

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

АЛІ САБІНА ГУЛЬЗАРІВНА

УДК 57.086.13:611.018.82.085.2”461”

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

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Божок Галина Анатоліївна,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків
в.о. провідного наукового співробітника
відділу кріоендокринології.

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

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Кавок Наталія Сергіївна,
Інститут сцинтиляційних матеріалів
НАН України, м. Харків
старший науковий співробітник
відділу наноструктурних матеріалів.

Захист відбудеться «22» квітня 2021 р. о 13:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

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

Автореферат розісланий «19» березня 2021 р.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Культури, отримані з клітин спінальних гангліїв (СГ), є цінним модельним об'єктом для вивчення як фундаментальних проблем нейробиології (механізми сенсорного сприйняття, аксональний транспорт, передача нервового імпульсу, регенерація нервів), так і для виконання практичних завдань медицини. Зокрема, вони можуть бути використані в якості тест-систем для дослідження патогенних механізмів захворювань периферичної нервової системи (ПНС), пошуку потенційно нових способів нейропротекції, визначення ефективності та цитотоксичності лікарських засобів (Melli G. et al., 2009), а також цінного джерела стовбурових/прогеніторних клітин і нейротрофічних факторів для лікування нейродегенеративних захворювань (Singh R. et al., 2009; Ogawa R. et al., 2017; Lo Furno D. et al., 2018).

На особливу увагу дослідників заслуговують мантийні гліоцити (МГ) – гліальні представники ПНС. Результати досліджень останніх років свідчать про важливу роль МГ у створенні мікрооточення для нейронів, синаптичної передачі нервового імпульсу, рециркуляції нейромедіатора глутамату, відповіді на запалення або пошкодження периферичного нерва, розвитку патологічного хронічного болю (Feldman-Goriachnik R. et al., 2018; Ohara P. et al., 2009; Takeda M. et al., 2009; Poulsen J. et al., 2014). У культурі *in vitro* встановлено, що МГ мають характеристики нейральних стовбурових клітин (Wang X. et al., 2019; Li H. et al., 2007; Svenningsen A. et al., 2004).

Варіювання умов культивування є інструментом для отримання культури клітин із заданими властивостями (Адамс Р., 1983). На даний час одним із сучасних перспективних підходів вважається об'ємне (3D) культивування (Petrenko Y., 2017). В умовах 3D-культивування, на відміну від 2D-моношарового, клітини зберігають тканинноспецифічні властивості, притаманні їм просторову орієнтацію й експресію генів, знаходяться в належній регуляторно-трофічній взаємодії з клітинним мікрооточенням і позаклітинним матриксом, проявляють властивості більш ранніх прогеніторів (Duval K. et al., 2017; Byun Y.S. et al., 2014; Li H. et al., 2015).

Відповідно до сучасних біоетичних норм щодо скорочення кількості експериментів на тваринах (Резніков О.Г., 2001; Fernandes M. et al., 2017) виникає завдання щодо створення запасів біологічного матеріалу у вигляді клітинних культур для біомедичних та фармакологічних досліджень. При цьому важливими аспектами є як визначення кінцевих властивостей культур, так і вибір виду тварин, із тканин і органів яких їх отримують, а також розробка оптимальних способів довгострокового зберігання культури.

Кріоконсервування – найкраще вирішення проблеми створення запасів біологічного матеріалу, оскільки дозволяє не тільки зберігати зразки протягом тривалого часу, але й сертифікувати, транспортувати й використовувати їх за необхідністю.

Для інтерпретації експериментальних даних та спроби їх перенесення в сферу практичної медицини або фармакології потрібно враховувати значні еволюційні відмінності між лабораторними гризунами й людиною. З цієї точки зору більш сприятливим модельним об'єктом вважається свиня домашня (*Sus scrofa domesticus*) через схожість до людського геному (Humphray S.J. et al., 2007), а також можливість їх використання як біомедичних моделей (Bassols A. et al., 2014).

У практиці клітинного культивування культури клітин було отримано з чутливих гангліїв курячого ембріона (Mudge A.W. et al., 1981), лабораторних гризунів (Wang X.B. et al.,

2019; de Luka A.C. et al., 2015; Huang T. et al., 2005), собаки (Gerhauser I. et al., 2012; Morgan B.R. et al., 2014), бика (Fadda A. et al., 2016) і мавпи (Tongtako W. et al., 2017). У той самий час культури клітин СГ (ККСГ) свиней майже не вивчено, що обумовлює актуальність наших досліджень у даному напрямку.

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

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – отримання ККСГ неонатальних поросят (НП) у вигляді моношарової культури і мультиклітинних сфероїдів (МС), вивчення їх морфофункціональних та імунофенотипових характеристик, а також оцінка впливу кріоконсервування в кріозахисних середовищах (КЗС) із різною концентрацією диметилсульфоксиду (ДМСО) на основні властивості культур.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити такі завдання:

1. Дослідити вплив складу культурального середовища (КС), термінів культивування та субкультивування на утворення моношарової культури і МС із клітин СГ НП.
2. Проаналізувати морфофункціональні й імунофенотипові властивості моношарової культури і МС із клітин СГ НП.
3. Оцінити вплив кріоконсервування в КЗС із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні та імунофенотипові властивості МС із клітин СГ НП.
4. Вивчити вплив кріоконсервування в КЗС із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні й імунофенотипові властивості первинної культури з клітин СГ НП.
5. Дослідити вплив кріоконсервування в КЗС із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні властивості культури першого пасажу.

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

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

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

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше було визначено ряд необхідних та достатніх умов культивування клітин зі СГ НП.

Уперше було охарактеризовано основні морфологічні, імунофенотипові, проліферативні та міграторні властивості ККСГ НП. Дані, встановлені щодо принципів 2D та 3D-структурної організації культури, її клітинного складу та проліферативного потенціалу, дозволяють рекомендувати ККСГ як цінний об'єкт для вивчення механізмів формування, розвитку та регуляції, що відбуваються у ПНС в неонатальний період.

Уперше було проведено кріоконсервування ККСГ НП у вигляді суспензії клітин та МС, визначено стійкість клітин до кріоконсервування та його вплив на основні структурно-функціональні властивості ККСГ.

Уперше було встановлено оптимальні концентрації кріопротектора ДМСО для отримання істотної кількості життєздатних клітин, зокрема МГ, та збереження співвідношення основних морфологічних типів клітин у культурі.

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

Практичне значення отриманих результатів. Уперше було отримано ККСГ НП у вигляді моношарової культури або МС та встановлено режим її низькотемпературного консервування, що має практичну цінність для використання в галузі біології, медицини, біотехнології, ветеринарії та фармації. Розроблено методичні підходи та відпрацьовано цикл «культивування-кріоконсервування-субкультивування» для ККСГ, що дозволяє впровадити отриману культуру в практику для вивчення впливу фізико-хімічних факторів лікарських речовин, стійкості до вірусів, створення тканинно-інженерних конструкцій, отримання кондиційного середовища.

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

Уперше встановлено, що режим кріоконсервування, який включає три етапи (етап I – зі швидкістю 0,5°C/хв до -20°C; етап II – зі швидкістю 1°C/хв до -80°C; етап III – занурення у рідкий азот) та використання КЗС на основі 7,5% ДМСО, є прийнятним для кріоконсервування МГ. Цей результат може бути застосовано в практиці кріоконсервування гліальних клітин ПНС, отриманих із інших джерел.

Нові дані щодо процесів розвитку моношарової культури та МС зі СГ, а також їх чутливості до дії низьких температур можуть бути використані для читання курсів лекцій і проведення практичних занять для студентів вищих навчальних закладів біологічного та медичного профілю.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Автором самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, проаналізовано джерела літератури за темою дисертаційної роботи, написано всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримано експериментальні результати, проведено їх аналіз і статистичну обробку й сформульовано попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором було інтерпретовано результати й зроблено остаточні висновки. Здобувачем спільно з к. б. н. Коваленко І. Ф. проведено дослідження з використанням методу флуоресцентної мікроскопії.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [1–11] – у плануванні експериментів, отриманні первинної ККСГ НП;
- у роботах [1, 6, 7] – в отриманні первинної ККСГ НП і вивченні впливу складу КС на її морфологічні та проліферативні характеристики;

– у роботах [2, 7, 9] – у вивченні впливу складу КЗС й трьохетапного режиму заморожування на морфофункціональні характеристики МС, отриманих у первинній ККСГ НП;

– у роботах [3, 10, 11] – в оцінці впливу кріоконсервування в присутності різних концентрацій кріопротектора ДМСО на морфофункціональні властивості ККСГ, збагаченої мантийними гліоцитами;

– у роботах [2–4, 8, 10] – у вивченні за допомогою імуноцитохімічного методу експресії β -III-тубуліну, глутамінсинтетази, білка S100 і хромограніну А в ККСГ НП.

