – 20 сутки культивирования НК после появления на монослое колоний нестин/виментин-положительных клеток. Масштаб: 50 мкм.

Измерение площади сечения проекции колоний недифференцированных клеток показало, что размеры колоний в культуре НК, которые хранили на протяжении 1 суток в DMEM/F-12 с сывороткой, превышали размеры колоний, которые формировались в культуре свежевыделенных клеток (рис. 3.3.1.11). Так, на 24 сутки культивирования площадь сечения проекции колоний в контрольных культурах составляла 2039,0 ± 101,0 мкм^2, а в культурах НК, которые подвергались хранению в среде DMEM/F-12 с сывороткой – 3268,0 ± 136,0 мкм^2 (рис. 3.3.1.11). Размеры колоний НК, которые хранили в среде DMEM/F-12 без сыворотки, и в ССР без добавления сыворотки, достоверно не отличались от размеров колоний в культурах свежевыделенных клеток, составляя на 24 сутки культивирования 1716,0 ± 78,0 мкм^2 и 2276,0 ± 112,0 мкм^2 соответственно.

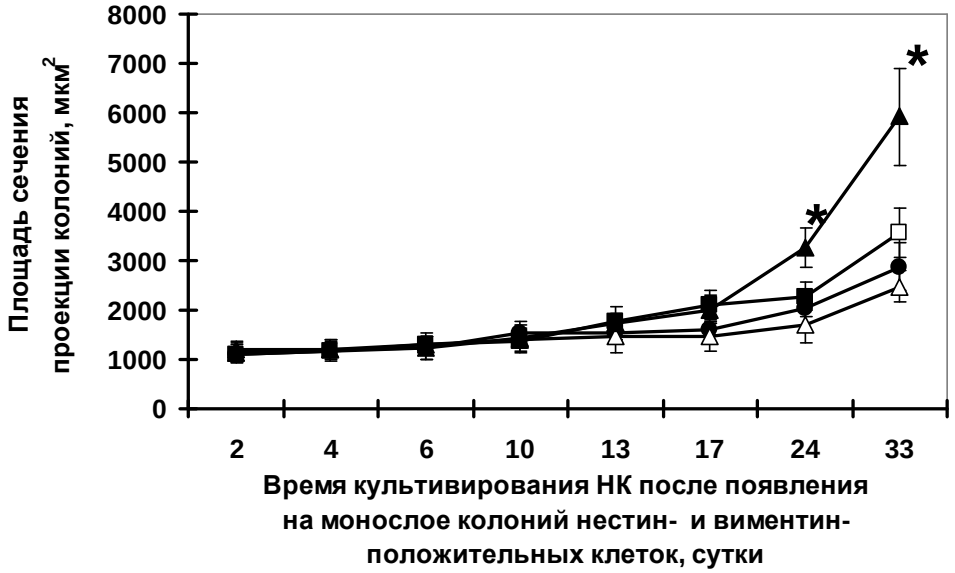


Рис. 3.3.1.11. Размер колоний нестин- и виментин-положительных клеток в культуре свежевыделенных НК и в культурах НК после 1 суток ГХ в средах различного состава: ● – контроль; Δ – DMEM/F-12 без СКВК; ▲ – DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР без СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

После 2 суток ГХ колонии недифференцированных клеток формировались в культурах НК, которые хранили в среде DMEM/F-12 с сывороткой и в ССР без сыворотки. Количество колоний в процессе культивирования увеличивалось незначительно, также как и их размеры, которые были меньшими, чем размеры колоний в культурах свежевыделенных клеток. Так, через 13 суток культивирования НК, которые подвергались 2 суткам ГХ в DMEM/F-12 с сывороткой и в ССР без сыворотки, площадь сечения проекции колоний составляла 1192,0 ± 74,0 мкм^2 и 1079,0 ± 72,0 мкм^2 соответственно, тогда как в культуре свежевыделенных НК данный показатель составлял 1533,0 ± 81,0 мкм^2 (рис. 3.3.1.12). При дальнейшем культивировании НК, которые подвергались 2 суткам ГХ в DMEM/F-12 с сывороткой и в ССР без сыворотки, размеры колоний недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток не увеличивались.

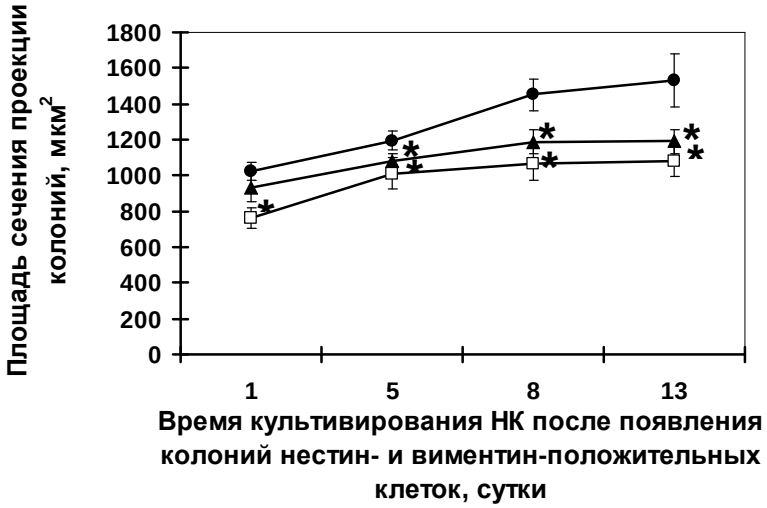


Рис. 3.3.1.12. Размер колоний нестин- и виментин-положительных клеток в культуре свежевыделенных НК и в культурах НК после 2 суток ГХ в средах различного состава: ● – контроль; ▲ – DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР без СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Полученные данные показали, что в процессе ГХ происходит увеличение жизнеспособности НК, определенной по трипановому тесту, и снижение сохранности клеток. Это позволяет предположить, что рост жизнеспособности НК в процессе ГХ происходит за счет интенсивной гибели клеток, вероятно, летально поврежденных при выделении. При этом процесс гибели наиболее интенсивен в течение 1 суток хранения и не зависит от используемой среды и присутствия в ней сыворотки. Метаболическая активность НК также снижалась в течение всего времени ГХ. При этом наиболее интенсивное снижение метаболической активности клеток также происходило в течение 1 суток хранения, независимо от среды хранения и присутствия в ней сыворотки. Результаты МТТ-теста коррелирует с данными по изменению в процессе ГХ сохранности НК. Было выявлено, что после хранения в среде DMEM/F-12 жизнеспособность и сохранность НК сохраняются на достоверно более высоком уровне по сравнению с данными показателями после хранения в ССР.

Количество жизнеспособных клеток, которые не прокрашиваются трипановым синим, также уменьшается в течение времени ГХ. Это достаточно медленный и равномерный процесс, который практически не зависит от среды

хранения. На протяжении 3 суток за каждые сутки хранения количество не прокрашенных клеток в среднем уменьшается на 17%. Присутствие сыворотки в среде при ГХ клеток на протяжении 4 суток как в DMEM/F-12, так и в ССР, оказывает выраженное положительное влияние на способность клеток исключать трипановый синий.

Проведенные исследования также показали, что максимальным временем ГХ, в течение которого НК, изолированные из ткани мозга новорожденных крыс, сохраняют свои свойства на уровне свежевыделенных, является 2 суток: дифференцированные НК прикрепляются и распластываются, а СК и ПК пролиферируют и дифференцируются. При этом оптимальной средой хранения является DMEM/F-12 с сывороткой, что можно объяснить сходством ее состава с внутриклеточной средой организма. Положительное влияние сыворотки, исходя из литературных данных, можно объяснить следующим. Альбумин сыворотки способствует увеличению онкотического давления коллоидов среды хранения. Повышенное коллоидное онкотическое давление раствора приводит к дегидратации клеток, что, в свою очередь, способствует уменьшению набухания клеток в процессе хранения [52].

НК, которые хранили ССР с сывороткой, утрачивают способность к формированию агрегатов, клетки которых пролиферируют и прикрепляются к подложке в условиях *in vitro*. Это можно объяснить сочетанным действием на плазматическую мембрану сахарозы и белков сыворотки. Известно, что в сахарозном микроокружении увеличивается отрицательный поверхностный заряд плазматической мембраны [66], что повышает степень связывания белков с мембраной. При этом адсорбция изолированных белков вызывает локальные перемещения липидов в мембране, их концентрирование в местах связывания белков и формирование доменов, что, в свою очередь, приводит к нестабильности плазматической мембраны и может быть причиной латерального фазового разделения мембраны [156], в результате которого нарушаются ее барьерные свойства и клетки погибают. Кроме того, изменение локализации липидов в мембране может приводить к трансформации ее

архитектуры и затруднять связывание регуляторных белков с рецепторами, а также препятствовать прикреплению клеток к подложке.

Было также показано, что ГХ на протяжении 1 суток, несмотря на снижение количества непрокрашенных клеток, не приводит к существенному ухудшению поведения НК в процессе их культивирования. При этом лишь замедляется скорость прикрепления агрегатов, сформированных данными клетками. Это можно объяснить, с одной стороны, тем, что жизнеспособность НК, определенная по трипановому тесту, лишь частично коррелирует с функциональной активностью клеток, а с другой – развитием в процессе ГХ нелетальных повреждений, восстановление которых требует определенного времени в процессе их культивирования. При хранении НК на протяжении 2 суток количество нелетальных повреждений увеличивается, что проявляется в увеличении времени прикрепления агрегатов к подложке и снижении скорости формирования монослоя. Появление нейробластоподобных клеток и колоний СК и ПК в те же сроки, что и у свежевыделенных клеток, указывает на их сохранность при хранении в гипотермических условиях на протяжении 2 суток. ГХ нервных клеток новорожденных крыс в исследованных средах на протяжении 3 и более суток приводит к их гибели: клетки утрачивают способность к формированию агрегатов, прикреплению и распластыванию.

3.3.2. Влияние экстрактов мозга и печени неонатальных крыс на выживаемость нервных клеток новорожденных крыс в составе суспензии после гипотермического хранения.

Для эффективного ГХ необходимо создание условий, при которых НК будут подвергаться минимальным повреждениям в процессе хранения. Известно, что для нормального функционирования клеток важным является их микроокружение, включающее как различные клетки, так и факторы роста, молекулы адгезии и внеклеточного матрикса [54, 84, 88, 162]. Во время процедуры выделения происходит потеря микроокружения НК, что может приводить к повреждению и гибели клеток, 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 [51, 69, 189, 222], добавление которых в среды для ГХ может способствовать повышению эффективности хранения изолированных НК в гипотермических условиях. Однако как сыворотка, так и экстракты могут содержать недостаточное количество специфических для данных клеток факторов, что будет способствовать снижению времени хранения НК. Кроме того, использование сыворотки ограничивается такими ее свойствами, как цитотоксичность и иммуногенность. А биологически активные вещества, которые содержатся в экстрактах различных тканей, характеризуются значительной вариабельностью качественного и количественного состава [11]. Поэтому при использовании экстрактов в качестве источников, содержащих элементы утерянного микроокружения, необходимо учитывать не только их видо-, но также и тканеспецифичность. Исходя из вышеизложенного, следующим этапом нашей работы явилось исследование влияния экстрактов ткани мозга и печени новорожденных крыс на эффективность ГХ изолированных НК головного мозга новорожденных крыс.

Для ГХ использовали гетерогенную суспензию свежевыделенных НК, жизнеспособность которых составляла в среднем 31,1 ± 2,4%. Хранение НК осуществляли в среде DMEM/F-12 и ССР при добавлении 10% СКВК или ЭМ/ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл. Суспензию НК в концентрации 40–50 млн/мл хранили при температуре +4 °С в течение 1, 2, 3 и 4 суток. В качестве контроля использовали среду DMEM/F-12, обогащенную СКВК. Каждые 24 ч хранения оценивали жизнеспособность и сохранность НК по исключению красителя трипанового синего, а также метаболическую активность клеток на основе МТТ-теста. В культуре отмечали начало формирования агрегатов, изменение их размеров и плотности, прикрепление к подложке, миграцию клеток по подложке, скорость формирования и размеры монослоя, время появления нейробластоподобных клеток и колоний недифференцированных клеток.

Жизнеспособность НК после 1 суток хранения в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия в ней экстрактов, незначительно возрастала (рис. 3.3.2.1). В процессе дальнейшего хранения в среде DMEM/F-12 без экстрактов жизнеспособность клеток достоверно не изменялась. В присутствии в среде DMEM/F-12 как ЭМ, так и ЭП при последующем ГХ происходило постепенное увеличение жизнеспособности НК, при этом после 4 суток хранения в присутствии ЭП жизнеспособность НК незначительно снижалась.

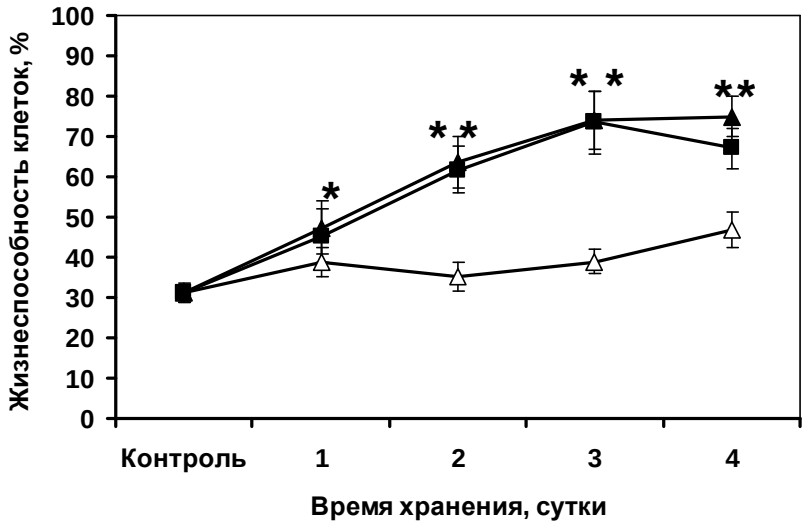


Рис. 3.3.2.1. Жизнеспособность НК новорожденных крыс при ГХ в среде DMEM/F-12: Δ – в присутствии СКВК; ▲– в присутствии ЭМ; ■ – в присутствии ЭП. * – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12 с СКВК, $p < 0,05$.

Ранее нами было показано, что присутствие сыворотки в ССР ухудшает жизнеспособность НК в процессе ГХ [39], поэтому в данном исследовании хранение суспензии НК осуществляли в ССР без добавления сыворотки. После 1 суток ГХ в ССР происходило резкое увеличение жизнеспособности НК независимо от наличия в среде экстрактов: в присутствии ЭМ жизнеспособность клеток увеличивалась, по сравнению со своим исходным значением, в 2,5 раза, в присутствии ЭП – в 2,4 раза, а в отсутствии в среде хранения экстрактов – в 2 раза (рис. 3.3.2.2). В процессе дальнейшего ГХ в ССР без добавления экстрактов жизнеспособность клеток достоверно не изменялась. В присутствии как ЭМ, так и ЭП, после 2 суток ГХ жизнеспособность клеток

увеличивалась, а после 3 суток хранения снижалась. В течение всего времени хранения НК в ССР с экстрактами их жизнеспособность была достоверно выше по сравнению с жизнеспособностью клеток, хранившихся в ССР без добавок.

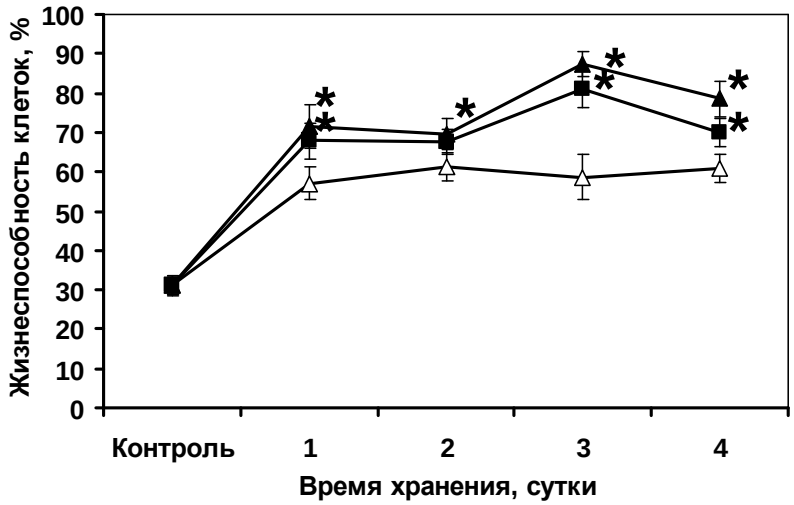


Рис. 3.3.2.2. Жизнеспособность НК новорожденных крыс при ГХ в ССР: Δ – без экстрактов; ▲ – в присутствии ЭМ; ■ – в присутствии ЭП. * – отличия статистически достоверны по сравнению с ССР без экстрактов, $p < 0,05$.

Метаболическая активность НК в процессе ГХ наиболее интенсивно снижалась после 1 суток хранения, независимо от среды хранения и присутствия в ней экстрактов (рис. 3.3.2.3).

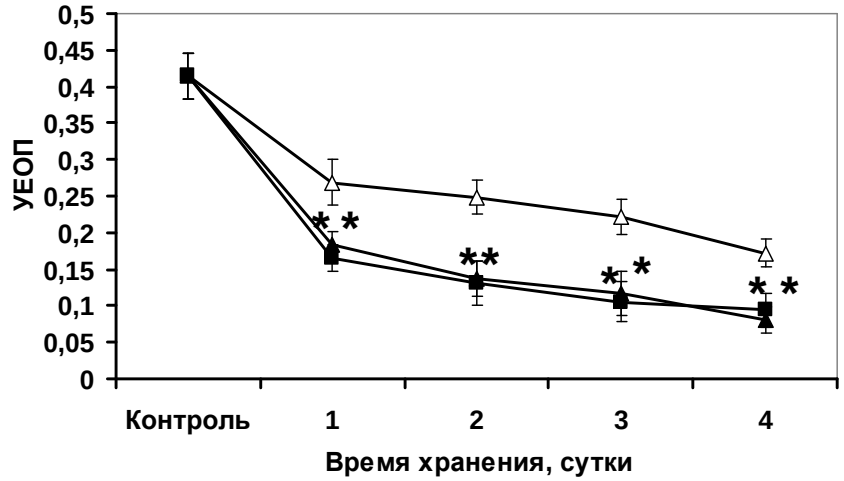


Рис. 3.3.2.3. Метаболическая активность НК новорожденных крыс по МТТ-тесту при ГХ в среде DMEM/F-12: Δ – в присутствии сыворотки; ▲– в присутствии ЭМ; ■ – в присутствии ЭП; * – отличия статистически достоверны по сравнению со свежевыделенными НК, $p < 0,05$.

