

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет біології, географії та екології

Кафедра біології людини та імунології

Вивчення параметрів нервової тканини *in vitro*

Кваліфікаційна робота (проект)

на здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

Виконала: студентка 4 курсу 412 групи

Спеціальності 014.05 Середня освіта

Освітньо-професійної програми

Середня освіта (Біологія та здоров'я
людини)

Остапенко Єліз Фахріївна

Керівник: к.б.н., доц. Шкуропат А.В.

Рецензентка: Петріна Т.І., вчитель

біології Херсонської гімназії №16

Херсон – Івано-Франківськ - 2023

Зміст

Вступ	3
Розділ 1 Огляд літературних джерел	5
1.1	51.1.1 Субстрат.
	5
1.1.2 Середовище для культивування.	7
Розділ 2	10
Методика вивчення нервової тканини <i>in vitro</i>	10
2.1 Культура нейронів.	10
2.2 Дослідження нейротоксичності нейронів.	18
Результати	25
Результати 1-го дослідження.	25
Результати 2-го дослідження.	26
ВИСНОВКИ	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	29
Додаток А	34
Додаток Б	35
Додаток В	36
Додаток Г	37
Додаток Д	38

Вступ

Актуальність теми. Культура тваринних клітин зараз є одним із основних інструментів, що використовуються в науках про життя в областях досліджень, які мають потенціал для економічної цінності та комерціалізації. Розробка основних культуральних середовищ дозволила вченим працювати з великою різноманітністю клітин у контрольованих умовах; це зіграло важливу роль у просуванні нашого розуміння росту та диференціації клітин, ідентифікації факторів росту, і розуміння механізмів, що лежать в основі нормальних функцій різних типів клітин. Нові технології також були застосовані для дослідження біореактора з високою щільністю клітин та умов культивування.

Здатність виробляти *in vitro* культури нейронних клітин була фундаментальною для просування нашого розуміння функціонування нервової системи. Культивування нейронних клітин є особливо складним, оскільки зрілі нейрони не зазнають клітинного поділу. Один із способів подолати це - створити вторинні клітинні лінії, які походять від нейронних пухлин і стали безсмертними. Вони мають перевагу в тому, що їх можна досить легко вирощувати в культурі клітин, щоб отримати необмежену кількість клітин, а також мінімізувати мінливість між культурами. Недоліком цих клітинних ліній є те, що вони демонструватимуть багато важливих фізіологічних відмінностей від типу клітин, з яких вони були отримані.

Культури тваринних клітин знайшли застосування в різних областях, від базових до передових досліджень. Він надав модельну систему для різноманітних дослідницьких можливостей:

1. Вивчення базової клітинної біології, механізмів клітинного циклу, спеціалізованої функції клітини, взаємодії клітина-клітина та клітина-матрикс.
2. Тестування на токсичність для вивчення ефективності нових ліків.

3. Генна терапія для заміни нефункціональних генів функціональними клітинами, що несуть гени.
4. Характеристика ракових клітин, роль різних хімічних речовин, вірусів і радіації в ракових клітинах.
5. Виробництво вакцин, МАТ та фармацевтичних препаратів.
6. Виробництво вірусів для використання у виробництві вакцин (наприклад, проти вітряної віспи, поліомієліту, сказу, гепатиту В та кору).

Мета: дослідити параметри нервової тканини *in vitro*.

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати літературні джерела параметрів нервової тканини.
2. Визначити умови для нервової тканини *in vitro*.
3. Дослідити фактори росту нервової тканини *in vitro*.
4. Дослідити властивості нервової тканини *in vitro*.

Об'єкт дослідження: нервова тканина.

Предмет дослідження: культура нервової тканини.

Матеріали та методи дослідження: аналіз літературних джерел.

Розділ 1 Огляд літературних джерел

1.1 Умови культивування нервової тканини

1.1.1 Субстрат.

Колаген є поширеним субстратом, який використовують для культивування нервової тканини. Він є структурним біополімером, який становить 30% маси хребетних, будуючи їх конституційну основу [3].

У людини є 28 білків, відомих як колаген, і найпоширенішим є тип I, фібрилярний тип колагену, головного компонента сполучних тканин, які забезпечують структуру та підтримку всього тіла, включаючи кістки, шкіру, сухожилля, хрящі та нерви [3].

Колаген є добре відомим біоматеріалом у інженерії нервової тканини. Ранні застосування включають відновлення невеликої (5 мм) нервової щілини у приматів, крім людини, за допомогою нервового провідника на основі колагену, який виявився фізіологічно подібним до відновлення трансплантата [4].