– у роботах [5] – у дослідженні впливу кріоконсервування в присутності різних концентрацій кріопротектора ДМСО на життєздатність і морфологічний склад ККСГ НП різних пасажів.

– у роботах [2, 3, 5, 8, 9, 11] – у кріоконсервуванні клітин СГ у вигляді суспензії та МС.

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

Публікація матеріалів. За темою дисертації опубліковано 11 робіт, із них – 4 статті в спеціалізованих виданнях України (2 – входять до міжнародної наукометричної бази Scopus), 1 стаття – у зарубіжному журналі, 6 публікацій – у збірниках тез конференцій.

Об'єм та структура дисертації. Дисертація викладена на 156 сторінках друкованого тексту (з яких 108 сторінок – основна частина) та містить наступні розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, два розділи результатів власних досліджень, обговорення результатів, висновки, список літератури. Список літератури включає 262 найменування, розміщених на 30 сторінках. Робота проілюстрована 19 рисунками, 29 мікрофотографіями і таблицею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз експериментальних і теоретичних даних літератури, які стосуються нервового гребеня і його нейральних похідних, структурно-функціональні особливості СГ, морфологічні й фенотипові властивості МГ, охарактеризовано різні підходи до культивування культур клітин чутливих гангліїв і закономірності формування МС. Викладено основні методи кріоконсервування клітин СГ.

Матеріали і методи дослідження. В експериментах використовували СГ поросят першого покоління гібридів порід велика біла/ландрас і макстер/дюрорк у першу добу після народження ($n=47$). Експерименти були проведені відповідно принципів роботи на тваринах, схвалених Комітетом із біоетики ІПКіК НАН України (протокол №5 від 26.11.2019 р.).

Моношарове (2D) культивування проводили з використанням поживного середовища (ПС) α -MEM із додаванням антибіотиків (100 мкг/мл гентаміцину та 100 мкг/мл цефотаксиму), амфотерицину В (2,5 мкг/мл), 10% фетальної телячої сироватки (ФТС) при 37°C у атмосфері 5% CO₂ та 95% повітря. Клітини, отримані зі СГ, висівали в концентрації $2,5\text{--}5 \times 10^5$ клітин/мл. За умов об'ємного (3D) культивування використовували КС, яке не містило сироватку, приготоване на основі ПС α -MEM із додаванням 2% B27 («Thermo Fisher

Scientific», США) або Нейромакс («ПанЕко», Росія), гентаміцину (100 мкг/мл) й амфотерицину В (2,5 мкг/мл). Посівна концентрація клітин, лабораторний пластик і склад атмосфери культивування відповідали зазначеним вище. Заміну КС (або половину КС в разі культивування МС) здійснювали кожні 3–4 доби.

Для пересіву МС переносили на 8–10 добу в 24-лункові планшети з адгезивною поверхнею на КС, яке містило 10% ФТС. Для пересіву моношарової культури клітини відкріпляли від ростової поверхні за допомогою ферментативного розчину (0,05% розчину трипсину в розчині Версену).

Для морфологічного аналізу клітинний моношар фіксували в 4%-му розчині параформальдегіду (ПФА, «Sigma», США) протягом 15 хв, забарвлювали гематоксиліном та еозинном за стандартною методикою.

Спостереження за клітинами в культурі СГ та мікрофото зйомку здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа «Біомед-4І» («Біомед», Росія) з відеоокуляром «Tour Cam» («Touptek», Китай) та конфокального лазерного мікроскопа «Carl Zeiss AxioObserver Z» («Carl Zeiss», Німеччина).

Морфометричний аналіз проводили за мікрофотографіями з використанням програм «TourView 3.7» («Touptek») та «AxioVisionRel. 4.8» («CarlZeiss»).

Для кріоконсервування культури клітин СГ у вигляді МС використовували МС на восьму добу культивування; суспензії клітин – моношарову культуру 5–7-ї доби культивування. У кожній серії експериментів половину МС або клітинної суспензії піддавали кріоконсервуванню, а другу половину (контроль, інтактна культура) пересівали у вищевказані умови 2D- або 3D-культивування. Зразки клітинної суспензії та МС заморожували за допомогою програмного заморожувача ЗПМ-1 («Отель», Україна) за наступною програмою: етап I – зі швидкістю 0,5°C/хв до –20°C; етап II – зі швидкістю 1°C/хв до –80°C із наступним зануренням у рідкий азот (етап III). У роботі було використано кріопротекторні розчини на основі РС α -MEM із додаванням 25% ФТС та ДМСО («AppliChem», Німеччина) у кінцевих концентраціях 5, 7,5 та 10%. Насичення кріопротектором проводили протягом 15 хв при 4°C. У кожну кріопробірку поміщали 1 мл суспензії з концентрацією $3\text{--}4 \times 10^5$ клітин/мл або 15–20 МС/мл. Відігрівання здійснювали на водяній бані при 37°C.

Приналежність клітин культури до субпопуляцій нейронів або гліальних клітин досліджували за допомогою забарвлення антитілами до β -III-тубуліну – маркера нейрональних клітин (Svendsen C. et al., 2001), ГС – маркера МГ (Hanani M. et al., 2005), S100 – маркера шваннівських клітин (Bierlein De la Rosa M. et al. 2017). Ядра клітин забарвлювали Hoechst 33342 (5 мкг/мл). Для визначення імунофенотипу клітин використовували перші поліклональні антитіла миші до β -III-тубуліну («Abcam», Велика Британія; 1: 600), глутамінсинтетази (ГС, «Abcam»; 1: 600) і поліклональні антитіла миші до S100 («Abcam»; 1: 250), а також другі Alexa Fluor 488-кон'юговані антитіла кози до IgG миші («Abcam»; 1: 750).

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

$A = \text{ПМС} / \text{ЗМС} \times 100\%$, де ПМС – кількість прикріплених МС; ЗМС – загальна кількість МС.

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

$V = (BMC/PMC) \times 100\%$, де BMC – кількість прикріплених МС, із яких мігрували клітини; PMC – загальна кількість прикріплених МС.

Відносну площу моношару, сформованого клітинами МС, визначали на 5, 10, 15 і 25-ту доби, а клітин моношарової культури на 2, 4, 6, 8, 10-ту доби. Показник розраховували за формулою: $S \text{ моношару} = \sum S \text{ забарвлених ділянок} / S \text{ лунки} \times 100\%$.

Відносну кількість клітин певного морфологічного типу вираховували за формулою:

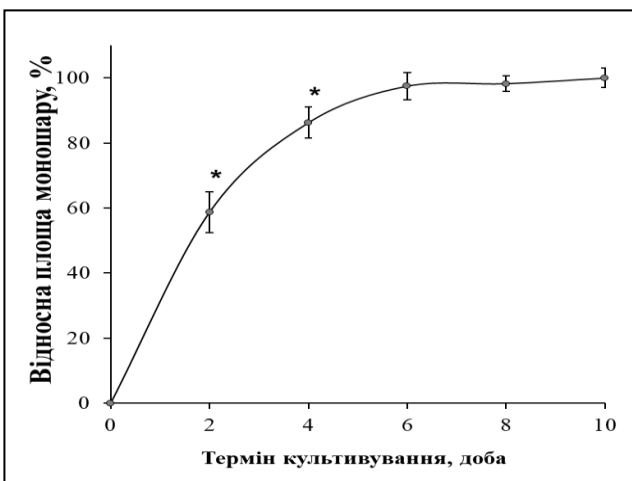
$C = (A/B) \times 100\%$, де A – кількість клітин певного морфологічного типу; B – загальна кількість клітин.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфофункціональні та імунофенотипові властивості ККСГ НП. Встановлено, що додавання ФТС до КС є вирішальною умовою для отримання ККСГ у вигляді моношару або МС. Культивування у КС з 10% ФТС приводить до формування моношару, а із заміниками сироватки (B27 або Нейромакс) – до утворення МС.

При культивуванні з ФТС формування моношару завершувалося до 6-ї доби (рис. 1). Морфологічний аналіз виявив присутність чотирьох морфологічних типів клітин у культурі (рис. 2). Світлі великі клітини згідно зі спостереженнями попередніх авторів (Miller K. et al., 2002; Smith R. et al., 1986) були ідентифіковані як тіла чутливих нейронів (ЧН). Решту клітин, які, очевидно, належали до представників периферичної глії, було розділено на три морфологічні типи: полігональні клітини з вираженими сплюсненими відростками (тип 1); веретеноподібні клітини з двома тонкими відростками (тип 2); великі розпластані фібробластоїдні клітини (тип 3). Співвідношення клітин різних типів у складі моношару змінювалося протягом культивування. Клітини типів 1 та 2 переважали в первинній культурі та становили $(49,5 \pm 2,4)\%$ та $(41,7 \pm 1,5)\%$ відповідно.



Кількість ЧН і клітин типу 3 була незначною: $(3,5 \pm 0,6)$ і $(5,3 \pm 1,9)\%$ відповідно. В умовах культивування ККСГ із використанням безсироваткового КС, яке містило домішки B27 або Нейромаксу, формувалися флотуючі МС (рис. 3), розмір і кількість яких змінювалася зі збільшенням терміну культивування (рис. 4).