Так, через 24 ч хранения в среде DMEM/F-12 метаболическая активность клеток снижалась в 1,5 раза, а в присутствии в среде DMEM/F-12 как ЭМ, так и ЭП – в 2,3 раза. После 1 суток хранения в ССР метаболическая активность клеток снижалась в 1,8 раза. Добавление экстрактов в ССР не оказывало влияния на данный показатель (рис. 3.3.2.4).

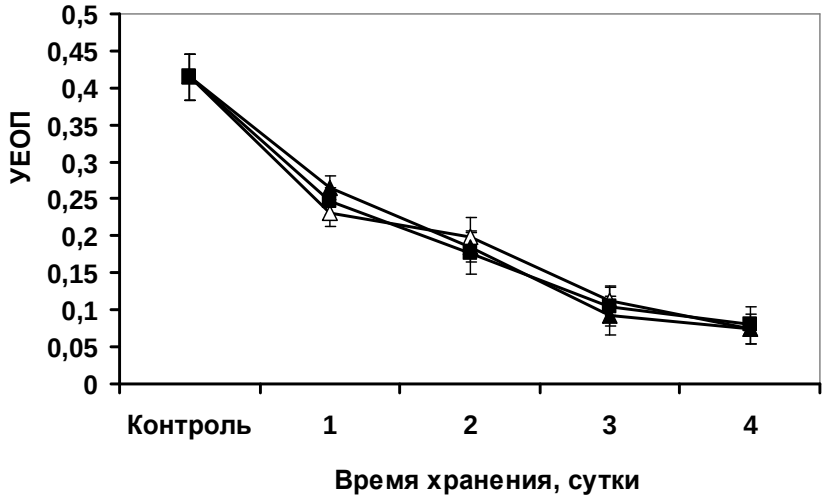


Рис. 3.3.2.4. Метаболическая активность НК новорожденных крыс по МТТ-тесту при ГХ в ССР: Δ – без добавления экстрактов; ▲ – в присутствии ЭМ; ■ – в присутствии ЭП.

В процессе дальнейшего хранения метаболическая активность НК постепенно снижалась как в среде DMEM/F-12, так и в ССР. Присутствие как ЭМ, так и ЭП в среде DMEM/F-12 приводило к более низким показателям метаболической активности клеток в течение всего времени хранения. Присутствие экстрактов в ССР не оказывало влияния на данный показатель клеток на протяжении всего времени хранения.

В процессе ГХ нервных клеток сохранность клеток снижалась независимо от среды хранения и присутствия в ней экстрактов. Наиболее резкое снижение сохранности НК при ГХ в среде DMEM/F-12, как в присутствии, так и в отсутствии экстрактов, происходило после 1 суток хранения: на 30% после хранения в DMEM/F-12 без добавления экстрактов и на 56% после хранения в присутствии как ЭМ, так и ЭП (рис. 3.3.2.5). На протяжении последующих

3 суток ГХ в среде DMEM/F-12 без добавления экстрактов сохранность клеток снижалась на 45%, а в присутствии как ЭМ, так и ЭП – на 22%.

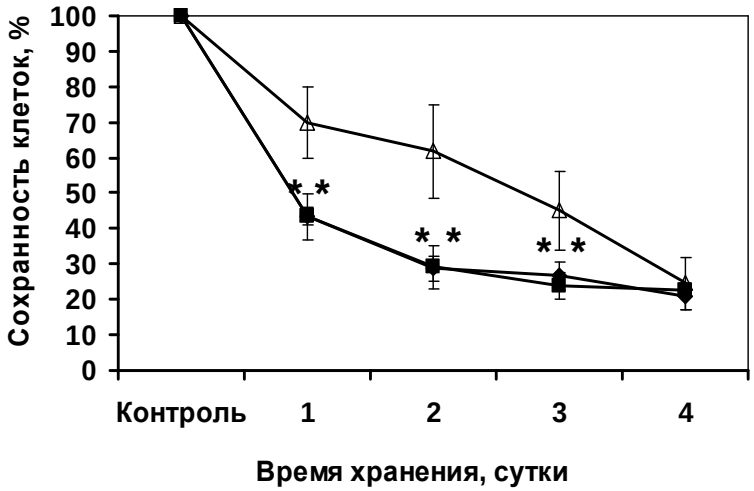


Рис. 3.3.2.5. Сохранность НК при ГХ в DMEM/F-12: Δ – с СКВК; ▲ – с ЭМ; ■ – с ЭП. * – отличия статистически достоверны по сравнению с СКВК, $p < 0,05$.

При ГХ НК в ССР, независимо от присутствия экстрактов, происходило резкое падение сохранности клеток после 1 суток хранения (на 56,8–57,6%) и незначительное ее снижение в процессе дальнейшего хранения (на 17%) (рис. 3.3.2.6). Присутствие в среде хранения НК как ЭМ, так и ЭП оказывало отрицательное влияние на сохранность клеток после 3 суток ГХ в ССР.

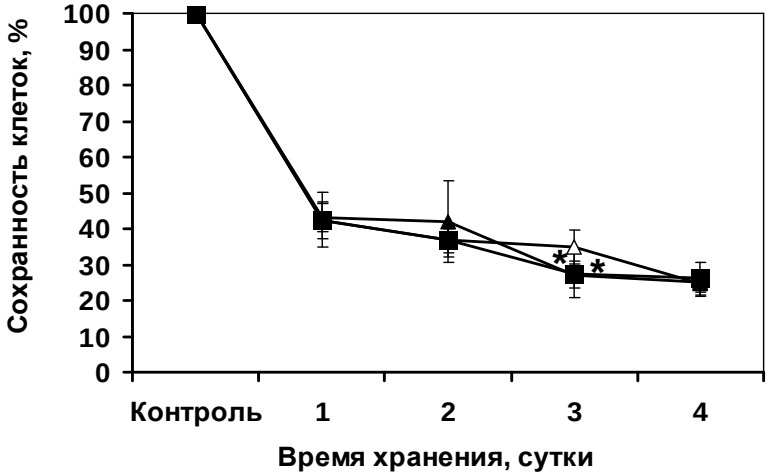


Рис. 3.3.2.6. Сохранность НК новорожденных крыс при ГХ в ССР: Δ – без добавления экстрактов; ▲ – с ЭМ; ■ – с ЭП. * – отличия статистически достоверны по сравнению с ССР без добавления экстрактов, $p < 0,05$.

Анализ изменения в процессе ГХ количества жизнеспособных клеток, которые не прокрашивались красителем трипановым синим, показал, что их количество уменьшалось на протяжении всего времени хранения. Хранение в среде DMEM/F-12 приводило к интенсивному падению количества жизнеспособных клеток в течение всего времени хранения, после 4 суток ГХ их количество уменьшалось, по сравнению с исходным, в 2,5 раза (рис. 3.3.2.7). В присутствии в среде хранения DMEM/F-12 как ЭМ, так и ЭП, наиболее интенсивное снижение количества жизнеспособных клеток наблюдалось после 1 суток хранения (в 1,4 раза), при последующем хранении количество жизнеспособных клеток снижалось незначительно.

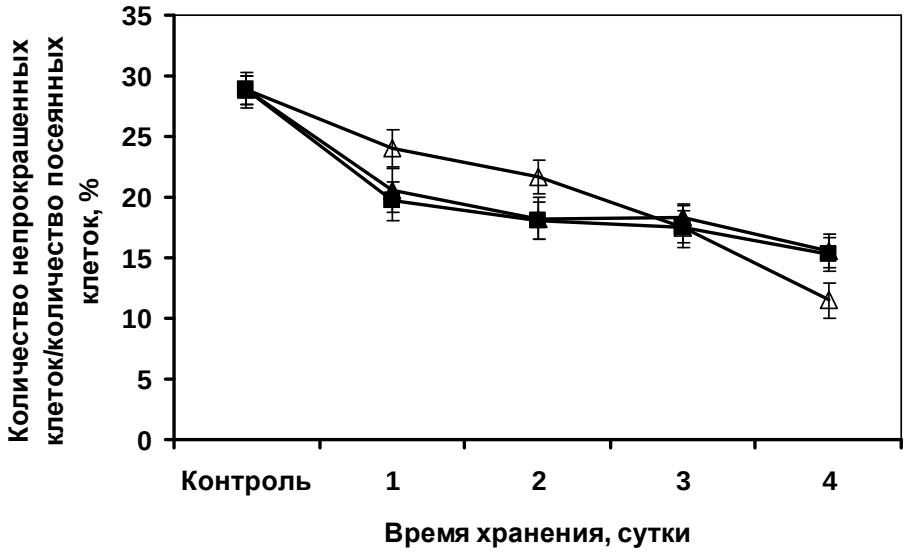


Рис. 3.3.2.7. Влияние ГХ на количество НК, которые не прокрашивались красителем трипановым синим после хранения в среде DMEM/F-12: Δ – в присутствии СКВК; ▲ – в присутствии ЭМ; ■ – в присутствии ЭП.

При ГХ нервных клеток в ССР количество жизнеспособных клеток наиболее интенсивно снижалось после 1 и 4 суток хранения – в 1,3 и в 1,4 раза по сравнению с исходным количеством (рис. 3.3.2.8). На протяжении первых 2 суток хранения нервных клеток в ССР в присутствии ЭМ количество не прокрашенных трипановым синим клеток не изменялось. В процессе дальнейшего хранения происходило постепенное уменьшение их количества.

ГХ клеток в ССР в присутствии ЭП на протяжении 1 суток не оказывало влияния на количество не прокрашенных клеток. Дальнейшее ГХ характеризовалось постепенным снижением их количества, после 4 суток хранения нервных клеток в ССР в присутствии ЭП количество жизнеспособных клеток уменьшалось в 1,6 раза.

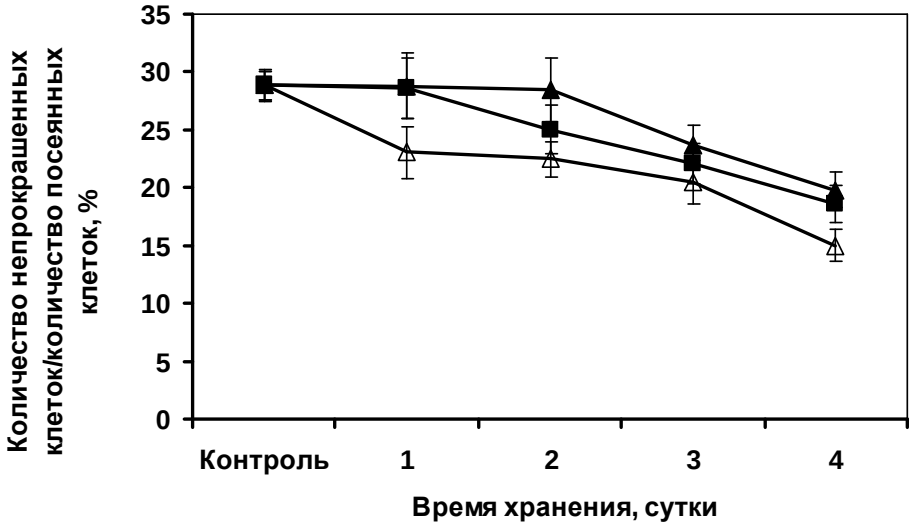


Рис. 3.3.2.8. Влияние ГХ на количество НК, которые не прокрашивались красителем трипановым синим после хранения в ССР: Δ – без добавления экстрактов; ▲ – в присутствии ЭМ; ■ – в присутствии ЭП.

В культуре поведение НК, которые подвергались 1 суткам ГХ, независимо от среды хранения и присутствия в ней экстрактов, практически не отличалось от поведения свежевыделенных клеток (табл. 3.3.2). В течение нескольких часов после посева НК, которые хранили на протяжении 1 суток как в среде DMEM/F-12, так и в ССР, независимо от присутствия экстрактов, происходило образование многоклеточных агрегатов, которые в течение 1 суток культивирования начинали увеличиваться в размерах и приобретать более плотную структуру. В течение первых 2 суток культивирования агрегаты начинали прикрепляться к подложке. Прикрепление большинства (>80%) агрегатов происходило на 6–7 сутки культивирования (табл. 3.3.2).

Таблица 3.3.2.

Влияние ГХ суспензии НК новорожденных крыс на стадии их культивирования (n = 6)

Время ГХ, сутки	Среда хранения	Стадии культивирования НК, сутки				
		Начало прикрепления агрегатов	Прикрепление >80% агрегатов	Формирование 70% монослоя	Появление нейробластов	Появление колоний
–	Контроль (свеже-выделенные клетки)	1–2	4–5	6	6	9–13
1	DMEM/F-12	3	6	6–7	6–7	9–15
	DMEM/F-12 в присутствии СКВК	1–2	6	6	6–7	9–13
	DMEM/F-12 в присутствии ЭМ	1–2	6–7	6–7	6–7	12–14
	DMEM/F-12 в присутствии ЭП	1–2	6–7	6–7	6–7	12–14
	ССР	1–2	6	6–7	7	9–15
	ССР с ЭМ	1–2	6–7	6–7	7–8	12–14
	ССР с ЭП	1–2	6–7	6–7	7–8	14
2	DMEM/F-12	–	–	–	–	–
	DMEM/F-12 в присутствии СКВК	3	7–8	8	7–8	9–10
	DMEM/F-12 в присутствии ЭМ	2–3	7–8	8–10	8	11–12
	DMEM/F-12 в присутствии ЭП	2–3	7–8	8–10	8	11–12
	ССР	3	10	9–10	8	12
	ССР с ЭМ	3	10	10	8	11–12
	ССР с ЭП	–	–	–	–	–
3	Все среды	–	–	–	–	–
4	Все среды	–	–	–	–	–

1 сутки ГХ нервных клеток новорожденных крыс, независимо от используемой среды и присутствия в ней экстрактов, не оказывали влияния на эффективность прикрепления, распластывания и формирования клетками монослоя. Скорость формирования монослоя клетками, которые подвергались 1 суткам ГХ, не отличалась от скорости формирования монослоя свежевыделенными НК, также как и его плотность. Так, после 7 суток культивирования свежевыделенных клеток плотность монослоя составляла 1491,0 ± 159,0 клеток на мм^2 (рис. 3.3.2.9). Плотность монослоя в культурах НК, которые подвергались 1 суткам ГХ как в среде DMEM/F-12, так и в ССР, независимо от присутствия экстрактов, через 7 суток культивирования варьировала в пределах 1416,0 ± 201,0 ÷ 1458,0 ± 153,0 клеток на мм^2 и достоверно не отличалась от плотности монослоя в культурах свежевыделенных клеток (рис. 3.3.2.9).

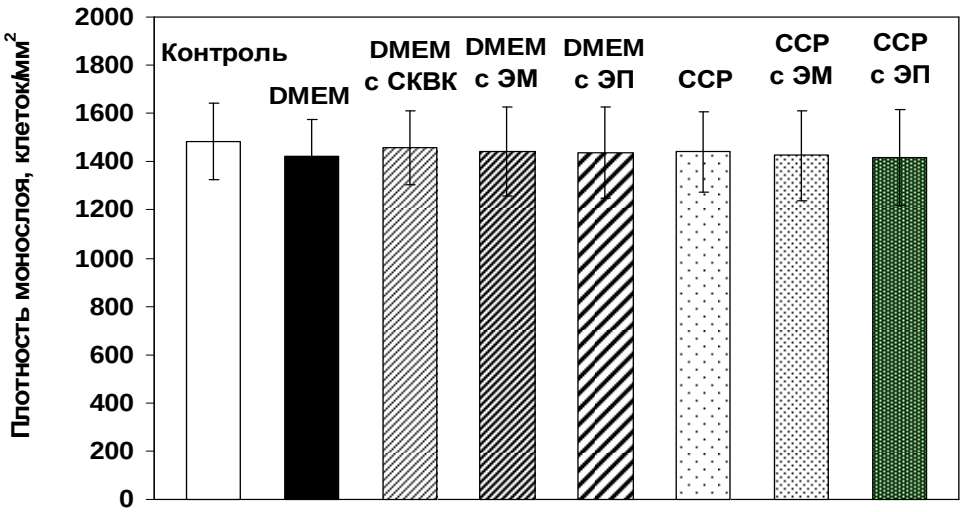


Рис. 3.3.2.9. Плотность монослоя НК новорожденных крыс после 1 суток ГХ в средах различного состава, 7 суток культивирования.

Время появления в культурах НК, которые подвергались 1 суткам ГХ в среде DMEM/F-12 или в ССР, независимо от присутствия в них экстрактов, β-тубулин III-положительных нейробластоподобных клеток и колоний недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток, не отличалось от контроля (табл. 3.3.2).

НК, которые подвергались ГХ на протяжении 2 суток в среде DMEM/F-12 и в ССР, независимо от присутствия в них экстрактов, как и свежевыделенные, формировали агрегаты в течение 1 суток культивирования. Однако прикрепление агрегатов к подложке происходило позже, чем в контроле (табл. 3.3.2). Около 90% агрегатов НК, которые хранили в ССР с ЭП, к подложке не прикреплялись, сохраняя рыхлую упаковку клеток и небольшие размеры. В процессе культивирования клетки этих агрегатов погибали.

После прикрепления агрегатов, которые хранили в DMEM/F-12 с ЭМ или ЭП, и в ССР с ЭМ, клетки агрегатов мигрировали и формировали монослой, однако скорость его образования была ниже по сравнению с контролем (табл. 3.3.2). Так, в культурах НК, которые хранили в DMEM/F-12 с экстрактом мозга или печени, на 6 сутки культивирования монослой занимал около 50% площади лунки. В культуре клеток, которые хранили в ССР с ЭМ, монослой, занимающий около 50% поверхности лунки, образовывался на 7–8 сутки культивирования. Однако формирование конфлюэнтного монослоя клетками после 2 суток хранения как в DMEM/F-12 с ЭМ или ЭП, так и в ССР с ЭМ, происходило в течение 10 суток культивирования.