Зовсім недавно колагенові канали були досліджені як можливий внутрішній наповнювач для нервових каналів, що підвищує якість регенерації периферичних нервів у більш довгих проміжках. Колагенові гідрогелі покращили регенерацію 15-міліметрової щілини в сідничному нерві щурів [23], а колагенові канали в поєднанні з NGF частково реконструювали 35-міліметровий дефект сідничного нерва на собачій моделі [19, 5].

Колаген VI є важливим компонентом екстрацелюлярної матриці, що оточує нейрони. Дослідження показують, що колаген VI може захищати нейрони від токсичності бета-амілоїду (A β), який є основною складовою бляшок, що утворюються в мозку при хворобі Альцгеймера.

Дослідження проводили на мишах, які мали генетично модифіковану форму Альцгеймера, а також на клітинах, що вивчалися в лабораторних умовах. Встановлено, що колаген VI зменшує токсичність А β і зберігає функціональність нейронів [14].

Колаген також використовується в комбінаціях з іншими біополімерами та білками. Наприклад, електрофізіологічна оцінка колагенової PGA трубки підтвердила її роль як багатообіцяючого біоматеріалу для нервових каналів для регенерації периферичних нервів у котів [54], тоді як лінійний упорядкований колагеновий каркас, зшитий ламініном, ключовим білком ЕСМ у нервовій системі, керований ріст аксонів і посилена регенерація нервів, а також функціональне відновлення у щурів [8].

Колаген широко вивчався як біоматеріал для інженерії нервової тканини, і в результаті на ринку комерційно доступні численні нервові провідники на основі колагену для регенерації периферичних нервів. В даний час колаген є єдиним біополімером, схваленим для клінічних випробувань в інженерії нервової тканини. Наприклад, NeuraGen - розсмоктуючий імплантат для відновлення пошкоджень периферичних нервів, виявився високоефективним у реконструкції периферичних нервів у 43% пацієнтів [55

Зрозуміло, що нервові канали на основі колагену є найбільш біосумісними нервовими каналами, доступними в даний час у клінічних умовах, і їх ефективність часто порівнюється з клінічним золотим стандартом, аутологічної трансплантацією нерва [20].

Цікавим застосуванням колагену є інтубуляція, отже, використання магнітно вирівняного колагенового гелю типу I, досягнутого шляхом впливу на формування колагенового гелю високої сили магнітного поля, як наповнювача для колагенових трубок. Цей метод був успішним при невеликих ураженнях периферичних нервів, значно покращуючи регенерацію нервів у 6-

міліметровому нервовому проміжку у мишей [7] і керуючи подовженням нейритів та інвазією клітин Шванна *in vitro* [8] та *in vivo* [9].

1.1.2 Середовище для культивування.

Сироваткові середовища є популярними для культивування нервової тканини, оскільки вони містять різноманітні складники, необхідні для підтримки життєдіяльності клітин. Деякі з найпоширеніших сироваткових середовищ, використовуваних для культивування нервової тканини, включають:

1. DMEM/F12 - це сироваткове середовище, що містить глюкозу, амінокислоти, вітаміни та мінерали. Це середовище часто використовують для культивування нейробластом.
2. Neurobasal - це сироваткове середовище, яке містить мінімальну кількість різних складників, що дозволяє вивчити вплив конкретних факторів на клітинну функцію. Це середовище часто використовують для культивування нейронів та гліальних клітин.
3. B27 - це доповнення до сироваткових середовищ, яке містить низку факторів росту, необхідних для підтримки нейронального життя. Це доповнення часто використовують для поліпшення розвитку нейронів та їх міжклітинних зв'язків.

Крім цього, такі додатки, як нейронна сироватка та фетальна теляча сироватка, також можуть використовуватись для культивування нервової тканини.

Однією з найпоширеніших культуральним середовищем для культивування нервової тканини є середовище B27 (B27 medium), яке містить різноманітний склад компонентів, спеціально розроблений для культивування різних видів нервової тканини. Серед основних компонентів середовища B27 можна відзначити:

1. Нейробазальну сировину (Neurobasal): це безсироваткова основа, яка містить необхідні амінокислоти та вітаміни для підтримки життєдіяльності клітин нервової тканини.
2. Глутамін: це амінокислота, яка є важливою для розвитку та функціонування нервової тканини.
3. Біксин (B27 supplement): це суміш факторів росту, включаючи BDNF, GDNF та CNTF, які підтримують розвиток та функціонування клітин нервової тканини.
4. Інші додаткові компоненти: включають інсулін, цукор, пеніцилін-стрептоміцин, серум альбумін людини, фосфати та інші мікроелементи..

Б27 забезпечує оптимальні умови для росту та диференціації клітин нервової тканини. Крім того, середовище Б27 має високу стабільність та надійність, що дозволяє його використовувати для довготривалої культивування клітин нервової тканини [24,20,30].