Рис. 1. Відносна площа моношару у процесі культивування первинної ККСГ НП

Примітка: * – відмінності статистично

значущі ($p \leq 0,05$) відрізняються від 6-ї доби.

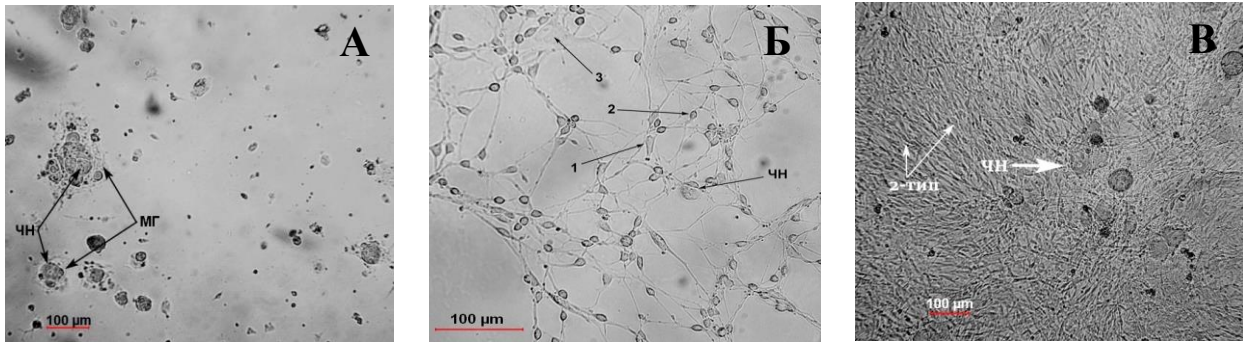


Рис. 2. Первинна ККСГ НП, отримана у процесі культивування в КС, яке містило 10% ФТС. 1-а (А), 3-я (Б) і 15-а (В) доба культивування. ЧН – тіла чутливих нейронів; МГ – мантийні гліоцити; 1, 2, 3 – клітини типів 1–3

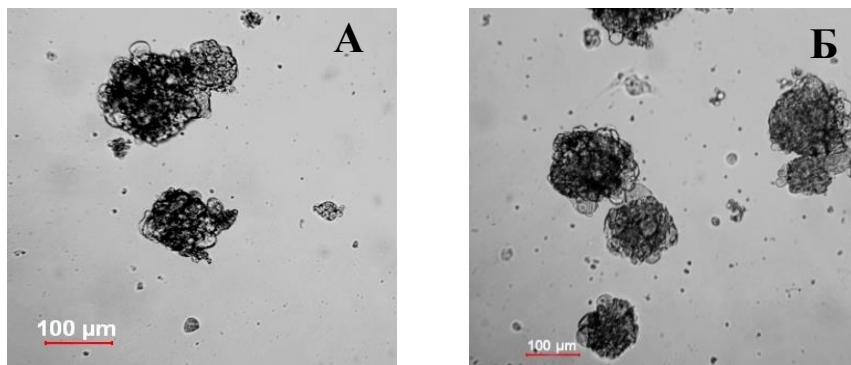


Рис. 3. МС у ККСГ НП, яка була отримана в безсироваткових умовах із додаванням 2% В27 (А) або 2% Нейромаксу (Б) на 5-у добу культивування

Середній діаметр МС під час культивування в КС з Нейромаксом становив (151 ± 55) мкм, а їхня кількість дорівнювала (14 ± 4) МС/ 10^6 посіяних клітин, у той час як у КС з В27 середній розмір МС становив (151 ± 20) мкм, а кількість – (7 ± 3) МС/ 10^6 посіяних клітин (рис. 4). У термінальні строки культивування (25-та доба) кількість МС була значно менша порівнянно з 5-ю добою. Кількість МС зменшувалась як через злиття окремих МС, так і через їх руйнування. Це вказує на те, що використані безсироваткові КС підходять для отримання МС, але не для їхньої довгострокової підтримки в умовах культивування *in vitro*.

Пересів МС у КС, яке містить ФТС, сприяє їх прикріпленню й міграції з них клітин (Плаксина О.М. і співавт., 2017). Аналіз сформованого при цьому моношару дозволяє з'ясувати, які типи клітин у складі МС мають здатність до міграції та проліферації. У наших експериментах при пересіві 8-добових МС у КС з 10% ФТС, протягом першої доби спостерігалось прикріплення до поверхні культурального посуду $(88,5 \pm 8)\%$ МС, при цьому з $(90 \pm 9)\%$ адгезованих МС мігрували клітини (рис. 5). Мультиклітинні сфероїди, які формувалися на пізніх термінах культивування (21–25-та доби), втрачали здатність до адгезії при пересіві на вищезазначене КС.

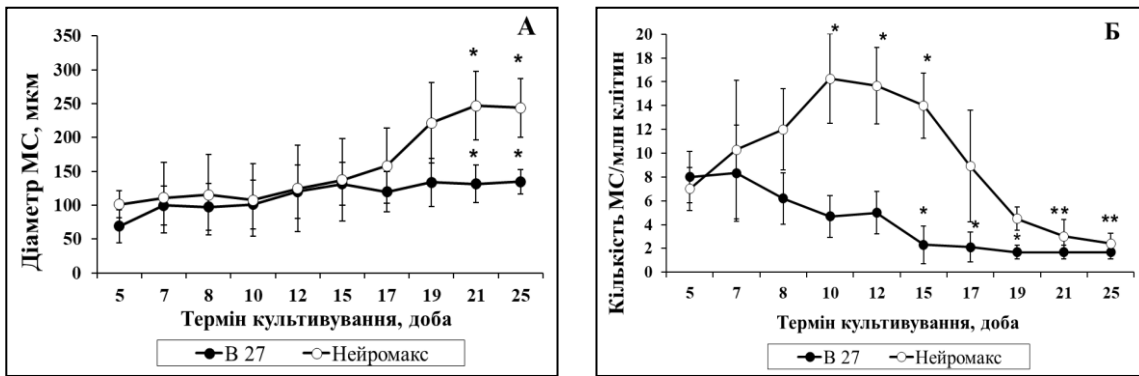


Рис. 4. Діаметр (А) і кількість (Б) МС у ККСГ НП, яка була отримана в безсироваткових умовах із додаванням В27 або Нейромаксу

Примітка: * – відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з 5-ю добою культивування.

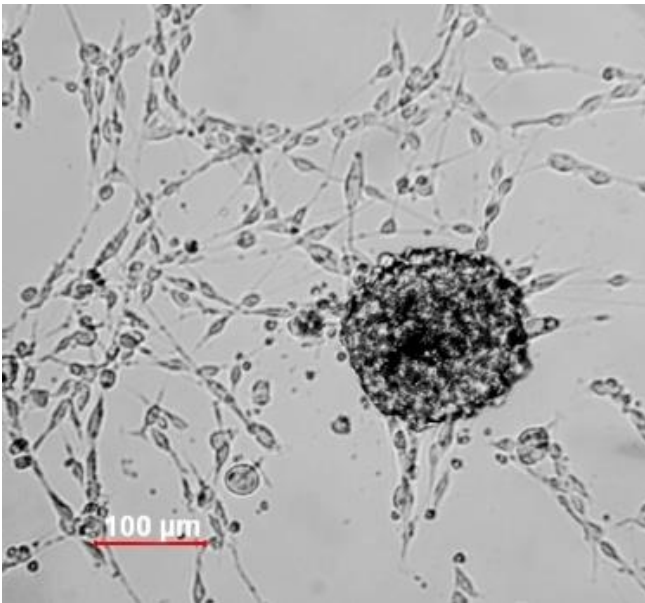


Рис. 5. Міграція клітин із МС після пересіву в КС з 10% ФТС на першу добу субкультивування. МС є прикріпленим до поверхні культурального посуду

Клітини швидко проліферували й до 10-ї доби утворювали конфлюентний моношар (рис. 6), що мав вигляд «мережі». При пересіві МС у моношарі були виявлені клітини трьох морфологічних типів, аналогічних клітинам моношарової культури, незалежно від того, в

присутності якої домішки (В27 або Нейромакс) формувалися МС (таблиця). Виходячи з того, що анатомічно до складу СГ входять ЧН, МГ, шваннівські клітини, клітини ендотелію капілярів і фібробласти (Lawson S., 1992), в отриманій ККСГ могли знаходитися всі вищезазначені типи.