Плотность монослоя, который формировали в культуре клетки после 2 суток ГХ, была ниже, чем в культуре свежевыделенных НК. Так, в культурах НК, которые хранили в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия как ЭМ, так и ЭП, плотность монослоя на 10 сутки культивирования составляла 1149,0 ± 195,0 клеток на мм^2, что в 1,3 раза меньше, чем в культуре свежевыделенных клеток, однако в 3,8 раза превышало данное значение после ГХ в среде DMEM/F-12 без экстрактов (рис. 3.3.2.10). Плотность монослоя, формируемого клетками после хранения в ССР с ЭМ, на 10 сутки культивирования составляла 1056,0 ± 177,0 на мм^2, что в 1,4 раза меньше, чем в контроле, и практически не отличалась от плотности монослоя, формируемого клетками, хранившихся в ССР без добавления экстрактов.

НК, которые подвергались 2 суткам ГХ в ССР при добавлении ЭП, при культивировании монослой не формировали.

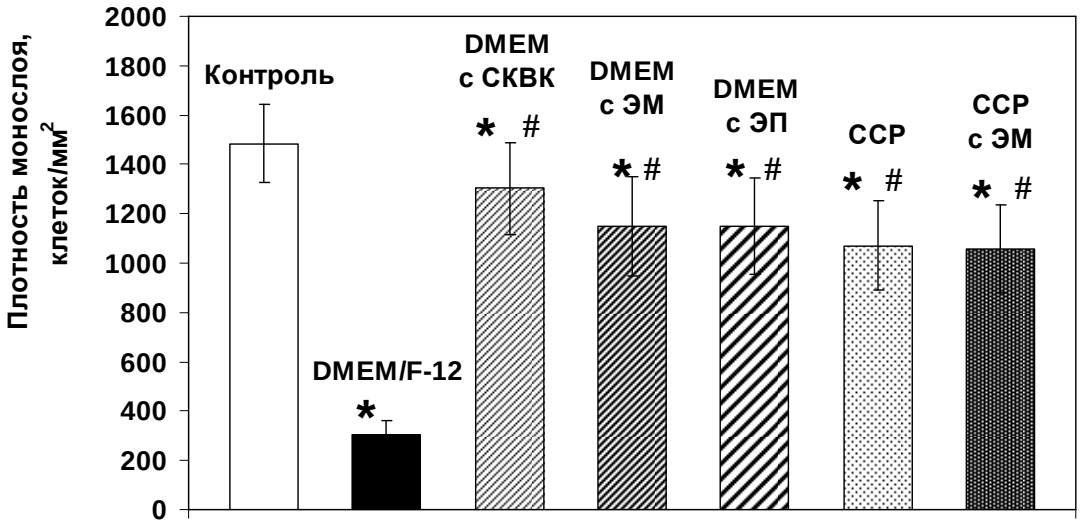


Рис. 3.3.2.10. Плотность монослоя НК новорожденных крыс после 2 суток ГХ в средах различного состава, 10 суток культивирования. * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F-12, $p < 0,05$.

На 8 сутки культивирования НК, хранившихся 2 суток в среде DMEM/F-12 в присутствии ЭМ или ЭП, и в ССР в присутствии ЭМ, на монослое появлялись β-тубулин III-положительные нейробластоподобные клетки (рис. 3.3.2.11).

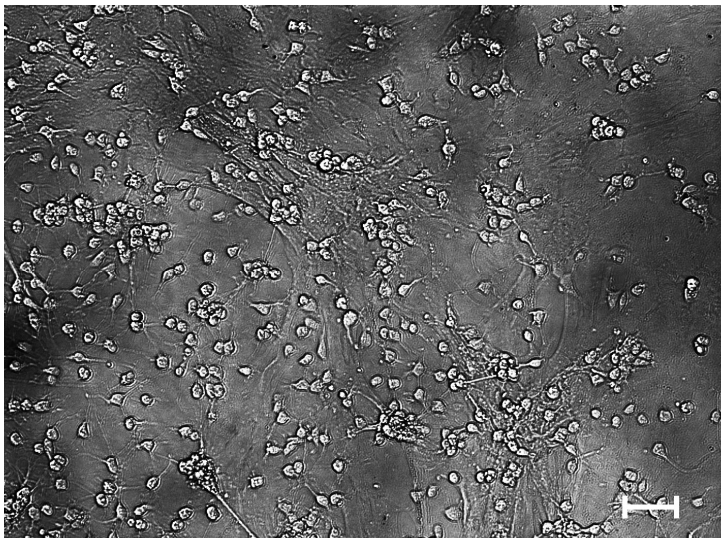


Рис. 3.3.2.11. Культура НК новорожденных крыс после 2 суток ГХ в DMEM/-F12 в присутствии ЭМ, 10 суток культивирования. Образование на глиальном монослое клеток с морфологией нейробластов. Масштаб: 50 мкм.

На 9–13 сутки культивирования свежевыделенных НК на монослое появлялись колонии недифференцированных клеток, большинство которых являлись нестин/виментин-положительными. Время появления колоний в культурах НК, подвергавшихся ГХ на протяжении 1 и 2 суток, практически не отличалось от контроля (табл. 3.3.2). Колонии были сформированы в культурах НК, которые хранили на протяжении 1 суток в среде DMEM/F-12 и ССР, независимо от присутствия экстрактов. После 2 суток ГХ колонии формировались в культурах НК, которые хранили в среде DMEM/F-12 в присутствии ЭМ и ЭП, и в ССР в присутствии ЭМ. В процессе культивирования количество и размер колоний увеличивались (рис. 3.3.2.12).

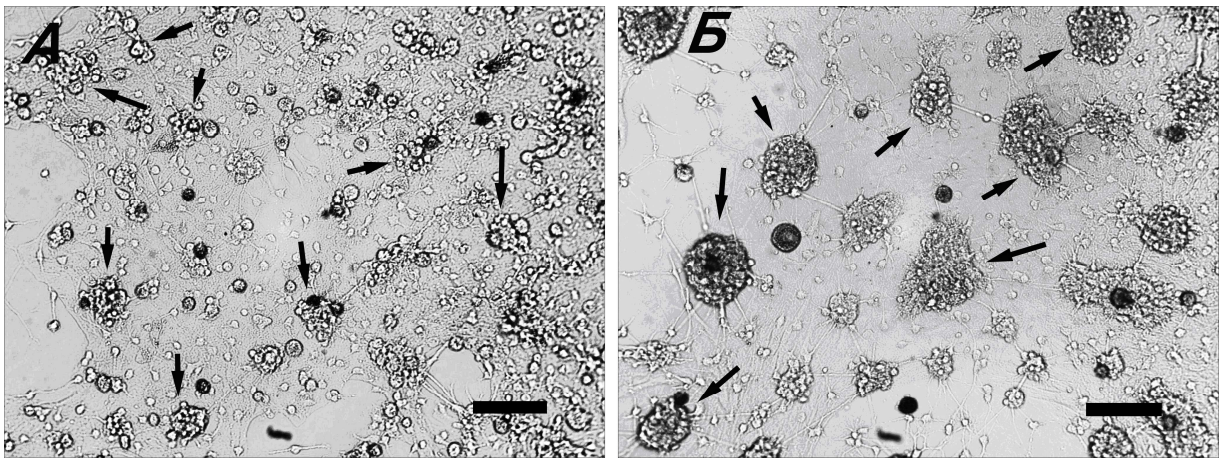


Рис. 3.3.2.12. Культура НК новорожденных крыс после 1 суток ГХ в среде DMEM/-F12 в присутствии ЭМ: а – 16 сутки культивирования; б – 21 сутки культивирования. Увеличение размеров колоний (стрелки). Масштаб: 100 мкм.

НК, хранившиеся на протяжении 3 и более суток в DMEM/F-12 и в ССР, независимо от присутствия экстрактов, в процессе культивирования формировали мелкие агрегаты, которые не прикреплялись к подложке и погибали. Прикрепившиеся к подложке единичные клетки не распластывались, и в течение нескольких суток культивирования также погибали.

Проведенные исследования показали, что ГХ в ССР и DMEM/F-12 приводит к гибели части клеток, вероятно, поврежденных в процессе выделения. Данный процесс гибели не зависит от присутствия в средах

хранения сыворотки или экстрактов. Полученные данные также показали, что в процессе ГХ происходит снижение количества НК, которые не прокрашиваются трипановым синим. Результаты оценки сохранности НК и клеток, исключающих трипановый синий в течение времени ГХ, коррелируют с данными МТТ-теста. Так, в процессе ГХ происходило снижение метаболической активности клеток, независимо от среды хранения и присутствия в ней экстрактов. Наиболее интенсивное снижение интенсивности преобразования МТТ в формазан, также независимо от среды хранения и присутствия в ней экстрактов, происходило после 1 суток хранения НК. Присутствие как ЭМ, так и ЭП в среде DMEM/F-12 оказывало отрицательное, по сравнению с сывороткой, влияние на способность клеток преобразовывать МТТ в формазан, тогда как присутствие экстрактов в ССР не оказывало влияния на данный показатель.

Несмотря на снижение сохранности НК и их метаболической активности, поведение клеток в культуре после 1 суток ГХ существенно не отличалось от поведения свежевыделенных клеток. При этом наблюдалось лишь замедление скорости прикрепления агрегатов, сформированных данными клетками. Это можно объяснить, с одной стороны, тем, что в течение 1 суток ГХ погибает часть клеток, которые в процессе выделения получили летальные повреждения. С другой стороны, клетки, которые подвергаются хранению, могут получать повреждения, которые летальными не являются. При последующем культивировании клеток происходит репарация нелетальных повреждений, о чем может свидетельствовать увеличение времени, необходимого для прикрепления агрегатов НК и формирования клетками агрегатов монослоя. В процессе дальнейшего хранения количество повреждений клеток возрастает. На это указывает увеличение времени, необходимого для прикрепления агрегатов НК, которые хранили на протяжении 2 суток, к подложке и снижение скорости формирования монослоя. Во всех культурах НК, которые подвергались ГХ, и которые были способны формировать конфлюэнтный монослой, наблюдалось появление нейробластоподобных клеток и колоний недифференцированных

клеток, что указывает на сохранность в процессе хранения ПК и СК. Добавление в среду DMEM/F-12 экстрактов мозга или печени новорожденных крыс оказывает действие, подобное действию сыворотки, увеличивая время эффективного хранения НК до 2 суток. Это указывает на то, что ЭМ и ЭП, как и сыворотка, содержат специфические факторы, стабилизирующие ионный транспорт и оптимизирующие энергетическое состояние клеток, увеличивая тем самым время их эффективного хранения.

Отсутствие корреляции между снижением сохранности НК, которое наблюдается в процессе ГХ в DMEM/F-12 и в ССР, и их поведением в культуре, указывает на гибель летально поврежденных клеток, изначально не способных прикрепляться, распластываться и формировать агрегаты. При этом динамика снижения сохранности НК в процессе хранения также свидетельствует о том, что процесс гибели наиболее интенсивен в отсутствие сыворотки.

Уменьшение в процессе ГХ количества жизнеспособных клеток в суспензии не оказывало влияния на их способность в процессе культивирования формировать агрегаты, прикрепляться, мигрировать и распластываться. Это, с одной стороны, может говорить о том, что данные микроповреждения не являются летальными и в процессе культивирования восстанавливаются, а с другой – что определение жизнеспособности по трипановому тесту не вполне отражает реальную жизнеспособность НК.

Проведенные исследования также показали, что в процессе ГХ в ССР присутствие ЭМ оказывает положительное, а ЭП отрицательное влияние на жизнеспособность НК, определенную по трипановому тесту. Результаты трипанового теста коррелируют с данными по поведению НК в культуре, что указывает на тканеспецифичность действия экстрактов, которое проявляется при хранении в ССР. Возможно, это связано с негативным действием специфических факторов, которые содержатся в ЭП, возможно – с недостаточным количеством или отсутствием факторов, специфических для нервной ткани. В ССР также может проявляется специфическое действие на НК низкомолекулярных веществ (550–6800 Да), количественный и качественный

состав которых в ЭМ и ЭП является различным [45]. Возможно, в неэлектролитном ССР низкомолекулярные вещества экстракта печени повышают ионную проницаемость клеточных мембран, что может стать причиной изменения внутриклеточного состава, увеличения скорости образования свободных радикалов и активации кальций-зависимых протеаз и фосфолипаз, повреждающих цитоскелет и препятствующих клеточной адгезии. Хранение НК во всех исследованных средах на протяжении более 2 суток, очевидно, сопровождалось критическим увеличением ионной проницаемости мембран клеток с одновременным снижением концентрации АТФ, что приводило к летальным повреждениям клеток.

Таким образом, полученные результаты показали, что ЭМ и ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл, подобно сыворотке, увеличивают выживание НК новорожденных крыс при ГХ в среде DMEM/F-12. ЭМ оказывает положительное, а ЭП отрицательное влияние на выживание НК при гипотермическом хранении в ССР. Гипотермическое хранение в DMEM/F-12 и ССР на протяжении более 2 суток, независимо от присутствия в них сыворотки или экстрактов, приводит к гибели НК новорожденных крыс.

Результаты, которые представлены в данном подразделе, опубликованы в следующих работах: [26, 39, 40, 41, 42, 48].

3.4. Гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс в составе агрегатов

В данном подразделе представлены результаты исследования роли формирования многоклеточных агрегатов на эффективность гипотермического хранения дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток головного мозга новорожденных крыс. Исследование выполнено с использованием методов культивирования, спектрофотометрии, иммуноцитохимического окрашивания.

Для успешного выживания изолированных НК важным является восстановление утерянного клеточного микроокружения, которое играет значительную роль как в выживании всего пула гетерогенных клеток, так и в регуляции адекватного функционирования стволовых и прогениторных клеток.

С целью изучения влияния клеточного окружения на выживание дифференцированных, СК и ПК предварительно сформированные трехмерные агрегаты гетерогенной суспензии НК новорожденных крыс подвергали хранению в гипотермических условиях в средах различного состава. Оценку выживания клеток агрегатов после ГХ проводили в процессе их культивирования *in vitro*.

Хранение агрегатов НК осуществляли при температуре +4 °С в среде DMEM/F-12 и в ССР в присутствии и отсутствии 10% СКВК на протяжении 8 суток. После каждых 24 ч хранения проводили оценку метаболической активности клеток агрегатов с помощью МТТ-теста. При этом подсчитывали количество не окрашенных, частично окрашенных и полностью окрашенных агрегатов (рис. 3.4.1), выражая полученные результаты в процентах.

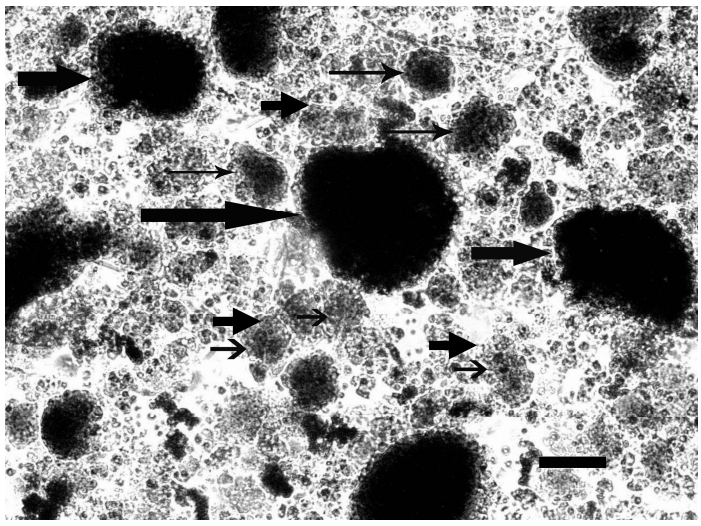


Рис. 3.4.1. Агрегаты НК, которые подвергались ГХ на протяжении 2 суток в среде DMEM/F-12 без СКВК, характеризующиеся разной степенью окрашенности. Полностью окрашенные агрегаты (большие стрелки), частично окрашенные агрегаты (тонкие длинные стрелки), не окрашенные агрегаты (маленькие стрелки). Масштаб: 100 мкм.

После ГХ проводили культивирование агрегатов НК, в процессе которого отмечали начало прикрепления клеток агрегатов к поверхности лунки, скорость формирования и размеры монослоя, время появления нейробластоподобных клеток и колоний недифференцированных клеток.

Проведенные исследования показали, что в процессе ГХ во всех используемых средах происходило снижение количества полностью и частично окрашенных формазаном агрегатов, а также увеличение количества не окрашенных агрегатов.

Оценка количества окрашенных формазаном агрегатов НК, которые хранили в среде DMEM/F-12 без сыворотки, показала наиболее интенсивное снижение их числа в течение первых 2 суток ГХ: в 2,6 раза после 1 суток, и в 5,6 раз – после 2 суток хранения (табл. 3.4.1). После 3 суток ГХ их количество снижалось в 8 раз и оставалось на данном уровне в течение 5 суток хранения. После 6 суток ГХ количество полностью окрашенных агрегатов уменьшалось, по сравнению с исходным количеством, в 12,5, а после 8 суток – в 16 раз. Количество частично окрашенных агрегатов в течение первых 5 суток хранения в среде DMEM/F-12 без сыворотки увеличивалось, по сравнению с исходным количеством, в 1,3 раза. После 6 суток ГХ количество частично окрашенных агрегатов постепенно снижалось, после 8 суток хранения оно было в 4,8 раза меньшим по сравнению с исходным количеством. Количество не окрашенных агрегатов увеличилось в 1,5 раза уже после одних суток хранения. При последующем ГХ их количество увеличивалось постепенно, после 8 суток хранения оно возрастало, по сравнению с исходным количеством не окрашенных агрегатов, в 2 раза.

Таблица 3.4.1.