Безсироваткові та сироваткові середовища є двома типами культурних середовищ, які використовуються для культивування клітин та тканин. Ці середовища мають свої відмінності та спільні риси.

Спільні риси безсироваткових та сироваткових середовищ:

- Містять мінеральні солі, які підтримують життєдіяльність клітин.
- Містять різні додаткові складники, такі як глюкоза, амінокислоти, вітаміни та інші, які сприяють росту та диференціації клітин.
- Містять антибіотики, які запобігають забрудненню мікробами та забезпечують стійкість середовища.

Відмінності безсироваткових та сироваткових середовищ:

- Сироваткові середовища містять додатково сироватку, яка містить різні фактори зростання та гормони, що сприяють росту та диференціації клітин. Безсироваткові середовища не містять цієї складової.
- Безсироваткові середовища можуть містити інші додаткові складники, такі як цукрові алкоголі, яких не містять у складі сироваткових середовищ.
- Безсироваткові середовища зазвичай містять менше складників, ніж сироваткові середовища.

Розділ 2

Методика вивчення нервової тканини *in vitro*

2.1 Культура нейронів.

Під час розвитку миші, нейрогенні попередники - це клітини, які диференціюються в нейрони, можуть поступово виснажуватись в мозку, стаючи обмеженими в SEZ і субгранулярній зоні гіпокампа на постнатальних стадіях та в дорослому віці [21,22].

Ці попередники показують астрогліальні характеристики в ембріональному, постнатальному та дорослому головному мозку. З огляду на це, було поставлене питання, чи може астроглія зберегти свої властивості в ненеурогенній області, які подібні до попередників [22].

Нейронний потенціал нейронів та гліальних клітин забезпечує фактор транскрипції Pax6. Також бере участь у генерації нейронів з астрогліальних стовбурних клітин. Він експресується в радіальній глії кори головного мозку. Відомо, що через експресію Pax6 постнатальна астроглія може бути спрямована на нейрогенез [10,27].

Культикування астроглії - це процес, за допомогою якого клітини головного миші зберігаються в спеціальному середовищі, що дозволяє їм рости та диференціюватися. Для цього було використано середовище, яке містить глюкозу, кінську сироватку, фетальну телячу сироватку, пеніцилін, стрептоміцин, B27, епідермальний фактор росту та фактор росту фібробластів.

Ретровірусна трансдукція - це метод внесення генетичного матеріалу у клітини за допомогою ретровірусів. Для цього було використано псевдотипові ретровіруси, у складі яких є різноманітні плазміди з генами: Pax6, Ngn2 або Mash1, а також зеленим флюоросцентним білком. Це все дозволяє досліджувати процеси диференціації та функціонування у головному мозку.

Під час дослідження було проведено перевірку можливості перепрограмування ранньої постнатальної астроглії шляхом експресії генів Ngn2 і Mash1.

З кори головного мозку миші було взято астрогліальні клітини та процес культивування проводився в культуральному середовищі, яке описано вище.

Після 7 днів культивування клітини пасажували, а через деякий час трансдукували:

- VSV-G псевдотипованими ретровірусними векторами на основі Молоні; VSV-G є поверхневим глікопротеїном, який використовується для псевдотипування ретровірусних векторів, що дозволяє їм ефективно інфікувати різні клітинні типи [6].
- Вектори на основі Молоні містять геном ретровіруса Молоні, який був модифікований як вектор для генної інженерії, що можуть кодувати GFP (зелений флуоросцентний білок) та Ngn2 - є ключовим фактором регулювання розвитку нейронів, IRES, що є регуляторною послідовністю, яка дозволяє ретровірусним векторам транскрибувати двох або більше генів з одного генома, що дозволяє одночасно експресувати Ngn2 або Mash1 та GFP [13,9].

Після 12 днів трансдукції шляхом імунного фарбування було проведено аналіз на ранній нейрональний маркер TuJ1.

Він є моноклональним антитілом, що визначається у тестуванні імуногістохімічного фенотипування нейронів. Це антитіло визначає, так званий, епітоп білка III-го класу бета-тубуліну, який є компонентом цитоскелету нейронів. Завдяки тому його використовують для визначення ранніх етапах диференціації нейронів під час ембріонального розвитку, а також для виявлення та діагностики нейрональних клітин і пухлин відповідно [15].

Перенесення ретровірусного гена дає гарантії, що всі клітини, які включені в аналіз, були створені з клітин, що проліферують *in vitro*. Таким чином виключаючи зайві постмітотичні нейрони.