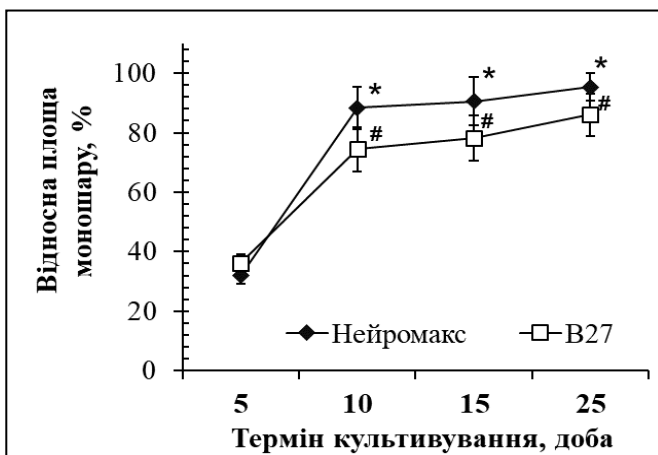


Рис. 6. Відносна площа моношару, сформованого клітинами, які мігрували з МС при пересіві в КС з 10% ФТС

Примітка: *, # – відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з п'ятою добою культивування для КС, що містять Нейромакс або В27 відповідно.

Кількість клітин певного типу (%), які мігрували після пересіву МС, утворених за умов культивування з домішками В-27 або Нейромакс

Вид домішки	Клітини типу 1	Клітини типу 2	Клітини типу 3
В-27	6 ± 3	20 ± 6	74 ± 10
Нейромакс	8 ± 3	31 ± 7	61 ± 11

Імуноцитохімічне мічення з антитілами як моношару первинної культури, так й моношару, утвореного після пересіву МС, показало фенотипову гетерогенність культури.

Клітини, які експресували β -III-тубулін, розрізнялися морфологічно. Одні з них представляли собою дрібні клітини з довгими розгалуженими відростками, що формували мережу, тому були ідентифіковані як нейрони (рис. 7, А, Б). Інші були великими, розпластаними фібробластоїдними клітинами з невеликими відростками (рис. 7, В, Г). Оскільки морфологічно дані клітини не належать до нейронів, вони можуть відноситися до інших клітин-похідних нервового гребеня, які теж мають здатність до експресії β -III-тубуліну (Locher H. et al., 2013, 2015; Draberova E. et al., 2008; Schafer M. et al., 2010).

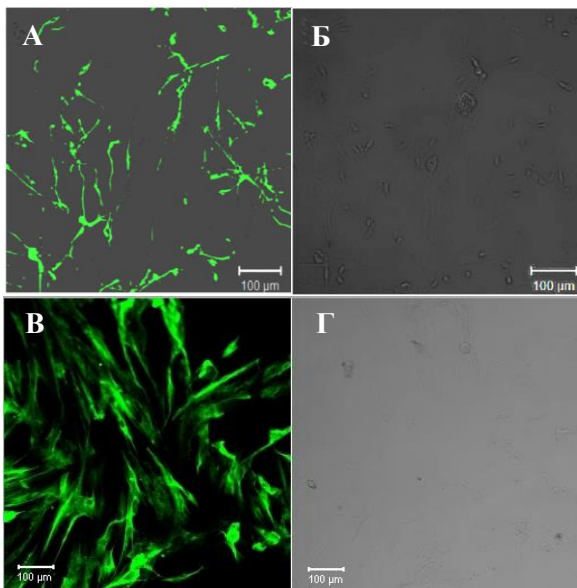
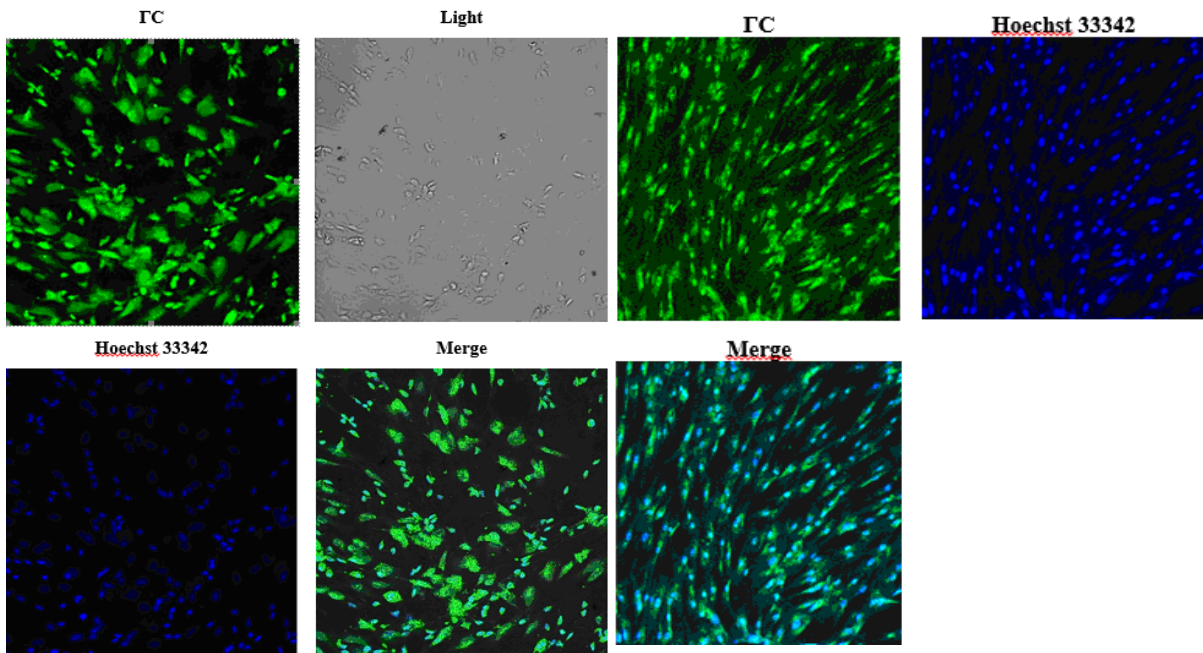


Рис. 7. Експресія β -III-тубуліну (зелена флуоресценція) клітинами з довгими розгалуженими відростками (тип 1, А, Б) і клітинами типу 3 (В, Г) у 2-D ККСГ. Сьома доба субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна (А, В) і світлова (Б, Г) мікроскопія

Клітини типу 2 (дрібні веретеновидні) та типу 3 (великі фібробластоїдні) експресували ГС, що характеризувало їх як МГ (рис. 8). Відносна кількість ГС-позитивних клітин у ККСГ НП становила $(80,0 \pm 1,2)\%$. Решта клітин моношару мала вигляд розпластаних полігональних клітин (типу 1), що не експресували ГС. Клітин, які б експресували S100, у культурі не спостерігалось. Це свідчило про те, що в обраних нами культуральних умовах шваннівські клітини не підтримуються.

Субкультивування є важливим етапом для збільшення кількості клітин, необхідної для виконання поставлених завдань. У наших експериментах пересів первинної культури приводив до елімінації тіл ЧН, зменшення кількості клітин типу 2 й експансії клітин типу 3 протягом двох пасажів. Кількісний аналіз показав, що на першому пасажі спостерігалось $(50,8 \pm 1,9)\%$ клітин типу 3, $(37,0 \pm 2,2)\%$ клітин типу 2 і $(12,3 \pm 1,5)\%$ клітин типу 1, а на

другому пасажі – $(66,0 \pm 1,8)\%$ клітин типу 3, $(29,0 \pm 1,8)\%$ клітин типу 2 та $(5,0 \pm 0,8)\%$ клітин типу 1 (рис. 9).



А

Б

Рис. 8. Експресія ГС (зелена флуоресценція) фібробластоїдними клітинами (типу 3) і дрібними клітинами з довгими відростками (типу 2) у 2D-ККСГ (А) та моношарі, що сформувався при пересіві МС, отриманих у 3D-ККСГ (Б). Сьома доба субкультивування. Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (синя флуоресценція). Об'єднане зображення (Merge) демонструє ко-локалізацію забарвлення. Фіксований препарат, світлова (Light) та флуоресцентна мікроскопія

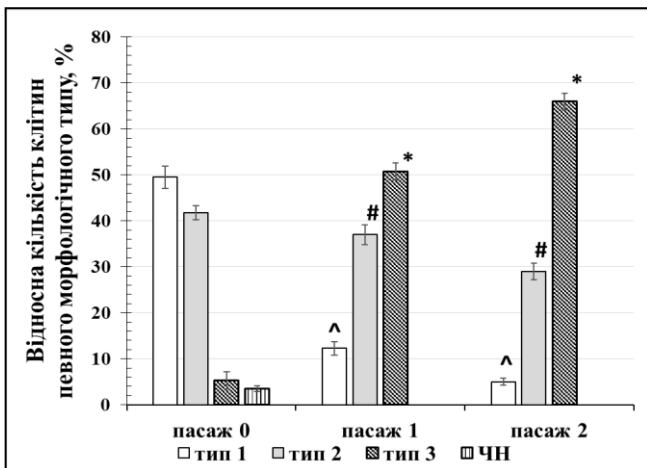


Рис. 9. Співвідношення клітин різних морфологічних типів у ККСГ різних пасажів
Примітка: ^, #, * – відмінності статистично значуще ($p \leq 0,05$) відрізняються порівняно з нульовим пасажем для клітин типів 1–3 відповідно.