Влияние ГХ агрегатов НК новорожденных крыс в среде DMEM/F-12 на накопление в клетках агрегатов формазана (n = 5, M ± m)

Время ГХ, сутки	Относительное количество агрегатов после хранения без СКВК, %			Относительное количество агрегатов после хранения с СКВК, %		
	Полностью окрашенные	Частично окрашенные	Не окрашенные	Полностью окрашенные	Частично окрашенные	Не окрашенные
Контроль (свежевыделенные НК)	39,71 ±3,14	11,76 ±0,74	48,53 ±3,4	39,71 ±3,14	11,76 ±0,74	48,53 ±3,4
1	15,21 ±0,87	12,47 ±0,81	72,32 ±2,13	17,58 ±0,89	23,08 ±1,03	59,34 ±3,53
2	7,14 ±0,69	18,24 ±1,04	74,62 ±2,19	6,79 ±0,67	22,63 ±0,89	70,58 ±2,68
3	4,95 ±0,4	17,59 ±1,02	77,46 ±2,47	5,61 ±0,53	21,04 ±0,78	73,35 ±2,61
4	4,58 ±0,53	17,05 ±1,27	78,37 ±2,32	5,42 ±0,56	17,73 ±0,67	76,85 ±2,72
5	4,73 ±0,47	15,01 ±0,85	80,26 ±3,52	4,35 ±0,59	16,08 ±0,76	79,57 ±3,78
6	3,18 ±0,36	3,55 ±0,37	93,27 ±3,62	4,05 ±0,34	13,10 ±0,36	82,85 ±3,23
7	2,48 ±0,3	2,89 ±0,27	94,63 ±3,37	4,01 ±0,15	1,34 ±0,17	94,65 ±2,76
8	2,45 ±0,25	2,45 ±0,24	95,09 ±2,44	2,48 ±0,13	1,73 ±0,23	95,79 ±2,52

Присутствие в среде DMEM/F-12 сыворотки не оказывало существенного влияния на метаболическую активность клеток агрегатов в процессе ГХ (табл. 3.4.1). Количество полностью окрашенных агрегатов при хранении в DMEM/F-12 с сывороткой, как и при хранении в DMEM/F-12 без сыворотки, наиболее интенсивно снижалось в течение первых 2 суток – в 2,3 раза после одних, и в 5,8 – после 2 суток хранения соответственно. При последующем хранении количество полностью окрашенных агрегатов постепенно

уменьшалось. ГХ на протяжении 8 суток характеризовалось снижением количества полностью окрашенных агрегатов, по сравнению с их исходным количеством, в 16 раз. Количество частично окрашенных агрегатов после 6 суток хранения превышало их количество до хранения в 1,1 раза, и резко снижалось после 7 суток хранения (в 8,8 раз). Количество не окрашенных агрегатов после одних суток хранения в DMEM/F-12 с сывороткой увеличивалось в 1,2 раза. При последующем хранении их количество увеличивалось постепенно, после 8 суток хранения оно возрастало, по сравнению с исходным количеством не окрашенных агрегатов, в 2 раза.

При хранении агрегатов в ССР без сыворотки наиболее интенсивное снижение количества полностью окрашенных агрегатов происходило после 2 и 3 суток ГХ – в 4 и 8,5 раза соответственно (табл. 3.4.2). Дальнейшее хранение характеризовалось постепенным снижением их количества. При этом уже после 7 суток ГХ полностью окрашенные агрегаты в среде инкубации с МТТ отсутствовали. Количество частично окрашенных агрегатов после хранения в ССР уменьшалось в 1,5 раза после одних суток ГХ и оставалось на данном уровне в течение последующих 6 суток хранения. После 8 суток хранения их количество резко снижалось в 8,5 раза по сравнению с исходным значением. Количество не окрашенных агрегатов на протяжении всего времени хранения в ССР без СКВК увеличивалось постепенно. После 8 суток ГХ оно возрастало в 2 раза по сравнению с исходным количеством не окрашенных агрегатов.

Таблица 3.4.2.

Влияние ГХ агрегатов НК новорожденных крыс в ССР на накопление в клетках агрегатов формазана (n = 5, M ± m)

Время ГХ, сутки	Относительное количество агрегатов после хранения без СКВК, %			Относительное количество агрегатов после хранения с СКВК, %		
	Полностью окрашенные	Частично окрашенные	Не окрашенные	Полностью окрашенные	Частично окрашенные	Не окрашенные
Контроль (свежевыделенные НК)	39,71 ±3,14	11,76 ±0,74	48,53 ±3,4	39,71 ±3,14	11,76 ±0,74	48,53 ±3,4
1	21,43 ±1,23	17,86 ±1,12	60,71 ±4,8	5,31 ±0,56	7,62 ±0,67	87,07 ±2,72
2	9,88 ±0,42	18,4 ±0,86	71,72 ±4,09	4,14 ±0,59	6,48 ±0,76	89,38 ±3,78
3	4,67 ±0,45	18,67 ±1,02	76,67 ±3,48	1,32 ±0,12	6,19 ±0,44	92,49 ±3,18
4	4,59 ±0,4	18,48 ±0,87	76,93 ±3,74	–	5,18 ±0,42	94,82 ±2,7
5	4,23 ±0,26	11,66 ±0,92	84,11 ±4,13	–	4,12 ±0,28	95,88 ±3,08
6	2,28 ±0,21	10,57 ±0,93	87,15 ±1,25	–	1,22 ±0,19	98,78 ±1,57
7	–	7,42 ±0,53	92,58 ±3,63	–	–	100
8	–	1,39 ±0,12	98,61 ±1,78	–	–	100

Присутствие в ССР сыворотки оказывало отрицательное влияние на метаболическую активность клеток агрегатов в процессе ГХ (табл. 3.4.2). После одних суток хранения количество полностью окрашенных агрегатов снижалось в 7,5 раза. После 4 суток ГХ полностью окрашенные агрегаты в среде инкубации с МТТ отсутствовали. Количество частично окрашенных агрегатов в процессе ГХ в ССР с сывороткой уменьшалось постепенно, после 7 суток хранения клетки агрегатов полностью утрачивали способность восстанавливать

МТТ в формазан. Количество не окрашенных агрегатов увеличивалось в 1,8 раза после первых суток хранения. Это свидетельствует о том, что уже после одних суток ГХ в ССР с сывороткой клетки большинства агрегатов теряли способность метаболизировать МТТ, образуя синий формазан.

Помимо подсчета количества агрегатов различной степени окрашенности, мы оценивали способность клеток в составе агрегатов к восстановлению МТТ в формазан спектрофотометрическим методом.

Полученные данные показали, что ГХ в среде DMEM/F-12 без сыворотки характеризовалось наиболее сильным снижением интенсивности образования формазана клетками агрегатов в течение первых 2 суток хранения (в 1,6 раза) и постепенным снижением интенсивности его образования при последующем хранении. После 8 суток ГХ в среде DMEM/F-12 без сыворотки интенсивность преобразования клетками МТТ в формазан была меньше, по сравнению с исходным значением до хранения, в 7,1 раза (рис. 3.4.2).

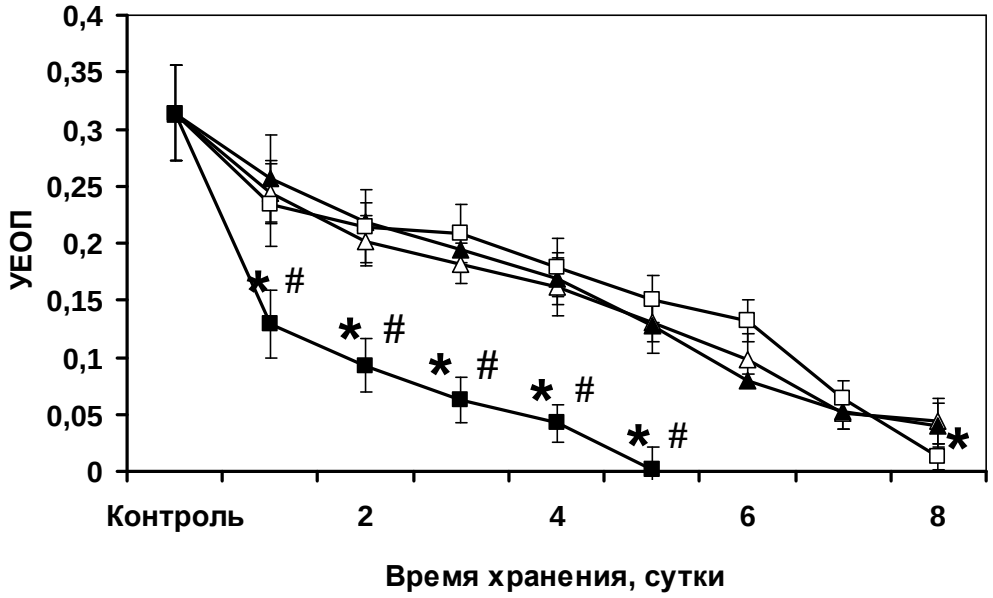


Рис. 3.4.2. Метаболическая активность НК агрегатов при ГХ в разных средах: Δ – DMEM/F-12; ▲ – DMEM/F-12 с СКВК; □ – ССР; ■ – ССР с СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению с DMEM/F-12 с и без СКВК, $p < 0,05$; # – отличия достоверны по сравнению с ССР, $p < 0,05$.

Присутствие сыворотки в среде DMEM/F-12 не оказывало влияния на интенсивность формирования клетками агрегатов формазана после ГХ: наиболее сильное снижение интенсивности преобразования МТТ в формазан также наблюдалось в течение первых 2 суток хранения (в 1,4 раза). В течение последующих 6 суток хранения интенсивность преобразования клетками МТТ в формазан снижалась постепенно. Данные результаты коррелируют с результатами подсчета количества агрегатов разной степени окрашенности. Так, наиболее интенсивное снижение количества окрашенных агрегатов при ГХ в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, также происходило в течение первых 2 суток хранения, как и постепенное уменьшение их количества при последующем хранении.

При ГХ нервных клеток в ССР без сыворотки происходило постепенное снижение интенсивности образования клетками агрегатов формазана на протяжении первых 6 суток хранения (рис. 3.4.2). В течение последующих двух суток ГХ интенсивность формирования клетками формазана резко снижалась: в 5 раз после 7 суток и в 24,5 раза после 8 суток хранения.

Присутствие в ССР сыворотки оказывало отрицательное влияние на интенсивность преобразования клетками агрегатов МТТ в формазан. Уже после одних суток хранения интенсивность образования формазана уменьшалась в 2,4 раза. В процессе последующего хранения интенсивность формирования формазана быстро снижалась, а после 5 суток ГХ в ССР с сывороткой клетки агрегатов полностью утрачивали способность преобразовывать МТТ в формазан.

Полученные данные коррелируют с результатами оценки количества окрашенных агрегатов в течение времени ГХ. Так, после хранения в ССР количество окрашенных агрегатов также наиболее интенсивно уменьшалось в течение первых 2 суток хранения, при дальнейшем хранении их количество снижалось постепенно. После ГХ в ССР с сывороткой количество окрашенных агрегатов значительно уменьшалось уже после одних суток хранения. После 4 суток хранения полностью окрашенные агрегаты в среде инкубации с МТТ

отсутствовали, при этом наблюдалось присутствие небольшого количества частично окрашенных агрегатов, которые также исчезали после 6 суток хранения.

Для оценки функциональной активности клеток агрегатов после ГХ мы проводили их культивирование. В качестве контроля выступали пересеянные агрегаты свежевыделенных НК.

В течение 3 суток культивирования агрегатов свежевыделенных НК большая часть клеток агрегатов прикреплялись к подложке (табл. 3.4.3). Клетки прикрепившихся агрегатов мигрировали по подложке, распластывались и формировали участки монослоя. На 5–6 сутки культивирования на монослое, состоящем из клеток глии, появлялись β-тубулин III-положительные клетки с морфологией нейробластов. На 8 сутки культивирования на монослое появлялись колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток.

ГХ агрегатов НК в течение 1 суток в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, не оказывало влияния на поведение клеток в культуре по сравнению с агрегатами свежевыделенных клеток (табл. 3.4.3).

После 2 суток ГХ в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, происходило более позднее, по сравнению с контролем, прикрепление агрегатов к подложке (табл. 3.4.3). Скорость формирования монослоя была ниже, чем в культуре агрегатов свежевыделенных клеток. При этом, хотя клетки начинали формировать монослой, как и в контроле, на 2 сутки культивирования, конфлюэнтный монослой, занимающий 70–80% поверхности лунки, формировался на 1–2 суток позже. Также происходило более позднее появление в культуре β-тубулин III-положительных нейробластоподобных клеток. Время появления колоний нестин/виментин-положительных клеток в культуре агрегатов НК после 2 суток ГХ в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, не отличалось от времени их появления в культуре агрегатов свежевыделенных клеток.

Таблица 3.4.3.

Влияние ГХ агрегатов НК новорожденных крыс в среде DMEM/F-12 на стадии их культивирования (n = 5)

Время ГХ, сутки	Среда хранения	Стадии культивирования агрегатов НК, сутки				
		Начало прикрепления агрегатов	Прикрепление > 80% агрегатов	Формирование 70% монослоя	Появление нейробластов	Формирование колоний
–	Контроль (агрегаты свежевыделенных НК)	несколько часов	3	5	5–6	8
1	DMEM/F-12	1	3–4	5	5–6	8–9
	DMEM/F-12 + СКВК	1	3–4	5	5–6	8–9
2	DMEM/F-12	1	5	6–7	7	8–9
	DMEM/F-12 + СКВК	1	5	6–7	7	8–9
3	DMEM/F-12	1	5–6	7–8	7–8	10–12
	DMEM/F-12 + СКВК	1	5–6	7–8	7–8	10–12
4	DMEM/F-12	2	–	7–8	7–8	13
	DMEM/F-12 + СКВК	2	–	7–8	7–8	13
5	DMEM/F-12	2	–	8	9	–
	DMEM/F-12 + СКВК	2	–	8	9	–
6	DMEM/F-12	2–3	–	–	–	–
	DMEM/F-12 + СКВК	2–3	–	–	–	–
7	DMEM/F-12	2–3	–	–	–	–
	DMEM/F-12 + СКВК	2–3	–	–	–	–
8	DMEM/F-12	2–3	–	–	–	–
	DMEM/F-12 + СКВК	2–3	–	–	–	–

При культивировании агрегатов НК после 3, 4 и 5 суток ГХ, независимо от присутствия в среде хранения DMEM/F-12 сыворотки, происходило более

позднее, по сравнению с контролем, прикрепление агрегатов к подложке, миграция клеток и формирование монослоя (табл. 3.4.3). При этом в культурах агрегатов НК после 4 и 5 суток ГХ, независимо от присутствия в среде DMEM/F-12 сыворотки, в процессе культивирования к подложке прикреплялось не более 75% агрегатов. Формирование конфлюэнтного монослоя клетками агрегатов после 3, 4 и 5 суток ГХ происходило на 2–3 суток позже, чем в культуре агрегатов свежевыделенных клеток. β-тубулин III-положительные клетки с морфологией нейробластов в культуре НК после 3, 4 и 5 суток ГХ, независимо от присутствия в среде DMEM/F-12 сыворотки, появлялись на 2–4 суток позже по сравнению с контролем (рис. 3.4.3). Колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток в культурах агрегатов НК после 3 и 4 суток ГХ выявлялись на 2–5 суток позже, чем в культуре агрегатов свежевыделенных клеток. После 5 суток ГХ агрегатов НК колонии в культуре не выявлялись.

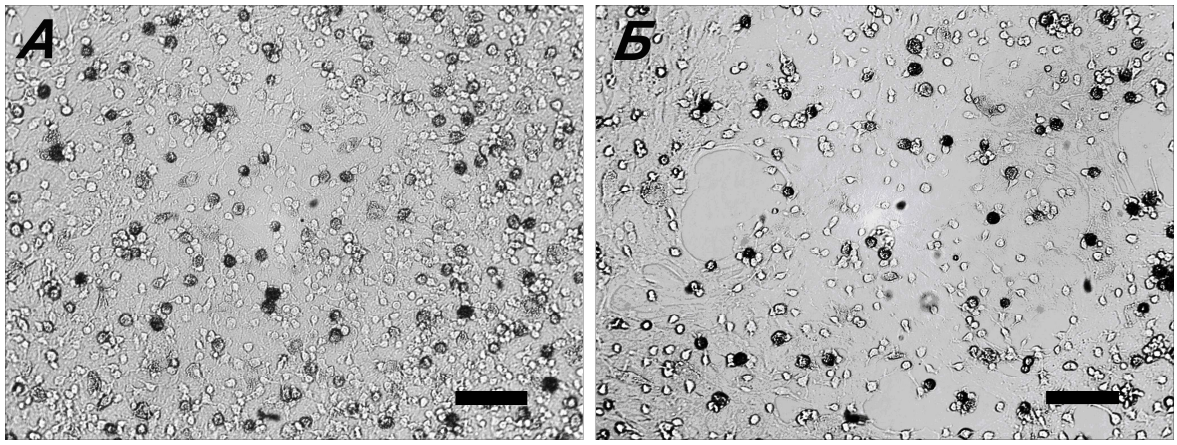


Рис. 3.4.3. Культура агрегатов НК новорожденных крыс, 12 суток культивирования: А – культура агрегатов свежевыделенных клеток; Б – культура агрегатов после 4 суток ГХ в среде DMEM/F-12 с СКВК. Выявление на монослое клеток с нейробластоподобной морфологией. Масштаб: 100 мкм.

На протяжении всего срока культивирования агрегатов, которые хранили в условиях гипотермии от 6 до 8 суток в DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, к подложке прикреплялось не более 50–60% агрегатов (табл. 3.4.3).

Клетки прикрепившихся агрегатов формировали небольшие участки монослоя, площадь которых не превышала 30–40% поверхности лунки. Нейробластоподобные клетки и колонии недифференцированных нестин/виментин положительных клеток на монослое не выявлялись.

Следует отметить, что увеличение времени хранения агрегатов сопровождалось постепенным снижением плотности монослоя, формируемого клетками в культуре. При культивировании НК агрегатов, которые хранили в DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, были способны к формированию слитного монослоя, если срок их хранения не превышал 5 суток. Плотность монослоя, который формировали клетки агрегатов в культуре после 4 суток ГХ в DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, оставалась на уровне контроля, составляя 1314,0 ± 159,0 и 1269,0 ± 174,0 клеток на мм^2 соответственно (рис. 3.4.4). После 5 суток ГХ агрегатов в указанных средах плотность монослоя была достоверно ниже, чем в контроле. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе ГХ происходит гибель дифференцированных НК, что проявляется в снижении количества распластанных клеток, формирующих монослой.