Вплив кріоконсервування у КЗС із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні та імунофенотипові властивості ККСГ НП. Кріоконсервуванню була піддана ККСГ як у вигляді клітинної суспензії, отриманої в результаті дезагрегації моношару (2D-умови), так і МС (3D-умови) у КЗС із концентрацією ДМСО 5, 7,5 та 10 %.

На підставі даних літератури щодо кріоконсервування як багатоклітинних структур, так і суспензії поодиноких клітин (Kawamoto J. et al., 1986; Seggio A. et al., 2008; Боценовський

В.А. та співавт., 1994; Massie I. et al., 2011), нами було обрано режим, який включав насичення у КЗС з кріопротектором ДМСО протягом 15 хв при 4°C, із подальшим трьохетапним охолодженням: 1 – зі швидкістю охолодження 0,5 °C/хв до -20°C; 2 – зі швидкістю 1°C /хв від -20°C до -80°C; 3 – занурення в рідкий азот.

Вплив кріоконсервування на морфофункціональні та імунофенотипові властивості ККСГ, отриманої в 2D-умовах культивування. Встановлено, що кріоконсервування ККСГ у вигляді клітинної суспензії в усіх використаних КЗС зменшувало показник збереженості клітин (рис. 10), а саме: 5 і 10% ДМСО – на 9,3 та 8,9% відповідно ($p \leq 0,05$); 7,5% ДМСО – на 4,9% порівняно з контролем ($92,6 \pm 1,6\%$). Після кріоконсервування вихід клітин становив: ($74,3 \pm 8,1\%$) у КЗС з 5% ДМСО; ($78,3 \pm 7,1\%$) у КЗС з 7,5% ДМСО; ($63,7 \pm 9,2\%$) КЗС з 10% ДМСО.

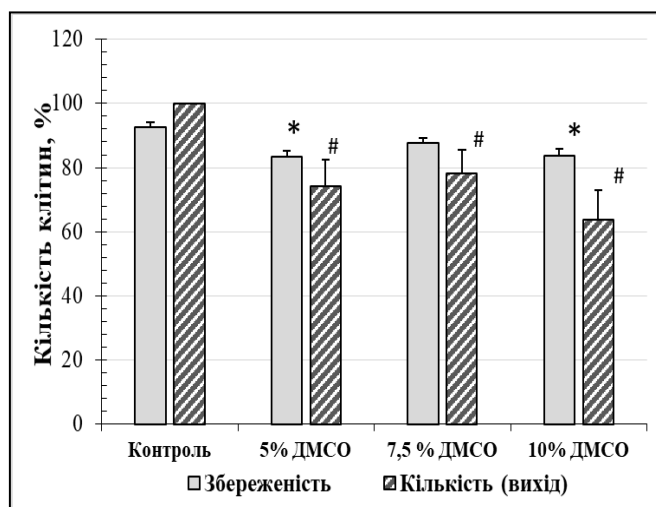


Рис. 10. Збереженість і вихід клітин після кріоконсервування ККСГ у КЗС із різними концентраціями ДМСО

Примітка: *, # – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем.

Виявлено, що кріоконсервування знижувало швидкість формування моношару (рис. 11). Якщо на четверту добу в інтактному контролі відносна площа моношару становила ($86,2 \pm 4,7\%$), то в кріоконсервованих зразках була майже вдвічі меншою ($p \leq 0,05$). При цьому не спостерігалось значних відмінностей між культурами, замороженими з ДМСО в концентраціях 5% (площа моношару ($36,2 \pm 6,2\%$)); 7,5% (площа моношару ($37,5 \pm 5,0\%$)) і 10% ДМСО (площа моношару ($45,0 \pm 7,1\%$)).

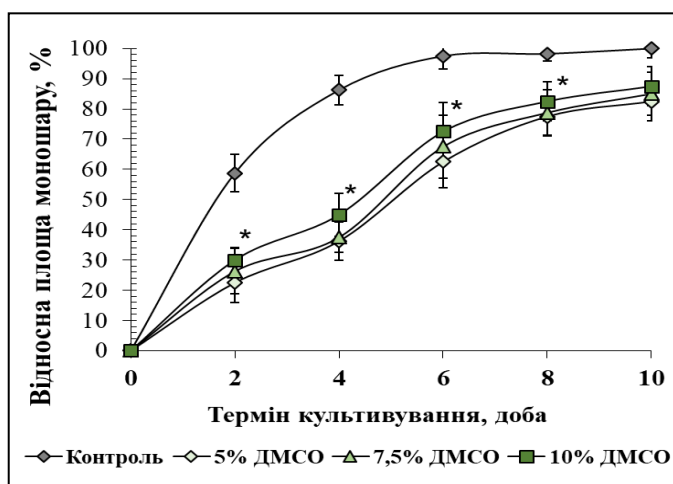


Рис. 11. Відносна площа моношару під час субкультивування контрольної та кріоконсервованої ККСГ у присутності різних концентрацій ДМСО

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем.

Морфологічний аналіз показав, що моношар, отриманий із кріоконсервованих зразків ККСГ, включав три типи клітин (типи 1–3), характерних для контрольної культури. При цьому встановлено, що кріоконсервування змінювало співвідношення морфологічних типів клітин у культурі (рис. 12). Кількість клітин типу 1 збільшувалася в усіх кріоконсервованих

зразках порівняно з контролем. Найбільш близькою до контролю за співвідношенням клітинних типів була культура, заморожена в присутності 10% ДМСО.

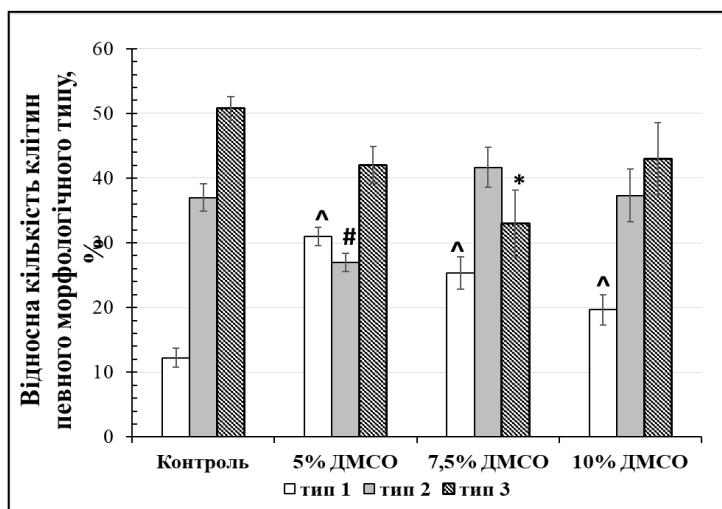
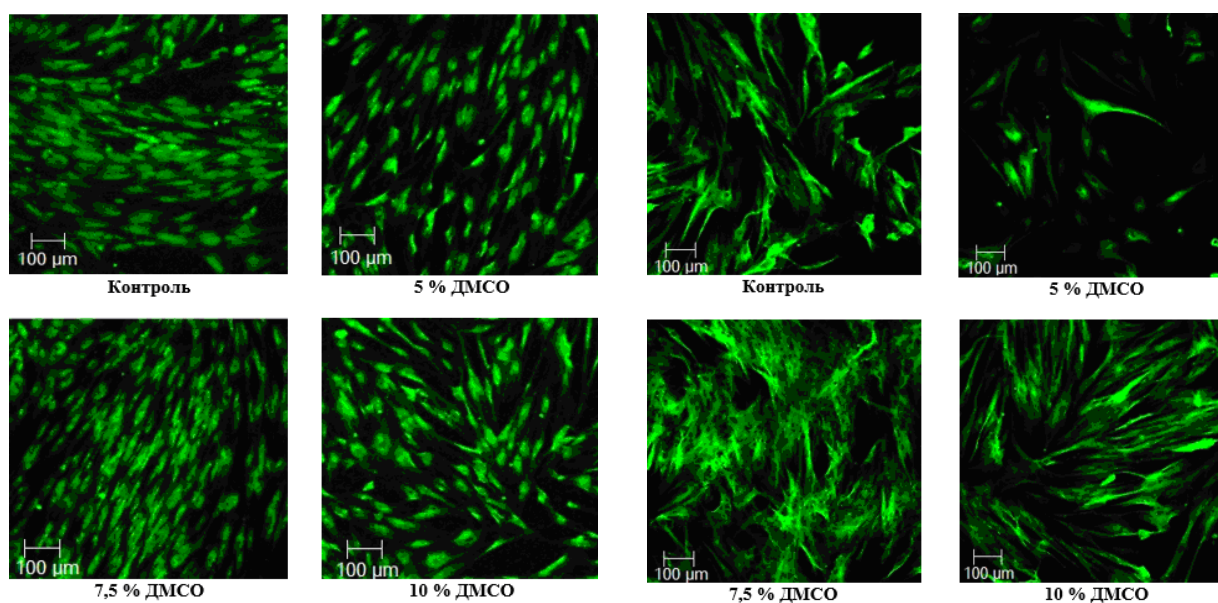


Рис. 12. Співвідношення клітин різних морфологічних типів на третю добу субкультивування ККСГ, кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО

Примітка: [^], [#], ^{*} – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) відрізняються від контролю для клітин відповідного морфологічного типу.

Культура клітин зі СГ після кріоконсервування в присутності всіх концентрацій ДМСО, що досліджувалися, продовжувала експресувати ГС і β -III-тубулін (рис. 13).



А

Б

Рис. 13. Експресія β -III-тубуліну (А) і ГС (Б) у контрольній та кріоконсервованій ККСГ при концентрації 5 %, 7,5 % і 10% ДМСО на 14-ту добу субкультивування. Фіксовані препарати, флуоресцентна мікроскопія

Відносна кількість МГ, визначена за кількістю ГС-позитивних клітин, у кріоконсервованих зразках відрізнялася залежно від концентрації ДМСО в КЗС (рис. 14). Найбільша кількість МГ спостерігалася в ККСГ, кріоконсервованій у присутності 7,5% ДМСО ($(94,5 \pm 5,1)\%$ від контролю). У зразках, кріоконсервованих у присутності 5 і 10% ДМСО, цей показник становив $(67,3 \pm 7,6)\%$ і $(75,4 \pm 6,9)\%$ від контролю відповідно. Таким чином, КЗС на основі 7,5% ДМСО є найкращим для кріоконсервування МГ в обраному режимі.

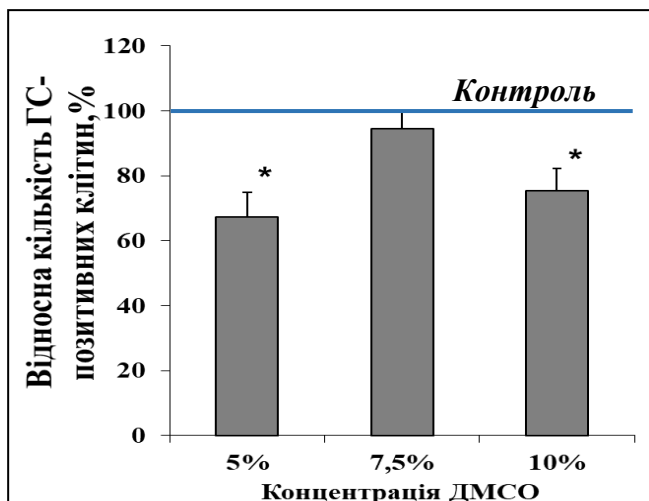


Рис. 14. Відносна кількість ГС-позитивних клітин на 14-ту добу субкультивування ККСГ, кріоконсервованих у КЗС із різними концентраціями ДМСО

Примітка: Контроль – кількість ГС-позитивних клітин у контролі брали за 100%. * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) у порівнянні з контролем.

Вплив кріоконсервування на морфофункціональні та імунофенотипові властивості ККСГ, отриманої в 3D-умовах культивування. Після кріоконсервування МС зберігали здатність до адгезії. Статистично значущої різниці між контрольними та експериментальними зразками не виявлено, проте спостерігалася тенденція до зниження адгезивної здатності МС, які піддавалися кріоконсервуванню в присутності 10% ДМСО. На другу добу після поміщення деконсервованих МС в умови культивування спостерігалася міграція з них клітин. У той час, як відносна здатність клітин інтактних МС (контроль) до міграції становила $(90 \pm 9)\%$, у розморожених зразках відбувалося зниження цього показника. Для всіх концентрацій ДМСО, що досліджувалися, він знаходився у межах 65–68% (рис. 15).

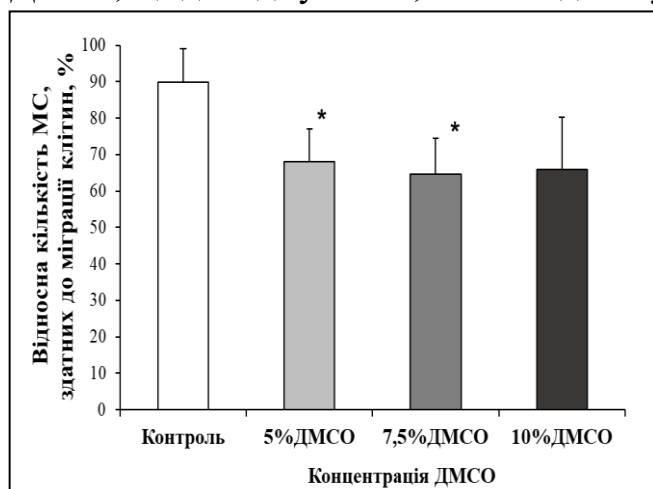


Рис. 15. Відносна здатність клітин МС мігрувати до та після кріоконсервування у КЗС із різними концентраціями ДМСО на другу добу субкультивування

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) відрізняються від контролю.

У культурах клітин, отриманих із кріоконсервованих МС, швидкість формування моношару знижувалася. На 10-ту добу відносна площа моношару складала: $(26,3 \pm 6,1)\%$ для МС, заморожених із 5% ДМСО; $(10,7 \pm 3,5)\%$ для МС, заморожених із 7,5% ДМСО; $(17,8 \pm 4,9)\%$ для МС, заморожених із 10% ДМСО (рис. 16). В інтактних зразках на цьому терміні спостереження моношар становив 85–90%. Даний показник збільшувався на 25-ту добу та складав $(51,7 \pm 7,8)\%$; $(20,1 \pm 6,9)\%$ та $(38,5 \pm 9,5)\%$ для зразків, консервованих під захистом 5, 7,5 та 10% ДМСО відповідно.

Після кріоконсервування зберігалися усі морфологічні типи клітин, які спостерігалися у 3D-ККСГ під час пересіву. Однак, використання різних концентрацій ДМСО впливало на співвідношення типів клітин. Найбільш близьке співвідношення клітинних типів до нативної культури зберігалося у зразках, кріоконсервованих з 10% ДМСО (рис. 17). При цьому

спостерігалось значуще зменшення кількості клітин типу 3 до 3–5%, а також збільшення кількості клітин типу 2 до 80–85% і типу 1 до 12–15%. У клітинах після пересіву МС, кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО, спостерігалася експресія ГС та β -III-тубуліну (рис. 18).

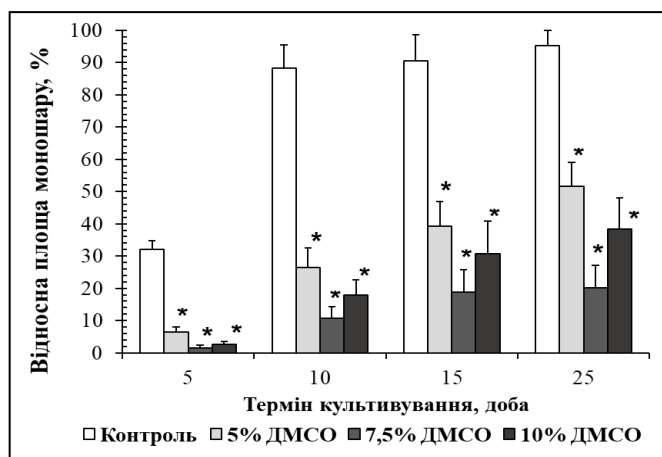


Рис. 16. Відносна площа моношару, отриманого з контрольної і кріоконсервованих МС на різних термінах культивування

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем.

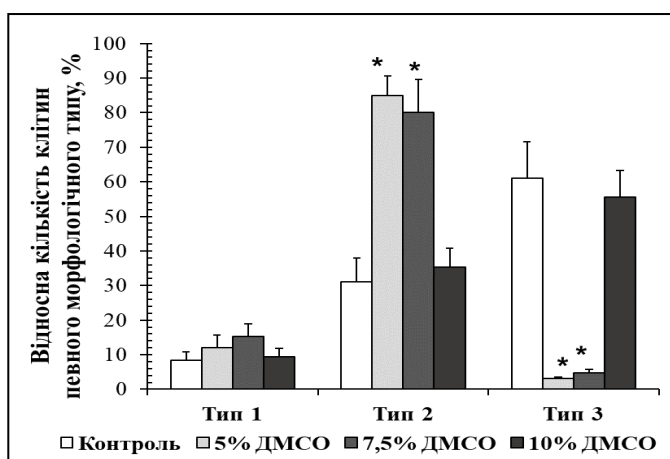


Рис. 17. Відносна кількість клітин різних морфологічних типів після пересіву МС, отриманих із контрольної та кріоконсервованих ККСГ на 10-ту добу субкультивування

Примітка: * – відмінності значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з кількістю клітин відповідного типу в контролі.