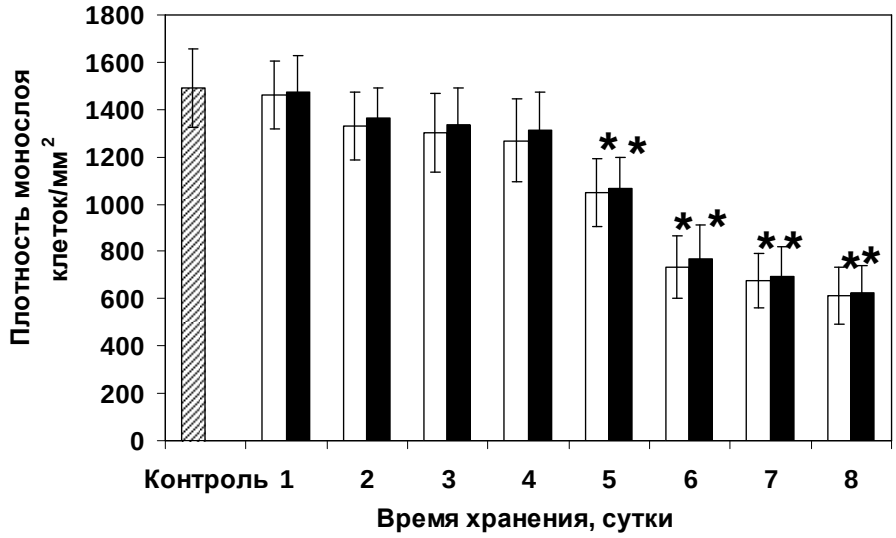


Рис. 3.4.4. Плотность монослоя, формируемого НК агрегатов после ГХ в среде DMEM/F-12, 10 суток культивирования: □ – без СКВК; ■ – в присутствии СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению с агрегатами свежевыделенных клеток, $p < 0,05$.

Поведение в культуре НК агрегатов, хранившихся в течение 1 суток в ССР без сыворотки, практически не отличалось от поведения агрегатов, сформированных свежевыделенными клетками (табл. 3.4.4).

Таблица 3.4.4.

Влияние ГХ агрегатов НК новорожденных крыс в ССР на стадии их культивирования (n = 5)

Время ГХ, сутки	Среда хранения	Стадии культивирования агрегатов НК, сутки				
		Начало прикрепления агрегатов	Прикрепление > 80% агрегатов	Формирование 70% монослоя	Появление нейробластов	Формирование колоний
–	Контроль (агрегаты свежевыделенных НК)	несколько часов	3	5	5	8
1	ССР	1	3–4	5	5–6	8–9
	ССР + СКВК	2	–	–	8	–
2	ССР	1–2	4	6–7	7	8–9
	ССР + СКВК	2–3	–	–	–	–
3	ССР	2	7	7–8	8	10–13
	ССР + СКВК	–	–	–	–	–
4	ССР	2–3	–	7–8	8–9	12–14
	ССР + СКВК	–	–	–	–	–
5	ССР	3	–	8–9	8–9	–
	ССР + СКВК	–	–	–	–	–
6	ССР	–	–	–	–	–
	ССР + СКВК	–	–	–	–	–
7	ССР	–	–	–	–	–
	ССР + СКВК	–	–	–	–	–
8	ССР	–	–	–	–	–
	ССР + СКВК	–	–	–	–	–

Агрегаты, которые подвергались ГХ в течение 1 суток в ССР с сывороткой, начинали прикрепляться к подложке на 1 сутки позже, чем в контроле, при этом в течение всего времени культивирования к подложке прикреплялось не более 75% агрегатов (табл. 3.4.4). Клетки прикрепившихся к подложке агрегатов формировали монослой, площадь которого в процессе культивирования не превышала 60% поверхности подложки. β-тубулин III-положительные клетки с морфологией нейробластов появлялись на монослое позже, чем в контроле, данные клетки были единичными, их количество в процессе культивирования не увеличивалось. Появления колоний недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток в культуре агрегатов НК после 1 суток ГХ в ССР с сывороткой не наблюдалось.

После 2 суток ГХ в ССР без сыворотки происходило более позднее, по сравнению с контролем, прикрепление агрегатов к подложке, а также формирование клетками агрегатов конфлюэнтного монослоя (табл. 3.4.4). Также наблюдалось более позднее появление в культурах нейробластоподобных клеток. Время появления колоний недифференцированных клеток в культурах агрегатов НК после 2 суток ГХ в ССР без сыворотки не отличалось от контроля.

В культурах агрегатов НК, которые подвергались ГХ в течение 2 суток в ССР с сывороткой, агрегаты начали прикрепляться к подложке на 1–2 суток позже, чем в контроле, при этом в процессе культивирования прикреплялось не более 60% агрегатов. Площадь монослоя в процессе культивирования не превышала 50% поверхности подложки. В культуре не выявлялись нейробластоподобные клетки и колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток.

При культивировании агрегатов НК после ГХ в ССР без сыворотки на протяжении от 3 до 5 суток к подложке прикреплялось не более 75% агрегатов. Клетки прикрепившихся агрегатов начинали мигрировать и распластываться на подложке на 2–4 суток позже, чем в контроле. Площадь монослоя на протяжении времени культивирования не превышала 70% поверхности лунки.

Нейробластоподобные клетки в культуре агрегатов НК после 3–5 суток ГХ выявлялись на монослое на 3–4 суток позже по сравнению с контролем. Колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток в культурах агрегатов НК после 3 и 4 суток ГХ появлялись на 2–6 суток позже, чем в контроле. После хранения агрегатов НК в ССР без сыворотки на протяжении 5 суток колонии нестин/виментин-положительных клеток не выявлялись.

При культивировании агрегатов НК, которые подвергались ГХ в ССР без сыворотки более 5 суток, и в ССР с сывороткой в течение 3 и более суток, клетки агрегатов не прикреплялись к подложке и в дальнейшем погибали (табл. 3.4.4). При этом наблюдалось прикрепление единичных клеток к подложке, однако они не распластывались.

Следует отметить, что увеличение времени хранения агрегатов НК в ССР, независимо от присутствия сыворотки, сопровождалось снижением плотности монослоя, формируемого клетками в культуре (рис. 3.4.5).

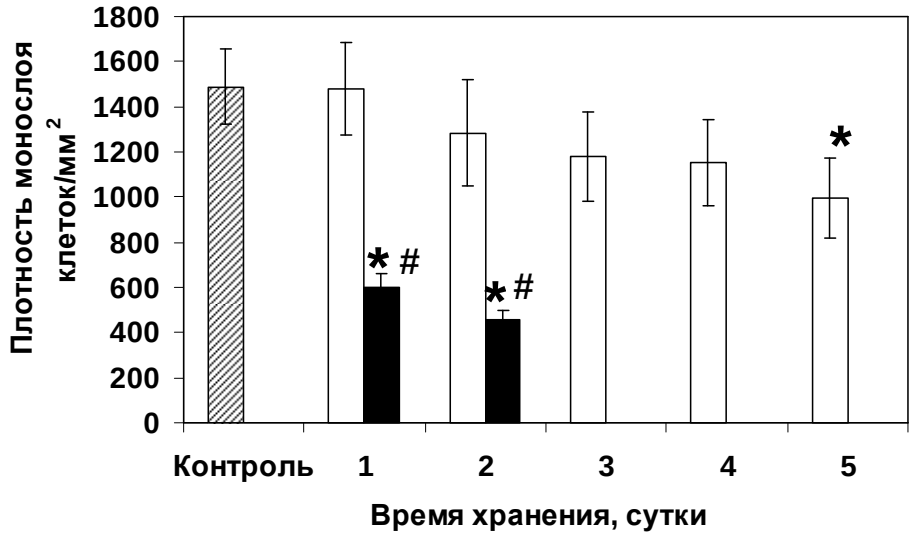


Рис. 3.4.5. Плотность монослоя, формируемого НК агрегатов после ГХ в ССР, 10 суток культивирования: □ – без СКВК; ■ – в присутствии СКВК. * – отличия статистически достоверны по сравнению с агрегатами свежевыделенных клеток, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с агрегатами клеток после ГХ в ССР без СКВК, $p < 0,05$.

Клетки агрегатов, хранившихся в ССР с сывороткой, уже после 1 суток ГХ не были способны к формированию слитного монослоя в культуре, плотность монослоя составляла 603,0 ± 58,0 клеток на мм^2, что в 2,5 меньше, чем в контроле (1489,0 ± 187,0). Агрегаты, которые хранили в ССР без сыворотки, были способны к формированию слитного монослоя, если срок их хранения не превышал 5 суток. Плотность монослоя, который формировали клетки после 4 суток ГХ в ССР, оставалась на уровне контроля, составляя 1151,0 ± 192,0 клеток на мм^2 (рис. 3.4.5). После 5 суток ГХ агрегатов плотность монослоя была достоверно ниже, чем в контроле.

Полученные данные указывают на то, что в процессе ГХ происходит снижение способности клеток агрегатов преобразовывать МТТ в формазан, что приводит к увеличению в процессе хранения количества неокрашенных и слабо окрашенных агрегатов. Однако в процессе культивирования поведение агрегатов, которые хранились на протяжении до 4 суток, лишь незначительно отличалось от поведения агрегатов свежевыделенных клеток. Эти отличия выражались в увеличении времени, необходимого для прикрепления агрегатов и последующего формирования мигрирующими клетками агрегатов монослоя. Однако, как и в случае агрегатов свежевыделенных клеток, в конечном итоге наблюдалось прикрепление к подложке большей части агрегатов и формирование монослоя, на котором появлялись β-тубулин III-положительные нейробластоподобные клетки и колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток. Это указывает на сохранность как дифференцированных НК, так и недифференцированных нейральных СК/ПК при ГХ клеток головного мозга новорожденных крыс на протяжении 4 суток в виде агрегатов.

Увеличение времени ГХ агрегатов НК сопровождается ростом числа летально поврежденных клеток, что проявляется в культуре снижением способности клеток к распластыванию и формированию монослоя. При этом уменьшается, а затем утрачивается способность коммитированных клеток к образованию нейробластов, а стволовых и прогениторных клеток – к

формированию колоний. Это можно объяснить гибелью в процессе хранения либо коммитированных и стволовых/прогениторных клеток, либо клеток, составляющих их микроокружение, и оказывающих регуляторное влияние на их дифференцировку и пролиферацию.

Проведенные исследования также показали, что хранение НК в виде агрегатов является более эффективным по сравнению с хранением суспензии единичных клеток. Максимальное время хранения НК в виде суспензии единичных клеток составляет 2, а при хранении в виде агрегатов – 4 суток. При этом ГХ нервных клеток в составе агрегатов способствует выживанию всех популяций клеток даже при отсутствии в среде хранения сыворотки, являющейся источником гормонов, цитокинов и факторов роста [86]. Эти данные позволяют предположить, что в агрегатах воссоздается микроокружение, обеспечивающее клетки необходимыми для их выживания паракринными и эндокринными факторами, источником которых в случае хранения суспензии единичных клеток выступает сыворотка. Одним из компонентов микроокружения является внеклеточный матрикс. Показано его регулирующее действие на поведение клеток *in vitro*, в частности, на адгезию клеток, их миграцию, пролиферацию и дифференцировку [151, 176]. В процессе формирования клетками агрегатов может происходить образование утраченных компонентов внеклеточного матрикса [196], что оказывает положительное влияние на выживание НК в условиях гипотермии и позволяет увеличить срок их ГХ, независимо от присутствия в среде хранения сыворотки.

Присутствие сыворотки в ССР ухудшает выживание клеток агрегатов в процессе ГХ, что можно объяснить сочетанным действием на плазматическую мембрану раствора сахарозы и белков сыворотки [59]. Так, при помещении клеток в сахарозное микроокружение происходит увеличение отрицательного поверхностного заряда плазматической мембраны [66], что способствует увеличению степени связывания с мембраной белков. Адсорбция белков вызывает локальные перемещения липидов мембраны, их концентрирование в местах связывания белков и формирование доменов. Это приводит к

нестабильности плазматической мембраны и может быть причиной латерального фазового разделения мембраны и нарушения ее барьерных свойств [156], что, в свою очередь, приводит к гибели клеток.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ГХ нервных клеток в составе агрегатов в DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки, и в ССР без сыворотки на протяжении 4 суток не приводит к существенному снижению выживания клеток по сравнению с контролем. При этом лишь наблюдается замедление скорости прикрепления клеток агрегатов к подложке и формирования монослоя, а также увеличение времени, необходимого для появления на монослое колоний нейральных СК и ПК.

Результаты, которые представлены в данном подразделе, опубликованы в следующих работах: [28, 43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изолированные НК новорожденных имеют большие перспективы использования в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний и повреждений головного мозга [172]. В частности, следует отметить перспективность применения изолированных постнатальных НК в качестве модели для изучения влияния гипотермии на клетки нервных тканей. В настоящее время гипотермия успешно используется для уменьшения воспаления и активации восстановления нервных тканей, возникающих вследствие гипоксии и травм [89, 224], в частности у новорожденных [124, 132, 221], головной мозг которых может подвергаться действию гипоксии при рождении. Изучение механизмов действия гипотермии, а также отдаленных последствий ее действия на клетки нервной ткани новорожденных, которые на сегодняшний день остаются мало изученными, позволит разработать более эффективные способы терапии нейродегенеративных заболеваний.

Изолированные НК новорожденных крыс могут также использоваться в качестве модели в биологических, медицинских и фармакологических исследованиях, что требует разработки эффективных способов их хранения. Как правило, изолированные клетки хранят при отрицательных температурах, однако в некоторых случаях более целесообразно применение низких положительных температур, которое может дополнять или быть альтернативой криоконсервированию. Кроме того, использование околонулевых положительных температур является обязательным этапом при заборе биоматериала и выделении клеток, оно предшествует процедуре криоконсервации. Хранение в гипотермических условиях может быть более предпочтительным при кратковременной транспортировке биоматериала из медицинских учреждений в лаборатории для выделения и последующего клинического использования клеток. Эффективное ГХ предполагает создание условий, при которых НК в процессе хранения будут подвергаться минимальным повреждениям. Известно, что для нормального

функционирования клеток важным является их микроокружение, включающее в себя как различные клетки, так и факторы роста, молекулы адгезии и внеклеточного матрикса [54, 84, 88, 162]. В процессе выделения 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 [189, 222], добавка которых к средам для ГХ может способствовать повышению эффективности хранения изолированных НК в гипотермических условиях.

В настоящем исследовании было проведено изучение влияния клеточного и внеклеточного микроокружения на устойчивость гетерогенной суспензии НК новорожденных крыс к условиям ГХ при +4 °С.

Проведенные ранее исследования показали, что НК, изолированные из ткани головного мозга новорожденных крыс представляют собой гетерогенную суспензию, в состав которой входят нейрональные и глиальные предшественники, окончательно дифференцированные клетки, а также СК и ПК, которые способны пролиферировать и дифференцироваться в нейроны и клетки глии в условиях культивирования *in vitro* [16]. В процессе культивирования в среде DMEM/F-12 в присутствии СКВК нервные клетки формируют многоклеточные агрегаты, количество, структура и размер которых зависит от исходной жизнеспособности и концентрации посеянных клеток. При этом в процессе культивирования агрегатов происходит репарация повреждений, полученных клетками при выделении, а также, вероятно, восстановление утраченных молекул адгезии, о чем свидетельствует повышение жизнеспособности клеток в составе агрегатов и способность клеток агрегатов прикрепляться к подложке. Ранее проведенные исследования также показали, что в агрегатах создаются благоприятные условия для выживания нейронов, клеток глии, а также стволовых и прогениторных клеток [16].

Результаты проведенных нами исследований показали зависимость эффективности выживания, прикрепления и распластывания дифференцированных, а также пролиферации нейральных стволовых и прогениторных клеток от видовой принадлежности используемой сыворотки. При использовании СКВК, по сравнению с ФСТ, происходит более быстрое формирование агрегатов и более активное превращение их в сфероиды. При этом присутствие СКВК также способствует активному прикреплению агрегатов к подложке с последующей миграцией и распластыванием составляющих их клеток. Клетки агрегатов, которые культивируют в присутствии СКВК, формируют слитный монослой на 2–5 суток раньше, чем в присутствии ФСТ. При этом в процессе культивирования агрегатов НК в присутствии ФСТ, в отличие от культивирования в присутствии СКВК, на монослое не выявляются колонии недифференцированных нестин/виментин-положительных нейральных стволовых и прогениторных клеток.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что использование для культивирования НК сыворотки крови взрослых крыс создает более благоприятные условия для эффективного функционирования окончательно дифференцированных НК, а также коммитированных и СК/ПК в условиях *in vitro* по сравнению с ФСТ.

В настоящем исследовании также было проведено сравнительное изучение влияния на эффективность ГХ нервных клеток новорожденных крыс, а также их поведение в культуре экстрактов, полученных из тканей головного мозга и печени неонатальных крыс.

Согласно литературным данным, экстракты различных тканей содержат в своем составе широкий спектр физиологически активных веществ, таких как факторы роста, гормоны, биологически активные соединения. Показано также, что экстракты, полученные из разных тканей, отличаются различным качественным и количественным содержанием веществ пептидной и белковой природы [121, 126].

Результаты исследования молекулярно-массового распределения белков и пептидов в экстрактах показали, что ЭМ эмбрионов и новорожденных крыс, а также тотальный экстракт эмбрионов крыс характеризуются присутствием пептидных фракций со сходными молекулярными массами. Вышеперечисленные экстракты сходны как по количеству фракций, так и по их относительному содержанию. ЭМ эмбрионов и новорожденных крыс, а также тотальный экстракт эмбрионов крыс характеризуются самым высоким процентным содержанием пептидных фракций, молекулярные массы которых соответствуют молекулярным массам регуляторных пептидов (около 58% фракций с м.м. от 550 до 5000 Да), а также наименьшим содержанием фракций, молекулярные массы которых соответствуют молекулярным массам белков (м.м. $\geq$ 12000 Да). Проведенные исследования показали, что ЭМ 3-месячных крыс в значительной степени отличается от ЭМ эмбрионов и новорожденных крыс. В ЭМ взрослых крыс часть фракций, которые присутствуют в ткани мозга эмбрионов и новорожденных крыс, исчезает, а остальные перераспределяются в сторону увеличения общей для всех экстрактов низкомолекулярной фракции с м.м. 900 Да. Наименьшее содержание пептидных фракций выявлено в экстрактах печени крыс: 37,8% – в ЭП новорожденных, и 24,2% – в ЭП 3-месячных животных. При этом ЭП 3-месячных крыс характеризуется в 2 раза более низким содержанием пептидных фракций по сравнению с остальными экстрактами. Кроме того, экстракты, полученные из ткани печени крыс разного возраста, характеризуются наибольшим содержанием белковых фракций.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что пептидно-белковый спектр экстрактов зависит от стадии развития животного и типа ткани, из которой экстракты были получены.