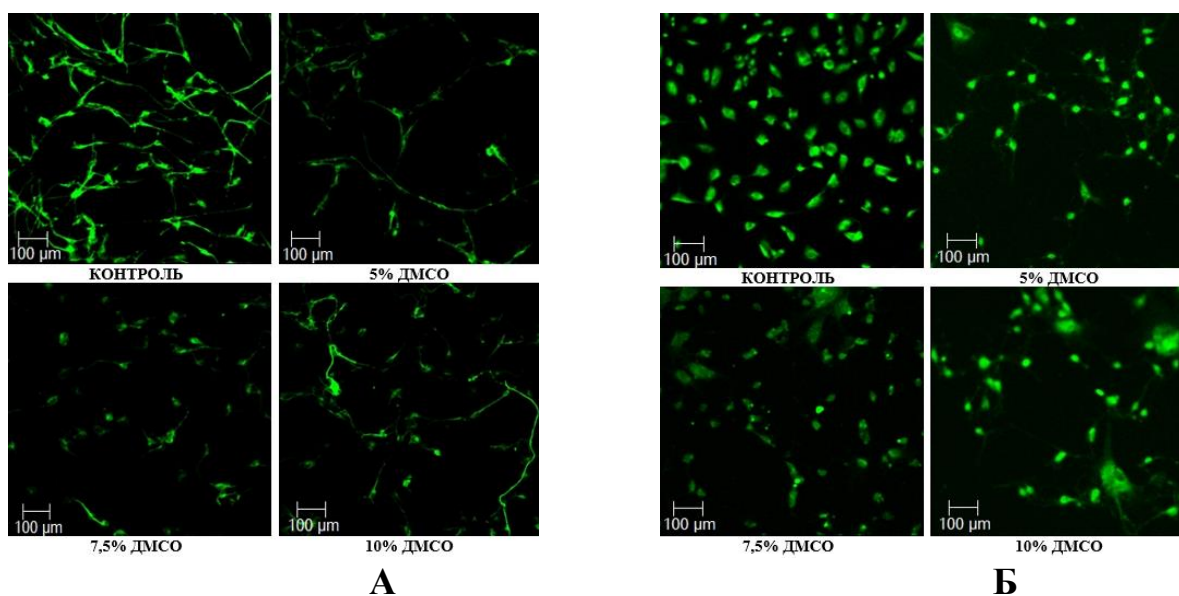


Рис. 18. Експресія β -III-тубуліну (А) і ГС (Б) клітинами моношару, який утворився після пересіву МС, у контрольній і кріоконсервованих ККСГ на 14-у добу субкультивування

Вплив кріоконсервування на збереженість ККСГ різних пасажів. Встановлено, що кріоконсервування первинної ККСГ (нульовий пасаж) зменшувало збереженість клітин у порівнянні з контролем із 92 до 83% у присутності 5 та 10% ДМСО ($p \leq 0,05$) і до 87,7% у присутності 7,5% ДМСО ($p \leq 0,05$) (рис. 19). Клітини першого пасажу виявилися більш стійкими до кріоконсервування. Під час їх заморожування в присутності 5% ДМСО показник збереженості клітин знижувався до 84,9% ($p \leq 0,05$), а в присутності 7,5 і 10% ДМСО – значуще не відрізнявся від контролю й становив $(90,6 \pm 4,6)\%$ і $(87,7 \pm 3,9)\%$ відповідно.

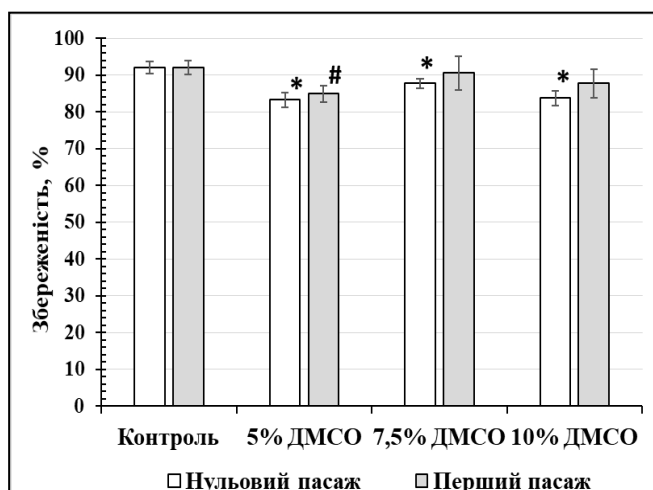


Рис. 19. Збереженість ККСГ різних пасажів після кріоконсервування. Контроль – контрольна ККСГ відповідного пасажу
Примітка: відмінності значущі порівнянно з контролем нульового пасажу (*) та першого (#) пасажу; ($p \leq 0,05$).

ВИСНОВКИ

Дисертація містить теоретичне обґрунтування й експериментальне вирішення завдання отримання ККСГ НП у вигляді моношару (2D-культивування) та МС (3D-культивування), а також її довгострокового зберігання шляхом кріоконсервування клітинної суспензії та МС.

1. Присутність у КС ФТС визначає основні властивості культури клітин, отриманої зі СГ НП. У КС з 10% ФТС утворюється моношарова культура, у той самий час як у присутності заміників сироватки В27 або Нейромаксу – МС. При цьому клітинний склад моношару, який формується у процесі культивування з ФТС або після пересіву МС, є подібним і містить три основних морфологічних типи клітин: полігональні клітини з вираженими сплюсненими відростками (тип 1); веретеноподібні клітини з двома тонкими відростками (тип 2); великі розпластані фібробластоїдні клітини (тип 3).

2. Визначено умови, які впливають на сфероїдоутворення в ККСГ НП. Для отримання МС можливо використовувати живильні домішки В27 і Нейромакс, при цьому остання забезпечує більш ефективне сфероїдоутворення. Час перебування в умовах культивування є критичним для збереження морфофункціональних властивостей МС: після 20 діб культивування спостерігається руйнування МС і зниження їхньої здатності до адгезії, а також зниження здатності клітин у їхньому складі до міграції та формування моношару.

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

4. Кріоконсервування ККСГ НП у вигляді клітинної суспензії у КЗС, які містять ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, за трьохетапним режимом охолодження дозволяє

зберегти життєздатність клітин на рівні 83–87%, вихід клітин на рівні 63–78% від контролю, а також характерні морфологічні типи клітин і експресію імунофенотипових маркерів ГС і β -III-тубуліну. При цьому після розморожування та субкультивування спостерігаються уповільнення формування моношару (15–55%) і зміна співвідношення морфологічних типів клітин у бік збільшення кількості клітин типу 1.

5. Кріоконсервування ККСГ НП у вигляді МС у КЗС, які містять ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, за трьохетапним режимом охолодження дозволяє зберегти здатність МС до адгезії, всі морфологічні типи клітин і експресію ГС та β -III-тубуліну, знижує на 22–25% здатність клітин МС до міграції та уповільнює на 50–65% швидкість формування моношару порівняно з контролем. Крім цього, після розморожування та субкультивування змінюється співвідношення морфологічних типів клітин у бік збільшення клітин типу 2.

6. Клітини першого пасажу є більш стійкими до кріоконсервування, ніж первинна ККСГ НП. Кріоконсервування культури клітин на першому пасажі в КЗС з 7,5% ДМСО за трьохетапним режимом охолодження забезпечує збереження клітин на рівні 90,6% від контролю.

7. Культура клітин зі СГ НП, отримана під час культивування у присутності 10% ФТС, містить близько 80% МГ. Кріоконсервування культури клітин у вигляді суспензії в КЗС з 7,5% ДМСО з використанням трьохетапного режиму охолодження дозволяє зберегти відносну кількість МГ на рівні 94,5% від контролю.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових журналах України

1. Али С.Г., Сидоренко О.С., Божок Г.А. Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят / Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, Серія «Біологія». 2018. № 30. С. 49–59. (Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання первинної культури клітин зі СГ неонатальних свиней, аналіз мікрофотографій, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).
2. Али С.Г., Божок Г.А. Крiоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из первичной культуры клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят / Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019. Т. 29, № 4. С. 354–364. (Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання, субкультивування та кріоконсервування МС зі СГ неонатальних свиней, аналіз мікрофотографій, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).
3. Али С.Г., Коваленко И.Ф., Божок Г.А. Некоторые фенотипические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят / Вісник проблем біології і медицини. 2019. Т. 3, № 152. С. 46–50. (Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання, субкультивування та імунофенотипування культури клітин зі СГ неонатальних свиней, аналіз мікрофотографій, отриманих за допомогою конфокального мікроскопа, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).
4. Алі С.Г., Моїсєєва Н.М., Божок Г.А. Кріоконсервування культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят / Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020. Т.

30, № 2. С. 158–168. (*Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання, субкультивування, кріоконсервування та імунофенотипування культури клітин зі СГ неонатальних свиней, аналіз мікрофотографій, отриманих за допомогою конфокального мікроскопа, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку*).