Проведенные эксперименты показали, что обогащение среды культивирования НК новорожденных крыс экстрактами, полученными как из тканей головного мозга, так и из ткани печени неонатальных крыс, оказывает влияние на их поведение в культуре *in vitro*. Было установлено, что присутствие

в среде культивирования нервных клеток ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл способствует увеличению скорости формирования конфлюэнтного монослоя и появлению на нем β-тубулин III-положительных нейробластоподобных клеток и колоний нестин/виментин-положительных клеток. При этом присутствие ЭМ в среде культивирования НК в концентрациях 0,1 и 0,2 мг белка/мл не оказывает влияния на их поведение в культуре *in vitro*.

Присутствие в среде культивирования ЭП в концентрации 0,2 мг белка/мл оказывает отрицательное влияние как на формирование НК агрегатов и интенсивность их прикрепления к подложке, так и на последующую миграцию клеток и распластывание. Конфлюэнтный монослой формируется на 1–2 суток позже; в культуре не выявляются колонии нестин/виментин положительных клеток. В присутствии ЭП в среде культивирования НК в концентрации до 0,3 мг белка/мл клетки утрачивают способность к формированию конфлюэнтного монослоя, в культуре не выявляются недифференцированные β-тубулин III-положительные клетки и колонии нестин/виментин-положительных клеток.

Изучение влияния ГХ на выживание изолированных НК новорожденных крыс продемонстрировало значительное снижение их сохранности уже после одних суток хранения, независимо от используемой среды и присутствия в ней сыворотки. При этом поведение в культуре НК, которые хранили на протяжении одних суток в ССР без сыворотки, и в DMEM/F-12, как с сывороткой, так и без нее, практически не отличалось от поведения свежевыделенных клеток. Это указывает на то, что в процессе ГХ происходит гибель летально поврежденных клеток, которые не формируют агрегаты и не прикрепляются к подложке, т.е. не оказывают существенного влияния на результаты культивирования.

Культивирование же нервных клеток после ГХ в ССР с сывороткой уже после одних суток хранения характеризуется образованием мелких рыхлых агрегатов, не способных прикрепляться к подложке, клетки которых в процессе дальнейшего культивирования погибают.

Культивирование НК, которые подвергали ГХ на протяжении 2 суток, продемонстрировало важную роль сыворотки в выживании клеток при хранении в ростовой среде DMEM/F-12. Так, нервные клетки, которые подвергаются ГХ на протяжении 2 суток в DMEM/F-12 без сыворотки, в процессе культивирования формируют мелкие рыхлые агрегаты, которые не прикрепляются к подложке и в течение нескольких суток культивирования погибают. Хотя при этом наблюдается прикрепление и распластывание небольшого количества единичных клеток, характеризующихся глиальной морфологией, монослоя данные клетки не формируют и в конечном итоге также погибают. Культивирование НК, которые хранили в гипотермических условиях на протяжении 2 суток в DMEM/F-12 с сывороткой, характеризуется лишь увеличением времени прикрепления агрегатов к подложке (на 2 суток), и увеличением времени формирования конфлюэнтного монослоя (на 2–3 суток) по сравнению со свежевыделенными клетками.

Проведенные исследования показали, что хранение НК в ССР без сыворотки на протяжении 2 суток сопровождается снижением их жизнеспособности, однако, как показало культивирование, выжившие клетки способны формировать агрегаты, клетки которых в процессе культивирования мигрируют, дифференцируются и формируют конфлюэнтный монослой. Однако время прикрепления агрегатов и время формирования конфлюэнтного монослоя при этом увеличивается, по сравнению со свежевыделенными клетками, на 5 и 4 суток соответственно.

В процессе культивирования НК, которые хранили на протяжении 2 суток в DMEM/F-12 с сывороткой и в ССР без сыворотки, на монослое глии, как и при культивировании свежевыделенных НК, выявлялись β-тубулин III-положительные нейробластоподобные клетки и колонии нестин/виментин-положительных клеток, что указывает на сохранность данных клеток.

ГХ нервных клеток новорожденных крыс в исследованных средах на протяжении 3 и более суток приводит к их гибели. Такие клетки в процессе

культивирования не способны образовывать агрегаты, прикрепляться к подложке и формировать монослой.

Таким образом, проведенные исследования показали, что максимальным временем ГХ, в течение которого НК, изолированные из ткани головного мозга новорожденных крыс, сохраняют свои свойства на уровне свежевыделенных, является 2 суток: дифференцированные НК прикрепляются и распластываются, а стволовые и прогениторные клетки пролиферируют и дифференцируются.

При этом оптимальной средой хранения является DMEM/F-12 с сывороткой, что можно объяснить сходством ее состава с внеклеточной средой организма. Положительное влияние сыворотки можно объяснить тем, что альбумин сыворотки повышает онкотическое давление коллоидов среды хранения, что способствует дегидратации клеток и уменьшению их набухания в процессе хранения. Таким образом, сыворотка является необходимым компонентом DMEM/F-12, используемой в качестве среды для ГХ нервных клеток новорожденных крыс.

ГХ в ССР, обогащенном сывороткой крови, приводит к потере способности клеток формировать агрегаты. Это можно объяснить сочетанным действием на плазматическую мембрану сахарозы и белков сыворотки. Показано, что в сахарозном микроокружении увеличивается отрицательный поверхностный заряд плазматической мембраны [66], что способствует увеличению степени связывания белков сыворотки с мембраной. Адсорбция изолированных белков вызывает локальные перемещения липидов в мембране и их концентрирование в местах связывания белков, что приводит к нестабильности плазматической мембраны и может быть причиной ее фазового разделения и нарушения барьерных свойств [156]. Кроме того, изменение локализации липидов в клеточной мембране может приводить к трансформации ее архитектуры, нарушению связывания регуляторных белков с рецепторами и препятствовать прикреплению клеток к подложке [31].

Результаты исследований по изучению влияния экстрактов на эффективность ГХ нервных клеток новорожденных крыс показали, что

присутствие как ЭМ, так и ЭП неонатальных крыс в среде DMEM/F-12 позволяет сохранять дифференцированные, стволовые и прогениторные нейральные клетки на протяжении 2 суток хранения. Добавка в среду DMEM/F-12 экстрактов мозга или печени новорожденных крыс оказывают действие, подобное действию сыворотки, увеличивая время эффективного хранения НК до 2 суток. Это указывает на то, что ЭМ и ЭП, как и сыворотка, содержат специфические факторы, стабилизирующие ионный транспорт и оптимизирующие энергетическое состояние клеток, способствуя тем самым выживанию клеток в процессе ГХ. Проведенные исследования также показали, что в случае использования в качестве среды хранения ССР проявляется тканеспецифическое действие экстрактов. Присутствие экстракта печени в ССР оказывает отрицательное влияние на выживание НК, если срок хранения превышает 1 сутки.

Полученные в ходе работы данные также продемонстрировали важную роль клеточного микроокружения для выживания СК, ПК и дифференцированных НК, которые находились в условиях гипотермии. Результаты исследований показали, что ГХ нервных клеток в составе агрегатов увеличивает время эффективного хранения клеток при использовании в качестве сред хранения как DMEM/F-12, так и ССР. При этом при использовании в качестве среды хранения DMEM/F-12 (независимо от присутствия в среде сыворотки), а также ССР без сыворотки время эффективного хранения НК увеличивается до 4 суток. Как продемонстрировало культивирование, выживают как дифференцированные, так и стволовые и прогениторные нейральные клетки, о чем свидетельствует образование в процессе культивирования нейронов, клеток глии, β-тубулин III-положительных нейробластоподобных клеток и колоний нестин/виментин-положительных клеток. Увеличение времени хранения НК в составе агрегатов в DMEM/F-12 (независимо от присутствия в среде сыворотки), а также ССР без сыворотки до 5 суток сопровождается снижением эффективности прикрепления агрегатов и гибелью нейральных СК и ПК, на что указывает отсутствие

формирования в процессе культивирования колоний недифференцированных нестин/виментин-положительных клеток.

Присутствие сыворотки в ССР приводит к ухудшению выживаемости НК в составе агрегатов. После хранения в течение 2 суток в ССР с сывороткой большинство агрегатов теряют способность прикрепляться к подложке, а мигрирующие от прикрепленных агрегатов клетки не способны формировать слитный монослой, на монослое не выявляются β-тубулин III-положительные клетки и колонии нестин/виментин-положительных клеток.

Полученные данные указывают на то, что в трехмерных многоклеточных агрегатах происходит восстановление утерянного в процессе изоляции и последующего хранения НК клеточного окружения и, возможно, внеклеточного матрикса, что позволяет клеткам более эффективно выживать и функционировать в культуре *in vitro*. Формирование агрегатов способствует восстановлению клеточного и внеклеточного микроокружения стволовых, прогениторных и дифференцированных НК, что оказывает положительное влияние на их выживание в условиях гипотермии и позволяет увеличить срок их ГХ, независимо от присутствия в среде сыворотки, до 4 суток.

Таким образом, ГХ нервных клеток в виде агрегатов в ростовой среде DMEM/F-12 и ССР позволяет сохранять структурно-функциональное состояние дифференцированных, стволовых и прогениторных нейральных клеток головного мозга новорожденных крыс на уровне свежевыделенных без использования сыворотки.

ВЫВОДЫ

В диссертации представлено теоретическое обобщение и новые экспериментальные подходы для решения проблемы гипотермического хранения нервных клеток головного мозга новорожденных крыс.

1. Введение аллогенной сыворотки крови взрослых крыс в среду культивирования DMEM/F-12 обеспечивает клеткам головного мозга новорожденных крыс условия более полной реализации их свойств по сравнению с использованием фетальной сыворотки телят, а именно: ускоряет прикрепление образованных клеточных агрегатов на 2 суток, способствует формированию более плотного монослоя (в 1,4 раза), обеспечивает более раннее появление нейробластоподобных клеток, способных к экспрессии β-тубулина III (на 2–4 суток) и способность к формированию колоний нестин- и виментин-положительных клеток.

2. Добавление экстракта мозга неонатальных крыс в концентрации 0,3 мг белка/мл для обогащения среды культивирования клеток головного мозга новорожденных крыс ускоряет формирование конфлюэнтного монослоя на 1–2 суток и появление на нем клеток, экспрессирующих β-тубулин III, а также колоний нестин- и виментин-положительных клеток. Добавление экстракта печени неонатальных крыс в концентрации 0,3 мг белка/мл угнетает формирование монослоя и появление на нем β-тубулин III-положительных клеток и колоний нестин- и виментин-положительных клеток.

3. Экстракты тканей мозга и печени крыс различного возраста содержат вещества пептидной и белковой природы, молекулярная масса которых составляет 550 ÷ 12000 Да. С увеличением возраста животных в экстрактах повышается количество белков и снижается количество пептидов. Экстракты печени, независимо от возраста крыс, характеризуются более высоким содержанием белковых фракций.

4. При гипотермическом хранении первичной суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс в среде DMEM/F-12 или в сахарозо-содержащем растворе, независимо от присутствия сыворотки крови, наблюдается постепенное снижение показателей сохранности и метаболической активности клеток. При этом гипотермическое хранение до 2 суток в среде DMEM/F-12 в присутствии сыворотки крови или в сахарозо-содержащем растворе без сыворотки не приводит к изменению поведения клеток при культивировании по сравнению с культурой свежевыделенных клеток головного мозга, а именно: происходит формирование многоклеточных агрегатов, прикрепление их к подложке, миграция клеток и формирование монослоя, на котором появляются β-тубулин III-положительные клетки и колонии нестин- и виментин-положительных клеток.

5. Добавление экстрактов мозга или печени неонатальных крыс в концентрации 0,3 мг белка/мл в среду DMEM/F-12 при гипотермическом хранении первичной суспензии клеток головного мозга новорожденных крыс обеспечивает сохранение дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток на протяжении 2 суток.

6. Гипотермическое хранение клеток головного мозга новорожденных крыс в виде многоклеточных агрегатов в среде DMEM/F-12, независимо от присутствия сыворотки крови, и в сахарозо-содержащем растворе без сыворотки увеличивает время эффективного хранения дифференцированных и стволовых/прогениторных нейральных клеток до 4 суток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимова И.М. Клиническое применение трансплантации эмбриональных зачатков мозга при заболевании эпилепсией / И.М. Акимова, Ф.А. Гурчин, Н.Ю. Королева и др. // Физиология человека. – 2000. – Т. 26, № 3. – С. 67–78.

2. Бабийчук Л.А. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядросодержащих клеток пуповинной крови после криоконсервивроания / Л.А. Бабийчук, В.И. Грищенко, П.М. Зубов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 124–129.

3. Бехтерева Н.П. О трансплантации эмбриональных нервных тканей в лечении паркинсонизма / Н.П. Бехтерева, Е.Г. Гилерович, Ф.А. Гурчик // Журн. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1990. – Т. 90, № 11. – С. 10–13.

4. Бидлингмейер Б. Препаративная жидкостная хроматография / Б. Бидлингмейер, Б. Фрайд, Г. Хегнауер. – М.: Мир, 1990. – 360 с.

5. Бурчинский С.Г. Стресс-протекторные аспекты нейрометаболической фармакопрофилактики / С.Г. Бурчинский // Мистецтво лікування. – 2008. – № 1. – С. 73–75.

6. Вепринцев Б.Н. Руководство по культивированию нервной ткани: методы, техника, проблемы / Борис Николаевич Вепринцев. – М.: Наука, 1976. – 352 с.

7. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія / С.Є. Гальченко // Проблеми кріобіології. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 403–406.

8. Гольцев А.Н. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток / А.Н. Гольцев, Т.М. Гурина, Н.Н. Бабенко, М.В. Останков // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 46–50.

9. Громова О.А. Олигопептидная мембранная фракция Церебролизина / О.А. Громова, А.С. Катаев, В.Е. Третьяков и др. // Журнал неврологии и психиатрии. – 2006 – Т. 106, № 7. – С. 73–75.

10. Егорова А.Б. Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе / А.Б. Егорова, Ю.А. Успенская, С.В. Михуткина, Е.Ю. Ставицкая // Успехи соврем. биол. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 502–510.

11. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек / И.П. Кайдашев // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 4, № 5. – С. 61–74.

12. Кравченко Л.П. Условия длительного хранения изолированных гепатоцитов при 4 °С / Л.П. Кравченко, А.Н. Андриенко // Проблемы криобиологии. – 1993. – № 1. – С. 33–38.

13. Лесняк В.В. Влияние аминокислот и олигопептидов на лимфоидные ткани молодых и старых крыс: автореф. дис. на соискание учёной степени кандидата мед. наук: спец. 14.00.53 «Геронтология и гериатрия» / В.В. Лесняк – СПб., 2009. – 26 с.

14. Линькова С.Н. Стволовые клетки и короткие пептиды: перспективы применения в геронтологии [Электронный ресурс] / Н.С. Линькова, С.И. Тарновская, А.В. Костылев и др. // Геронтология. – 2013. – № 2, 2013. – Режим доступа к журн.: http://gerontology.esrae.ru/2-15

15. Ляшенко Т.Д. Сравнительная характеристика суспензии нервных клеток, полученных из мозга плодов и новорожденных крыс / Т.Д. Ляшенко, М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи», октябрь 2010 р. – К., 2010. – Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16 (Додаток). – С. 115–116.

16. Ляшенко Т.Д. Характеристика ізольованих нервових клітин новонароджених щурів / Ляшенко Т.Д., Сукач О.М. // Патологія. – 2009. – Т. 6, № 1. – С. 55–58.

17. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек / И.П. Кайдашев // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 4, № 5. – С. 61–74.

18. Обухова Л.М. Видовые различия структурного макропортрета сыворотки крови позвоночных животных / Л.М. Обухова, А.В. Дерюгина, О.Н. Никифорова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – Т. 2, № 2. – С. 287–293.

19. Пат. № 16946, Україна, МПК 5C12N5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Кравченко Л.П., Андрієнко А.М., Семенченко О.А., Білоус А.М. – № 4684421/SU; заявл. 20.02.89; опубл. 29.08.1997, Бюл. №4.

20. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения: Монография / А.Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э.Н. Иванов // Л.: ООО «Пресс-экспресс». – 2011. – 368 с.

21. Плескач В.А. Ростмодулирующее и цитотоксическое действие пептида из гемолимфы личинок мухи Calliphora vicina (Diptera, Calliphoridae) *in vitro* / В.А. Плескач, И.В. Кожухарова, И.В. Арцыбашева и др. // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 12. – С. 1005–1011.

22. Семенова В.М. Исследование мультипотентных свойств нейроклеток субвентрикулярной зоны эмбрионального мозга в условиях культивирования / В.М. Семенова, В.В. Медведев, Л.П Стайно // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 3. – С. 325–327.

23. Семенченко О.А. Гипотермическое хранение клеток и тканей эмбрионов человека / О.А. Семенченко, А.Ю. Петренко, А.Н. Сукач и др. // Проблемы криобиологии. – 2001, № 2. – С. 80–84.

24. Семенченко О.А. Сахарозо-содержащий раствор для гипотермического хранения органов / О.А. Семенченко, А.Ю. Петренко, Л.П. Кравченко и др. // Трансплантология. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 253–255.

25. Стэнтон Г. Медико-биологическая статистика / Гланц Стэнтон. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

26. Сукач О.М. Гіпотермічне зберігання ізольованих нервових клітин щурів / О.М. Сукач, М.В. Шевченко, О.В. Оченашко, О. Лебединський // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, вересень 2014 р.: тези доповідей. – Ужгород, 2014. – С. 105.

27. 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 г. – Вестник трансплантологии и искусственных органов. – М., 2012. – Т. 14 (Приложение). – С. 29.

28. Сукач А.Н. Роль формирования многоклеточных агрегатов в выживании изолированных нервных клеток крыс / А.Н. Сукач, М.В.Шевченко, Т.Д. Ляшенко // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє», 7 ноября 2014 г. – К., 2014. – С. 36.

29. Сукач А.Н. Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре / А.Н. Сукач, Т.Д. Ляшенко, М.В. Шевченко // Biotechnologia acta. – 2013. – Т. 6, № 3. – С. 63–68.

30. Торшин И.Ю. Идентификация и анализ пептидов в составе церебролизина: пептиды фактора роста нервов / И.Ю. Торшин, О.А. Громова, Е.И. Гусев и др. // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 25–31.

31. Фролова Е. В. Роль липидов в развитии клеточного повреждения при тепловой ишемии и гипотермической консервации органов // Проблемы низкотемпературной консервации органов и методы борьбы с низкотемпературным повреждением. – М.: ВИНИТИ. – 1987. – Т. 8. – С. 5–57.

32. Хавинсон В.Х. Влияние коротких пептидов на иммунопатологические процессы при старении / В.Х. Хавинсон, В.В. Малинин // Вестник Санкт-Петербургской Гос. мед. академии им. И.И. Мечникова. – 2008. – Т. 28, № 3. – С. 139–142.