Статті у фахових періодичних виданнях інших країн

5. **Ali S., Bozhok G.** Effect of Cryopreservation on Different Passages of Porcine Dorsal Root Ganglion Cell Culture / Recent Advances in Biology and Medicine. 2019. P. 5. (*Внесок здобувача: проведення експериментів з отримання, субкультивування та кріоконсервування МС зі СГ неонатальних свиней, аналіз мікрофотографій, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка матеріалів до друку*).

Тези наукових доповідей конференцій

6. **Али С.Г., Лаврик А.А., Божок Г.А.** Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов. *Холод в біології та медицині*: мат. міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, Україна, 23–24.05.2016, С. 29.
7. **Али С.Г.** Влияние условий культивирования на некоторые морфофункциональные характеристики первичных культур клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. *Научные исследования и разработки 2018 года*: мат. міжнар. наук.-практ. конф., м. Москва, Росія, 15–31.10.2018, С. 303–307.
8. **Али С.Г., Божок Г.А.** Экспрессия нейрональных маркеров в культуре клеток, полученной из нативных и криоконсервированных мультиклеточных сфероидов из спинальных ганглиев неонатальных поросят. *Холод в біології та медицині*: мат. міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, Україна, 27–29.05.2019, С. 27.
9. **Алі С.Г.** Вплив кріоконсервування на здатність до адгезії мультиклітинних сфероїдів, отриманих зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. *Молодь і поступ в біології*: мат. міжнар. наук. конф. м. Львів, Україна, 9–11.04.2019, С. 86.
10. **Алі С.Г., Божок Г.А.** Експресія нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней. *The 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation*, Yaremche, Ukraine, 18–21.2019, P. 163.
11. **Али С.Г., Божок Г.А.** Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на клеточный состав и жизнеспособность культуры клеток, полученной из спинальных ганглиев неонатальных поросят. *4-й Национальный конгресс по регенеративной медицине*: мат. міжнар. наук.-практ. конф., м. Москва, Росія, 20–23.11.2019 Гены и Клетки. Приложение. 2019 (14). С. 21.

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертаційна робота присвячена отриманню культури клітин зі спінальних гангліїв (ККСГ) неонатальних поросят у вигляді моношару або мультиклітинних сфероїдів (МС),

вивченню її основних структурно-функціональних характеристик під час культивування у 2D- та 3D-умовах та встановленню оптимального режиму її кріоконсервування.

У роботі показано, що додавання сироватки до середовища культивування є визначальною умовою для отримання ККСГ у вигляді моношару або МС.

Незалежно від способу отримання культури (у вигляді моношару або МС), вона складалася з трьох типів клітин, які експресували маркер мантийних гліоцитів глутамінсинтетазу, маркер нейробластів β -III-тубулін, але не експресували маркер шваннівських клітин S100.

Кріоконсервування ККСГ неонатальних поросят як у вигляді суспензії поодиноких клітин, так і в складі МС у середовищах, які містили ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, із застосуванням трьохетапного режиму охолодження дозволяло зберегти її основні морфологічні, імунофенотипові та функціональні властивості.

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

АННОТАЦИЯ

Али С. Г. Культивирование и кріоконсервирование клеток и мультиклеточных сфероидов спинальных ганглиев неонатальных поросят. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

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

Диссертационная работа посвящена получению культуры клеток спинальных ганглиев (ККСГ) неонатальных поросят в виде монослоя или мультиклеточных сфероидов (МС), изучению ее основных структурно-функциональных характеристик при культивировании в 2D- и 3D-условиях и определению оптимального режима ее кріоконсервирования.

В представленной работе впервые была получена ККСГ неонатальных поросят. Установлено, что добавление сыворотки к среде культивирования является определяющим условием для получения ККСГ в виде монослоя или МС. При этом культивирование клеток в среде с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) приводит к формированию клеточного монослоя, а в среде с заменителями сыворотки В27 или Нейромакс – к образованию МС.

Морфологически первичная ККСГ при культивировании в 2D-условиях (монослой) состояла из полигональных клеток с выраженными уплощенными отростками (тип 1), веретенообразных клеток с двумя тонкими отростками (тип 2), больших фибробластоидных клеток (тип 3) и тел чувствительных нейронов (ЧН). Перенос сформированных на 8–10 сутки МС в среду с 10% ФТС приводил к формированию монослоя из тех же типов клеток, которые наблюдались при 2D-культивировании (клетки типов 1–3). Однако при сравнении культур 2D- и 3D-форматов наблюдались различия в количестве клеток разных морфологических типов: после пересева МС клетки типа 3 доминировали (около 60%), клетки типа 1 составляли около 8%, типа 2 – 31 %. Длительное поддержание МС в культуре (более 20 суток) приводило к потере их функциональных свойств и деградации. Перенос таких МС в среду с 10% ФТС не вызывало активную миграцию клеток и формирование монослоя.

Независимо от способа получения культуры (в виде монослоя или МС), клетки культуры экспрессировали маркер мантийных глиоцитов (МГ) глутаминсинтетазу (ГС), маркер нейробластов β -III-тубулин, но не экспрессировали маркер шванновских клеток S100. При этом, экспрессия ГС наблюдалась в клетках типа 2. Полученные результаты в комплексе с морфологическими характеристиками позволяют отнести данный тип клеток к МГ.

Установлено, что ККСГ, которая была криоконсервирована в виде суспензии, имеет достаточно высокую устойчивость к повреждающим факторам криоконсервирования. При использовании криозащитной среды на основе ДМСО и трехэтапного режима охлаждения (этап I – со скоростью 0,5°C/мин до -20°C; этап II – со скоростью 1°C/мин до -80°C; этап III – погружение в жидкий азот) сохранность клеток находилась в пределах 83–87%, а выход клеток 63–78%. Вариации показателей сохранности и выхода клеток зависели от концентрации ДМСО (5, 7,5 и 10%). После криоконсервирования сохранялась экспрессия клетками иммунофенотипических маркеров ГС и β -III-тубулина, однако наблюдалось замедление скорости формирования монослоя.

Сохранность МГ, определенных иммуноцитохимически, после криоконсервирования зависела от использованной концентрации ДМСО. В образцах, криоконсервированных с 7,5% ДМСО, количество МГ составляло 94,5% и значимо не отличалось от контроля. В то время как после использования 5 и 10% ДМСО данный показатель снижался на 33 и 25% соответственно по сравнению с интактным контролем.

Клетки 1-го пассажа ККСГ оказались более устойчивыми к криоконсервированию по сравнению с первичной культурой. Лучший результат (90,6% жизнеспособных клеток после отогрева) был достигнут при криоконсервировании клеток 1-го пассажа в среде на основе 7,5% ДМСО.

Криоконсервирование ККСГ в виде МС в среде, содержащей ДМСО в концентрациях 5, 7,5 и 10%, при использовании трехэтапного режима охлаждения позволяло сохранить основные морфологические, иммунофенотипические и функциональные свойства МС.

Таким образом, режим криоконсервирования, который включает использование среды с ДМСО и трехэтапный режим охлаждения, является приемлемым для криоконсервирования ККСГ как в виде суспензии клеток, так и МС. Данный режим обеспечивает достаточно высокий уровень сохранности клеток, наличие их иммунофенотипических и функциональных свойств. Вариации концентрации ДМСО в составе защитной среды имеют криоселективное влияние и приводят к сохранению определенного морфологического типа клеток в ККСГ неонатальных поросят. Установленный режим может быть рекомендован для низкотемпературного хранения ККСГ с целью дальнейшего культивирования как в 2D- так и 3D-формате.

Ключевые слова: спинальные ганглии, культивирование, криоконсервирование, мультиклеточные сфероиды, неонатальные поросята, диметилсульфоксид, мантийные глиоциты.

ANNOTATION

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

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

It was established that the addition of serum to the culture medium was a decisive condition for the production of cell culture of dorsal root ganglia (CCDRG) in the form of monolayer or multicellular spheroids (MS). Regardless of the method of obtaining (as a monolayer or MS), the culture consisted of 3 cell types that expressed a marker of satellite glial cells (SGC) glutamine synthetase (GS), a neuroblast marker β -III-tubulin, but did not express a marker of Schwann cells S100.

Cryopreservation of CCDRG of neonatal piglets both as a suspension of single cells and as a part of MS in media containing dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations of 5, 7.5, and 10%, using a three-stages cooling regimen, made it possible to preserve the main morphological, immunophenotypic and functional properties of the culture.

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

СГ – спінальні ганглії; ККСГ – культура клітин спінальних гангліїв; НП – неонатальні поросята; МГ – мантийні гліюцити; ГС – глутамінсинтетаза; МС – мультиклітинні сфероїди; ПС – поживне середовище; КС – культуральне середовище; ДМСО – диметилсульфоксид; КЗС – кріозахисне середовище; ФТС – фетальна теляча сироватка; ПФА – параформальдегід; В27 – домішка до живильного середовища для культивування; ЧН – чутливі нейрони, ПНС – периферична нервова система.

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

Підписано до друку 02.03.2021 р.

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

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

Наклад 100 прим. Зам.№