33. Хавинсон В.Х. Влияние пептидов на пролиферативную активность клеток сетчатки и пигментного эпителия / В.Х. Хавинсон, В.Н. Земчихина, С.В. Трофимова, В.В. Малинин // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2003. – Т. 135, № 6. – С. 700–702.

34. Хавинсон В.Х. Модель комплементарного взаимодействия коротких пептидов с двойной спиралью ДНК / В.Х. Хавинсон, Л.К. Шатаева // Мед. акад. журн. – 2005. – Т. 5, № 1. – С. 15–23.

35. Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста / В.Х. Хавинсон, В.В. Малинин, Н.И. Чалисова, Е.И. Григорьев // Успехи геронтологии. – 2002. – Т. 3, № 9. – С. 95–100.

36. Цымбалюк В.И. Нейрогенные стволовые клетки: Монография / В.И. Цымбалюк, В.В. Медведев // К.: Коваль. – 2005. – 596 с.

37. Чалисова Н.И. Стимуляция регенерации нейритов Кортексином и эпиталамином в культуре ткани / Н.И. Чалисова, В.Б. Окулов, Д. В. Соловьева // Геронтологические аспекты пептидной регуляции функций организма. – СПб.: Наука. – 1996. – С. 95–103.

38. Шатаева Л.К. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы) / Л.К. Шатаева, В.Х. Хавинсон, И.Ю. Ряднова. – СПб.: Наука, 2003. – 222 с.

39. 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.

40. 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.

41. 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», май 2013 г.: тезисы докладов. – Харьков, 2013. – С. 31.

42. 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», май 2012 г.: тезисы докладов. – Харьков, 2012. – С. 21.

43. 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.

44. Шевченко М.В. Изолированные клетки нервной ткани новорожденных крыс как модель постнатального мозга / М.В. Шевченко, Т.Д. Ляшенко, А.Н. Сукач // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Клітинні технології в акушерстві, гінекології, неопатології та дитячій неврології». – Київ, 2013. – С. 26.

45. Шевченко М.В. Молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах тканей крыс в зависимости от стадии их развития / М.В. Шевченко, А.Ю. Семенченко, А.Н. Сукач // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 2, № 103. – С. 103–107.

46. 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», май 2010.: тезисы докладов. – Х., 2010. – С. 46.

47. Шевченко М.В. Особенности действия экстрактов ткани мозга и печени на нервные клетки новорожденных крыс, культивируемые *in vitro* / М.В. Шевченко // Материалы VI Международной конференции молодых ученых «Біологія: від молекули до біосфери», листопад 2011.: тези доп. – Х., 2011. – С. 118.

48. 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», октябрь 2012.: тезисы докладов. – Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 343.

49. 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», май 2011.: тезисы докладов. – Х., 2011. – С. 35.

50. Шумаков В.И. Проблемы низкотемпературной консервации органов, методы борьбы с низкотемпературным повреждением / Валерий Иванович Шумаков – М.: ВИНИТИ, 1987. – 199 с. – (Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы биологии; Т. 8).

51. Ямсков И.А. Низкомолекулярный гликопротеин из сыворотки крови крупного рогатого скота: структура и свойства / И.А. Ямсков, А.А. Виноградов, А.Н. Даниленко и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 1. – с. 36–42.

52. Abouna G.M. Successful 48-hour preservation of pancreas grafts by cold storage in modified plasma-protein fraction / G.M. Abouna, J.E. Heil, D.E. Sutherland, J.S. Najarian // Transplantation. – 1988. – Vol. 45. – P. 270–274.

53. Alam H.B. Profound hypothermia protects neurons and astrocytes, and preserves cognitive functions in a swine model of lethal hemorrhage / H.B. Alam, Z. Chen, N. Ahuja, H.J. Chen // Surg. res. – 2005. – Vol. 126, N2. – P. 172–181.

54. Alvarez-Buylla A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain / A. Alvarez-Buylla, D.A. Lim // Neuron. – 2004. – Vol. 41, N5. – P. 683–686.

55. Amoureux M.C. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype / M.C. Amoureux, B.A. Cunningham, G.M. Edelman, K.L. Crossin // J. Neurosci. – 2000. – Vol. 20, N10. – P. 3631–3640.

56. Anderson D.S. Can stem cells cross lineage boundaries? / D.S. Anderson, F.H. Gage, I.L. Weissman // Nat. Med. – 2001. – Vol. 7, N4. – P. 393–395.

57. Angst B. The cadherin superfamily: diversity in form and function / B. Angst, C. Marcozzi, A. Magee // J. Cell Sci. – 2001. – Vol. 114, N4. – P. 629–641.

58. Anthony T.E. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system / T.E. Anthony, C. Klein, G. Fishell, N. Heintz // Neuron. – 2004. – Vol. 41, N6. – P. 881–890.

59. Arasteh A. Glycated albumin: an overview of the *In Vitro* models of an *In Vivo* potential disease marker [Электронный ресурс] / A. Arasteh, S. Farahi, M. Habibi-Rezaei, A. Moosavi-Movahedi // J. Diabetes Metab. Disord. – 2014. – Vol. 13, N49. – P. 1–9. – Режим доступа к журн.: http://www.jdmdonline.com/content/13/1/49

60. Armstrong R.J. Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's disease / R. Armstrong, C. Watts, C.N. Svendsen et al. // Cell Transplant. – 2000. – Vol. 9, N1. – P. 55–64.

61. Arsenijevic Y. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 / Y. Arsenijevic, S. Weiss, B. Schneider, P. Aebischer // J. Neurosci. – 2001. – Vol. 21, N18. – P. 7194–7202.

62. Aydin H.M. A morphological study of cell aggregations on mineralization / H.M. Aydin, B. Hu, S. Kesri et al. // 8th International Conference on Cell Engineering (ICCE). – Dublin, 2010. – P. 9–12.

63. Bates R.C. Spheroids and cell survival / R.C. Bates, N.S. Edwards, J.D. Yates // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2000. – Vol. 36, N2–3. – P. 61–74.

64. Belvindrah R. Increased neurogenesis in adult CD24-deficient mice / R. Belvindrah, G. Rougon, G. Chazal // J. Neurosci. – 2002. – Vol. 22, N9. – P. 3594–3607.

65. Bernard A.B. Controlled formation of beta-cell aggregates and their characterization [Электронный ресурс] / A.B. Bernard // University of Colorado at Boulder. – 2013. – 245 p. Режим доступа к диссертации: http://gradworks.umi.com/35/61/3561922.html

66. Bernhardt I. Effects of low ionic strength media on passive human red cell monovalent cation transport / I. Bernhardt, A.C. Hall, J.C. Ellory // J. Physiol. – 1991. – Vol. 434, N1. – P. 489–506.

67. Bonaguidi M.A. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics / M.A. Bonaguidi, M.A. Wheeler, J.S. Shapiro et al. // Cell. – 2011. – Vol. 145, N7. – P. 1142–1155.

68. Bonni A. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway / A. Bonni, Y. Sun, M. Nadal-Vicens et al. // Science. – 1997. – Vol. 278, N5337. – P. 477–483.

69. Borisenko A.V. Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultra low doses Borisenko / A.V. Borisenko, V.P. Yamskova, M.S. Krasnov et al. – N. Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. – 126 p. – (Biochemical Physics Frontal Research).

70. Boya P. Lysosomal membrane permeabilization in cell death / P. Boya, G. Kroemer // Oncogene. – 2008. – Vol. 27, N50. – P. 6434–6451.

71. Brizzi M.F. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche / M.F. Brizzi, G. Tarone, P. Defilippi // Current Opinion in Cell Biology. – 2012. – Vol. 24, N5. – P. 645–651.

72. Burns T.C. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review / T.C. Burns, C.M. Verfaillie, W.C. Low // The Journal of comparative neurology. – 2009. – Vol. 515, N1. – P. 125–144.

73. Cameron H.A. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters / H.A. Cameron, T.G. Hazel, R.D. McKay // J. Neurobiol. – 1998. – Vol. 36, N2. – P. 287–306.

74. Carleton A. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb / A. Carleton, L.T. Petreanu, R. Lansford et al. // Nat. Neurosci. – 2003. – Vol. 6, N5. – P. 507–518.

75. Carson C.T. Stem cells: the good, bad and barely in control / C.T. Carson, S. Aigner, F.H. Gage // Nat. Med. – 2006. – Vol. 12, N11. – P. 1237–1238.

76. Chelli B. Neural cell alignment by patterning gradients of the extracellular matrix protein laminin / B. Chelli, M. Barbalinardo, F. Valle, P. Greco // Interface Focus. – 2014. – Vol. 4, N1. – P. 2042–8901.

77. Chen J. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice / J. Chen, S.S. Magavi, J.D. Macklis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N46. – P. 16357–16362.

78. Chen K.A. Fusion of neural stem cells in culture / K.A. Chen, E.D. Laywell, G. Marshall et al. // Exp. Neurol. – 2006. – Vol. 198, N1. – P. 129–135.

79. Choi S.H. Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF / S.H. Choi, Y. Li, L.F. Parada, S.S. Sisodia // Molecular Neurodegeneration. – 2009. – Vol. 4, N52. – P. 1–12.

80. Choia J.H. Selective brain cooling with endovascular intracarotid infusion of cold saline: a pilot feasibility study / J.H. Choi, R.S. Marshall, M.A. Neimark et al. // AJNR Am J Neuroradiol. – 2010. – Vol. 31, N5. – P. 928–934.

81. Clarke D.L. Generalized potential of adult neural stem cells / D.L. Clarke, C.B. Johansson, J. Wilbertz et al. // Science. – 2000. – Vol. 288, N5471. – P. 1660–1663.

82. Clifton G.L. Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury / G.L. Clifton, J.Y. Jiang, B.G. Lyeth et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1991. – Vol. 11, N1. – P. 114–121.

83. Coder D.M. Assessment of cell viability [Электронный ресурс] / D.M. Coder // Current Protocols in Cytometry. – 2001. – P. 9.2.1 – 9.2.14. – Режим доступа к журн.: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142956.cy0902s15/ figures

84. Condic M.L. Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth / M.L. Condic, P.C. Letourneau // Nature – 1997. – Vol. 389, N6653. – P. 852–856.

85. Conover J.C. The neural stem cell niche / J.C. Conover, R.Q. Notti // Cell Tissue Res. – 2008. – Vol. 331, N1. – P. 211–224.

86. Davis J.M. Basic cell culture. A practical approach / J.M. Davis. – O.: Oxford University Press, 2002. – 381 p.

87. Davis K.L. Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress / K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle et al. – Ph.: American College of Neuropsychopharmacology, 2002. – 2080 p.

88. De Arcangelis A. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development / A. De Arcangelis, E. Georges-Labouesse // Trends. Genet. – 2000. – Vol. 16, N9. – P. 389–395.

89. Deng H. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation / H. Deng, H.S. Han, D. Cheng et al. // Stroke. – 2003. – Vol. 34, N10. – P. 2495–2501.

90. Desoize B. Contribution of three-dimensional culture to cancer research / B. Desoize // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2000. – Vol. 36, N2–3. – P. 59–60.

91. Discher D.E. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells / D.E. Discher, D.J. Mooney, P.W. Zandstra // Science. – 2009. – Vol. 324, N5935. – P. 1673–1677.

92. Doe Chris Q. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation / Q. Doe Chris // Development. – 2008. – Vol. 135, N9. – P. 1575–1587.

93. Doetsch F. A subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain / F. Doetsch, I. Caille, D.A. Lim et al. // Cell. –1999. – Vol. 97, N6. – P. 703–716.

94. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells / F. Doetsch // Nature Neuroscience. – 2003. – Vol. 6, N11. – P. 1127–1134.

95. Duchen M.R. Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death / M.R. Duchen // J. Physiol. – 2000. – Vol. 15, N529. – P. 57–68.

96. Eberspächer E. Long-term effects of hypothermia on neuronal cell death and the concentration of apoptotic proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats / E. Eberspächer, C. Werner, K. Engelhard et al. // Acta Anaesthesiologica Scandinavica. – 2005. – Vol. 49, N4. – P. 477–487.

97. Einstein O. Survival of neural precursor cells in growth factor–poor environment: implications for transplantation in chronic disease / O. Einstein, O. Ben-Menachem-Tzidon, R. Mizrachi-Kol et al. // Glia. – 2006. – Vol. 53, N4. – P. 449–455.

98. Eriksson P.S. Neurogenesis in the adult human hippocampus / P.S. Eriksson, E. Perfililieva, T. Bjork-Eriksson et al. // Nat. Med. – 1998. – Vol. 4, N11. – P. 1313–1317.

99. Flanagan L.A. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins / L.A. Flanagan, L.M. Rebaza, S. Derzic et al. // J. Neurosci. Res. – 2006. – Vol. 83, N5. – P. 845–856.

100. Fuller B.J. Control of intracellular pH in mammalian liver at hypothermia: evidence for a relationship with energy metabolism / B.J. Fuller, C.L. Lockett, E. Proctor, A.L. Busza // Cryobiology. – 1993. – Vol. 30, N6. – P. 543–550.

101. Fuller B.J. Hypothermic renal preservation with a sucrose/polyethylene glycol solution in a rabbit renal transplant model / B.J. Fuller, C. Scurey, N. Lane et al. // Cryoletters. – 2006. – Vol. 27, N2. – P. 127–132.

102. Gage F.H. Mammalian neural stem cells / F.H. Gage // Science. – 2000. – Vol. 287, N5457. – P. 1433–1438.

103. Galli R. Neural stem cells: an overview / R. Galli, A. Gritti, L. Bonfanti, A.L. Vescovi // Circ. Res. – 2003. – Vol. 92, N6. – P. 598–608.

104. Galvin K.A. Adult human neural stem cells for autologous cell replacement therapies for neurodegenerative disorders / K.A. Galvin, D.G. Jones // Neur. Rehabil. – 2006. – Vol. 21, N3. – P. 255–265.

105. Garcia-Parra P. A neural extracellular matrix-based method for in vitro hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells [Электронный ресурс] / P. Garcia-Parra, M. Maroto, F. Cavaliere, N. Naldaiz-Gastesi // BMC Neuroscience. – 2013. – Vol. 14, N48. – P. 1–12. – Режим доступа к журн.: http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/48

106. Ghosh A. Neurite growth inhibitory activity in the adult rat cerebral cortical gray matter / A. Ghosh, S. David // Journal of Neurobiology. – 1997. – Vol. 32, N7. – P. 671–683.

107. Giamanco K.A. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice / K.A. Giamanco, M. Morawski, R.T. Matthews // Neuroscience. – 2010. – Vol. 170, N4. – P. 1314–1327.

108. Giancotti F.G. Integrin signaling / F.G. Giancotti, M. Grumet, M. Flaccus, R.U. Margolis // Science. – 1999. – Vol. 285, N5430. – P. 1028–1032.

109. Glinsky V.V. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium / V.V. Glinsky, G.V. Glinsky, O.V. Glinskii et. al. // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63, N13. – P. 3805–3811.

110. Gonzalez M.E. System antioxidant activity of Cerebrolyzin / M.E. Gonzalez, L. Francis, O. Castelleno // J. Neural. Trasm. – 1998. – Vol. 52. – P. 333–341.

111. Götz M. Glial cells generate neurons – master control within CNS regions / M. Götz // The Neuroscientist. – 2003. – Vol. 9, N5. – P. 379–397.

112. Götz M. Radial glial cells as neuronal precursors – a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice / M. Götz, E. Hartfuss, P. Malatesta // Brain Res. Bull. – 2002. – Vol. 57, N6. – P. 777–788.

113. Götz M. The cell biology of neurogenesis / M. Gotz, W.B. Huttner // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6, N10. – P. 777–788.

114. Grilli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells / G. Grilli, A. Porcellini, G. Lucarelli // Cryobiology. – 1980. – Vol. 17. – P. 516–520.

115. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture / G. Gstraunthaler // Altex. – 2003. – Vol. 20, N4. – P. 275–281.

116. He W. Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis / W. He, C. Ingraham, L. Rising et al. // J. Neurosci. – 2001. – Vol. 15, N21. – P. 8854–8862.

117. Herken R. Initial development of capillaries in the neuroepithelium of the mouse / R. Herken, W. Gotz, K.H. Wattjes // J. Anat. – 1989. – Vol. 164. – P. 85–92.

118. Hoffman S. A proteoglycan with HNK-1 antigenic determinants is a neuron-associated ligand for cytotactin / S. Hoffman, G.M. Edelman // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1987. – Vol. 84, N8. – P. 2523–2527.

119. Inamasu J. Post-ischemic hypothermia delayed neutrophil accumulation and microglial activation following transient focal ischemia in rats / J. Inamasu, S. Suga, S. Sato et al. // J. Neuroimmunol. – 2000. – Vol. 109, N2. – P. 66–74.

120. Isacson O. The production and use of cells as therapeutic agents in neurodegenerative diseases / O. Isacson // Lancet Neurol. – 2003. – Vol. 2, N7. – P. 417–424.

121. Ivanov V.T. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool / V.T. Ivanov, A.A. Karelin, M.M. Philippova et al. // Biopolymers. – 1997. – Vol. 43, N2. – P. 171–188.

122. Jakab K. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems / K. Jakab, A. Neagu, V. Mironov et al. // Proc. Natl. Acad. Science USA. – 2004. – Vol. 101, N9. – P. 2864–2869.

123. Kaech S. Culturing hippocampal neurons / S. Kaech, G. Banker // Nat. Protocols. – 2006. – Vol. 1, N5. – P. 2406–2415.

124. Kanagawa T. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat / T. Kanagawa, H. Fukuda, H. Tsubouchi et al. // Brain Res. – 2006. – Vol. 1111, N1. – P. 36–40.

125. Kaneko Y. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells / Y. Kaneko, S. Sakakibara, T. Imai et al. // Dev. Neurosci. – 2000. – Vol. 22, N1–2. – P. 139–153.

126. Karelin A.A. A novel system of peptidergic regulation / A.A. Karelin, E.Yu. Blishchenko, V.T. Ivanov // FEBS Lett. – 1998. – Vol. 428, N1–2. – P. 7–12.

127. Kelly S. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex / S. Kelly, T.M. Bliss, A.K. Shah et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N32. – P. 11839–11844.

128. Kelm J.M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly / J.M. Kelm, M. Fussenegger // Trends Biotechnol. – 2004. – Vol. 22, N4. – P. 195–202.

129. Khavinson V.K. Peptides regulate cortical thymocytes differentiation, proliferation and apoptosis [Электронный ресурс] / V.K. Khavinson, V.O. Polyakova, N.S. Linkova et al. // J. of Amino Acids. – 2011. – Режим доступа к журн.: http://dx.doi.org/10.4061/2011/517137

130. Kim H.T. Human neurospheres derived from the fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed / H.T. Kim, I.S. Kim, I.S. Lee et al. // Exp. Neurol. – 2006. – Vol. 199, N1. – P. 222–235.

131. Kiss J.Z. Cell biology of polysialic acid / J.Z. Kiss, G. Rougon // Curr. Opin. Neurobiol. – 1997. – Vol. 7, N5. – P. 640–646.

132. Larroque B. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study / B. Larroque, P.Y. Ancel, S. Marret et al. // Lancet. – 2008. – Vol. 371, N9615. – P. 813–820.

133. Larue L. A role for cadherins in tissue formation / L. Larue, C. Antos, S. Butz et al. // Development. – 1996. – Vol. 122, N10. – P. 3185–3194.

134. Lemasters J.J. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury / J.J. Lemasters, A.L. Nieminen, T. Qian et al. // Mol. Cell Biochem. – 1997. – Vol. 174, N1–2. – P. 159–165.

135. Lendahl U. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein/ U. Lendahl, L.B. Zimmerman, R.D. McKay // Cell. – 1990. – Vol. 60, N4. – P. 585–595.

136. Lie D.C. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential / D.C. Lie, G. Dziewczapolski, A.R. Willhoite et al. // J. Neurosci. – 2002. – Vol. 22, N15. – P. 6639–6649.

137. Liedmann A. Cultivation of human neural progenitor cells in a 3-dimensional self-assembling peptide hydrogel / A. Liedmann, A. Rolfs, M.J. Frech // J. Vis. Exp. – 2012. – Vol. 59, N10. – P. 3791–3830.

138. Liesi P. Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum / P. Liesi, G. Hager, H.U. Dodt et al. // Journal of Neuroscience Research. – 1995. – Vol. 40, N2. – P. 199–206.

139. Lim D.A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis / D.A. Lim, A.D. Tramontin, J.M. Trevejo et al. // Neuron. – 2000. – Vol. 28, N3. – P. 713–726.

140. Lin R.Z. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β1-integrin / R.Z. Lin, L.F. Chou, C.M. Chien, H.Y. Chang // Cell Tissue Res. – 2006. –Vol. 324, N3. – P. 411–422.

141. Linkova N.S. Peptides from the pituitary gland and cortex stimulate differentiation of polypotent embryonic tissue / N.S. Linkova, A.V. Trofimov, A.V. Dudkov // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 151, N2. – P. 530–531.

142. Lisak R.P. Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for glial and neural-related molecules in central nervous system mixed glial cell cultures: neurotrophins, growth factors and structural proteins / R.P. Lisak, J.A. Benjamins, B. Bealmear et al. // Journal of Neuroinflammation. – 2007. – Vol. 4, N30. – P. 1–20.

143. Lo E.H. Profiles of extracellular amino acid changes in focal cerebral ischaemia: effects of mild hypothermia / E.H. Lo, G.K. Steinberg, N. Panahian et al. // Neurol. Res. – 1993. – Vol. 15, N4. – P. 281–287.

144. Louis S.A. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay / S.A. Louis, R.L. Rietze, L. Deleyrolle et al. // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, N4. – P. 988–996.

145. Lovell-Badge R. The future for stem cell research / R. Lovell-Badge // Nature. – 2001. – Vol. 414, N6859. – P. 88–91.

146. Lowry O. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. Lowry, R. Rosenbourg, A. Farr, R. Randal // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N1. – P. 265–275.

147. Lu H. The effect of dimensionality on growth and differentiation of neural progenitors from different regions of fetal rat brain in vitro: 3-dimensional spheroid versus 2-dimensional monolayer culture / H. Lu, K. Searle, Y. Liu, T. Parker // Cells Tissues Organs. – 2012. – Vol. 196, N1. – P. 48–55.

148. Luskin M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone / M.B. Luskin // Neuron. – 1993. – Vol. 11, N1. – P. 173–189.

149. Ma D.K. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system / D.K. Ma, M.A. Bonaguidi, G.L. Ming, H. Song // Cell Research. – 2009. – Vol. 19, N6. – P. 672–682.

150. Ma D.K. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis / D.K. Ma, G.L. Ming, H. Song // Curr. Opin. Neurobiol. – 2005. – Vol. 15, N5. – P. 514–520.

151. Ma W. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells [Электронный ресурс] / W. Ma, T. Tavakoli, E. Derby et al. // Developmental Biology. – 2008. – Режим доступа к журн.: http://www.biomedcentral.com/1471-213X/8/9035

152. Margolis R.U. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding / R.U. Margolis, R.K. Margolis // Cell and Tissue Research. – 1997. – Vol. 290, N2. – P. 343–348.

153. Marsh D.C. Hypothermic preservation of hepatocytes: II. Importance of Ca^{+} and amino acids [Электронный ресурс] / D.C. Marsh, F.O. Belzer, J.H. Southard // Cryobiology. – 1990. – Vol. 27, N1. – P. 1–8. – Режим доступа к журн.: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0011224090900478

154. Marti E. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs / E. Marti, P. Bovolenta // Trends Neurosci. – 2002. – Vol. 25, N2. – P. 89–96.

155. Martinez-Ramos C. Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates / C. Martinez-Ramos, S. Lainez, F. Sancho et al. // Tissue Eng. – 2008. – Vol. 14, N8. – P. 1365–1375.

156. Mbamala E.C. Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes / E.C. Mbamala, A. Ben-Shaul, S. May // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 88, N3. – P. 1702–1714.

157. Memberg S.P. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin / S.P. Memberg, A.K. Hall // J. Neurobiol. – 1995. – Vol. 27, N1. – P. 26–43.

158. Merkle F.T. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain / F.T. Merkle, Z. Mirzadeh, A. Alvarez-Buylla // Science. – 2007. – Vol. 317, N5836. – P. 381–384.

159. Michael J. Biology of cell survival in the cold: the basis for biopreservation of tissues and organs [Электронный ресурс] / J. Michael // Advances in Biopreservation. – 2006. – P. 15–62. – Режим доступа к журн.: http://www.andrew.cmu.edu/user/yr25/ TaylorPublications/MJTaylor 107.pdf

160. Minturn J.E. Early postmitotic neurons transiently express TOAD-64, a neural specific protein / J.E. Minturn, D.H. Geschwind, H.J Fryer, S. Hockfield // J. Comp. Neurol. – 1995. – Vol. 355, N3. – P. 369–379.

161. Miyata T. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells / T. Miyata, A. Kawaguchi, K. Saito et al. // Development. – 2004. – Vol. 131, N13. – P. 3133–3145.

162. Morrison S.J. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life / S.J. Morrison, A.C. Spradling // Cell. – 2008. – Vol. 132, N4. – P. 598–611.

163. Mullen R.J. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates / R.J. Mullen, C.R. Buck, A.M. Smith // Development. – 1992. – Vol. 116, N1. – P. 201–211.

164. Murase S. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream / S. Murase, A.F. Horwitz // J. Neurosci. – 2002. – Vol. 22, N9. – P. 3568–3579.

165. Nacher J. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon / J. Nacher, C. Crespo, B.S. McEwen // Eur. J. Neurosci. – 2001. – Vol. 14, N4. – P. 629–644.

166. Nakatomi H. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors / H. Nakatomi, T. Kuriu, S. Okabe et al. // Cell. – 2002. – Vol. 110, N4. – P. 429–441.

167. Nielsen T.H. What happened to the stem cells? / T. H. Nielsen // J. Med. Ethics. – 2008. – Vol. 34, N12. – P. 852–857.

168. Niks M. Towards an optimized MTT assay / M. Niks, M. Otto // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 130, N1. – P. 149–151.

169. Noctor S.C. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases / S.C. Noctor, V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, A.R. Kriegstein // Nat. Neurosci. – 2004. – Vol. 7, N2. – P. 136–144.

170. Opelz G. Multicenter analysis of kidney preservation / G. Opelz, B. Dohler // Transplantation. – 2007. – Vol. 83, N3. – P. 247–253.

171. Pajtler K. Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells / K. Pajtler, A. Bohrer, J. Maurer et al. // J. Vis. Exp. – 2010. – Vol. 27, N45. – P. 2380–2383.

172. Palmer T.D. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death / T.D. Palmer, P.H. Schwartz, P. Taupin et al. // Nature. – 2001. – Vol. 411, N6833. – P. 42–43.

173. Palmer T.D. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS / T.D. Palmer, E.A. Markakis, A.R. Willhoite et al. // J. Neurosci. – 1999. – Vol. 19, N19. – P. 8487–8497.

174. Panchision D.M. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate / D.M. Panchision, J.M. Pickel, L. Studer et al. // Genes Dev. – 2001. – Vol. 15, N16. – P. 2094–2110.

175. Park K.I. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue / K.I. Park, Y.D. Teng, E. Snyder // Nat. Biotechnol. – 2002. – Vol. 20, N11. – P. 1111–1117.

176. Patricia G.P. A neural extracellular matrix-based method for *in vitro* hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells [Электронный ресурс] / G.P. Patricia, M. Marcos, C. Fabio et al. // BMC Neuroscience. – 2013. – Vol. 14, N48. – P. 1–12. – Режим доступа к журн.: http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/48

177. Pearlman A.L. Extracellular matrix in early cortical development / A.L. Pearlman, A.M. Sheppard // Progress in Brain Research. – 1996. – Vol. 108. – P. 117–134.

178. Peretto P. The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain / P. Peretto, A. Merighi, A. Fasolo, L. Bonfanti // Brain Res. Bull. – 1999. – Vol. 49, N4. – P. 221–243.

179. Petrenko A.Yu. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration / A.Yu. Petrenko, A.N. Sukach // Analytical Biochem. – 1991. – Vol. 194, N2. – P. 326–329.

180. Pinto L. Radial glial cell heterogeneity – the source of diverse progeny in the CNS / L. Pinto, M. Gotz // Prog. Neurobiol. – 2007. – Vol. 83, N1. – P. 2–23.

181. Plachta N. Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells / N. Plachta, M. Bibel, K.L. Tucker, Y.A. Barde // Development. – 2004. – Vol. 131, N21. – P. 5449–5456.

182. Plesnila N. Effect of hypothermia on the volume of rat glial cells / N. Plesnila, E. Mauller, S. Guretzki et al. // J. Physiol. – 2000. – Vol. 523, N1. – P. 155–162.

183. Ponimaskin E. Fibroblast growth factor-regulated palmitoylation of the neural cell adhesion molecule determines neuronal morphogenesis / E. Ponimaskin, G. Dityateva, M. Ruonala, M. Fukata // The Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 28, N36. – P. 8897–8907.

184. Potter S.M. Multi-site two-photon imaging of neurons on multi-electrode arrays / S.M. Potter, N. Lukina, K.J. Longmuir, Y. Wu // Proc. SPIE. – 2001. – Vol. 4262. – P. 104–110.

185. Price P.J. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement / P.J. Price, E.A. Gregory // In Vitro. – 1982. – Vol. 18, N6. – P. 576–584.

186. Rakic P. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia / P. Rakic // Cereb. Cortex. – 2003. – Vol. 13, N6. – P. 541–549.

187. Rakic P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective / P. Rakic // Glia. – 2003. – Vol. 43, N1. – P. 19–32.

188. Ramírez-Castillejo C. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal / C. Ramírez-Castillejo, F. Sánchez-Sánchez, C. Andreu-Agulló et al. // Nat. Neurosci. – 2006. – Vol. 9, N3. – P. 331–339.

189. Rauch C. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media / C. Rauch, E. Feifel, E.M. Amann et al. // Altex. – 2011. – Vol. 28, N4. – P. 305–316.

190. Reynolds B.A. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes / B.A. Reynolds, W. Tetzlaff, S. Weiss // J. Neurosci. – 1992. – Vol. 12, N11. – P. 4565–4574.

191. Reynolds B.A. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell / B.A. Reynolds, S. Weiss // Dev. Biol. – 1996. – Vol. 175, N1. – P. 1–13.

192. Reynolds B.A. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system / B.A. Reynolds, S. Weiss // Science. – 1992. – Vol. 255, N5052. – P. 1707–1710.

193. Reynolds B.A. Neural stem cells and neurospheres – reevaluating the relationship / B.A. Reynolds, R.L. Rietze // Nat. Methods. – 2005. – Vol. 2, N5. – P. 333–336.

194. Robinson E.E. Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion / E.E. Robinson, K.M. Zazzali, S.A. Corbett, R.A. Foty // J. Cell Sci. – 2003. – Vol. 116, N2. – P. 377–386.

195. Roitberg B. Transplantation for stroke / B. Roitberg // Neurol. Res. – 2004. – Vol. 26, N3. – P. 256–264.

196. Ruei-Zeng L. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β1-integrin / L. Ruei-Zeng, Ch. Li-Fang, M.C. Chi-Chen, Ch. Hwan-You // Cell Tissue Res. – 2006. – Vol. 324, N3. – P. 411–422.

197. Saito K. Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding protein / K. Saito, T. Matsumoto, N. Fukuda et al. // Brain Res. – 2010. – Vol. 1358. – P. 20–29.

198. Scheffler B. Marrow-mindedness: a perspective on neuropoiesis / B. Scheffler, M. Horn, I. Blumcke et al. // Trends. Neurosci. – 1999. – Vol. 22, N8. – P. 348–357.

199. Schuldiner M. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic cells / M. Schuldiner, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, N21. – P. 11307–11312.

200. Seki T. Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents / T. Seki // J. Neurosci. Res. – 2002. – Vol. 70, N3. – P. 327–334.

201. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells / P.O. Seglen // Meth. Cell Biol. – 1976. – Vol. 13. – P. 29–83.

202. Seri B. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus / B. Seri, J.M. Garcia-Verdugo, B.S. McEwen, A. Alvarez-Buylla // J. Neurosci. – 2001. – Vol. 21, N18. – P. 7153–7160.

203. Shanina I. Efficiency of the sucrose-containing solution on the cold preservation of whole liver / I. Shanina, L. Kravchenko, V. Sampson // CryoLett. – 1998. – Vol. 19, N4. – P. 231–236.

204. Simons B.D. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult / B.D. Simons, H. Clevers // Tissues Cell. – 2011. – Vol. 145, N6. – P. 851–862.

205. Singer D. Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples. Part 2. / D. Singer, H.J. Bretschneider // Thoracic Cardiovasc. Surg. – 1990. – Vol. 38, N4. – P. 212–219.

206. Song H.J. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons / H.J. Song, C.F. Stevens, F.H. Gage // Nat. Neurosci. – 2002. – Vol. 5, N5. – P. 438–445.

207. 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.

208. Svendsen C.N. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson’s disease / C.N. Svendsen, M.A. Caldwell, J. Shen et al. // Exp. Neurol. – 1997. – Vol. 148, N1. – P. 135–146.

209. Taupin P. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor / P. Taupin, J. Ray, W.H. Fischer et al. // Neuron. – 2000. – Vol. 28, N2. – P. 385–397.

210. Taylor M.J. Hypothermia in relation to the acceptable limits of ischemia for bloodless surgery / M.J. Taylor, A.M. Elrifai, J.E. Bailes // Advances in Low Temperature Biology. – 1996. – Vol. 3. – P. 1–64.

211. Taylor M.J. Hypothermic blood substitution: special considerations for protection of cells during *ex vivo* and *in vivo* / M.J. Taylor // Preservation Transfus. Med. Hemother. – 2007. – Vol. 34. – P. 226–244.

212. Todorov P. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver / P. Todorov, E. Hristova, R. Konakchieva et al. // Cell Biol. Int. – 2010. – Vol. 34, N5. – P. 455–462.

213. Tohyama Y. Hypothermia attenuates hyperglycolysis in the periphery of ischemic core in rat brain / Y. Tohyama, K. Sako, Y. Yonemasu // Exp. Brain Res. – 1998. – Vol. 122, N3. – P. 333–338.

214. Tropepe V. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon / V. Tropepe, M. Sibilia, B.G. Ciruna et al. // Dev. Biol. – 1999. – Vol. 208, N1. – P. 166–188.

215. Van Buskirk R.G. Hypothermic storage and cryopreservation successful short- and long-term preservation of cells and tissues / R.G. Van Buskirk, J.M. Baust, K.K. Snyder et al. // Baust BioProcess International. – 2004. – Vol. 2, N10. – P. 42–49.

216. Villa A. Human neural stem cells *in vitro*, a focus on their isolation and perpetuation / A. Villa, F.J. Rubio, B. Navarro et al. // Biomed. Pharmacother. – 2001. – Vol. 55, N2. – P. 91–95.

217. Vitarbo E.A. Tumor necrosis factor alpha expression and protein levels after fluid percussion injury in rats: the effect of injury severity and brain temperature / E.A. Vitarbo, K. Chatzipanteli, K. Kinoshita et al. // Neurosurgery. – 2004. – Vol. 55, N2. – P. 416–424.

218. Wagers A.J. The stem cell niche in regenerative medicine / A.J. Wagers // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 10, N4. – P. 362–369.

219. Wagner J.P. Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor / J.P. Wagner, I. Black, E. DiCicco-Bloom // J. Neurosci. – 1999. – Vol. 19, N14. – P. 6006–6016.

220. Wichterle H. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons / H. Wichterle, I. Lieberam, J.A. Porter, T.M. Jessell // Cell. – 2002. – Vol. 110, N3. – P. 385–397.

221. Xiong M. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain / M. Xiong, G.Q Cheng, S.M. Ma et al. // Neurochem. Int. – 2011. – Vol. 58, N6. – P. 625–633.

222. Xu X.C. Tissue-specific peptides influence human T-cell repertoire to porcine xenoantigens / X.C. Xu, T. Howard, T. Mohanakumar // Transplantation. – 2001. – Vol. 72, N7. – P. 1205–1212.

223. Zhang R.L. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone / R.L. Zhang, Z.G. Zhang, M. Chopp // Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, N3. – P. 345–352.

224. Zhang R.L. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia / R.L. Zhang, Z.G. Zhang, L. Zhang, M. Chopp // Neuroscience. – 2001. – Vol. 105, N1. – P. 33–41.