Після трансдукції ретровірусним вектором, що кодує лише GFP, невелика кількість клонів, які є гібридами однієї інфікованої клітини, містила TuJ1 - позитивні нейрони.

Загалом в ході експерименту, трансдукція призвела до 3-х незалежних клонів:

1. 71+- 16% —TuJ1-позитивних (нейрональні);
2. 16 +- 18% —TuJ1-позитивних та негативних (змішані);
3. 85% — TuJ1-негативних (ненейрональних клітин).

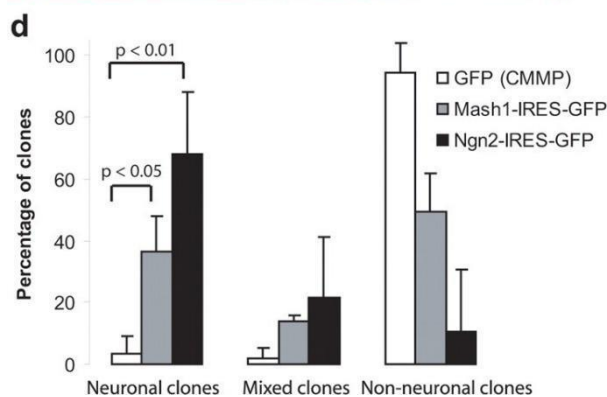
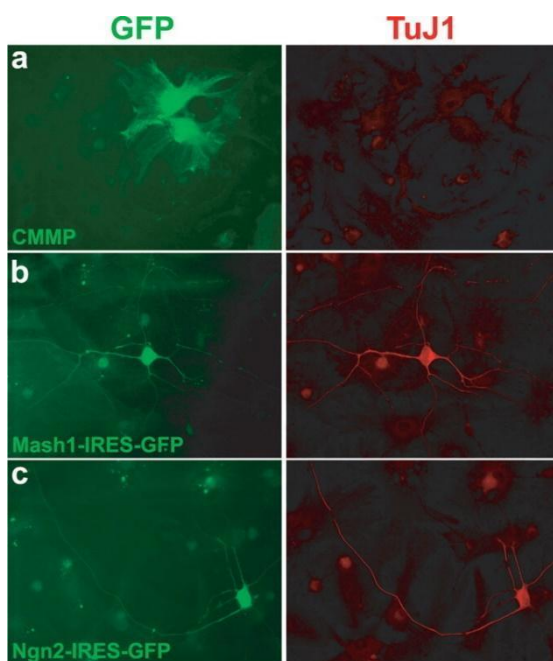


Рисунок 2.1 TuJ1-позитивних (нейрональних), TuJ1-позитивних, а також - негативних (змішаних) і лише TuJ1-негативних (ненейрональних) клітин.

Однією з найбільш важливою властивістю для нервової тканини є її електрична провідність. Нейрони здатні передавати інформацію у вигляді у вигляді електричних сигналів, відомі як дієпотенціали. Це здатність нейронів до повторюваного пуску дієпотенціалів (AP), що визначається рівнем їх електричною збуджуваності та здатності мембрани до повторного збудження [18].

Проте, така здатність залежить від факторів:

1. Стан мембрани.
2. Наявність іонів так активність різних іонних каналів. Для прикладу наведу надмірну активацію кальцієвих каналів, внаслідок чого може відбутися вихід кальцію з клітини, що може призвести до підвищення негативного потенціалу мембрани та зниження здатності клітини до наступного AP.
3. Концепція рефрактерності — період, коли клітина не здатна до збудження.

Рівень здатності AP визначається шляхом вимірювання електричної активності нейронів, а саме за допомогою методу патч-кламп запису.

Отже, з такою метою було проведено патч-кламп записи клітин, отриманих з астроглії трансдукованих за допомогою Ngn2–IRES–GFP, Mash1–IRES–GFP або Pax6–IRES–GFP, які, як було показано раніше, перепрограмують астрогліальні клітини в напрямку долі нейронів.

На малюнку 2.2 показано нейрони, які були отримані з астрогліальних клітин, культивованих протягом 2-х тижнів після інфікування. У всіх цих нейронів ін'єкція струму призвела до повторного розряду AP. Патерн розряду, отриманий з перепрограмованих нейрогенних попередників E14, був подібний до нейронів і включав залежний від напруги струм Na^+ , що корелював з їх

здатністю генерувати ділянки дійсного потенціалу дії (AP). Блокування Na^+ каналів ТТХ зупиняло генерацію AP (Рис 2.2). На відміну від перепрограмованих астрогліальних клітин, астроглія, що була трансдукована контрольним вірусом, що містив GFP (CMMP), мала лінійну струм-напругову залежність, що була типовою для зрілих астрогліальних клітин ($n = 14$).

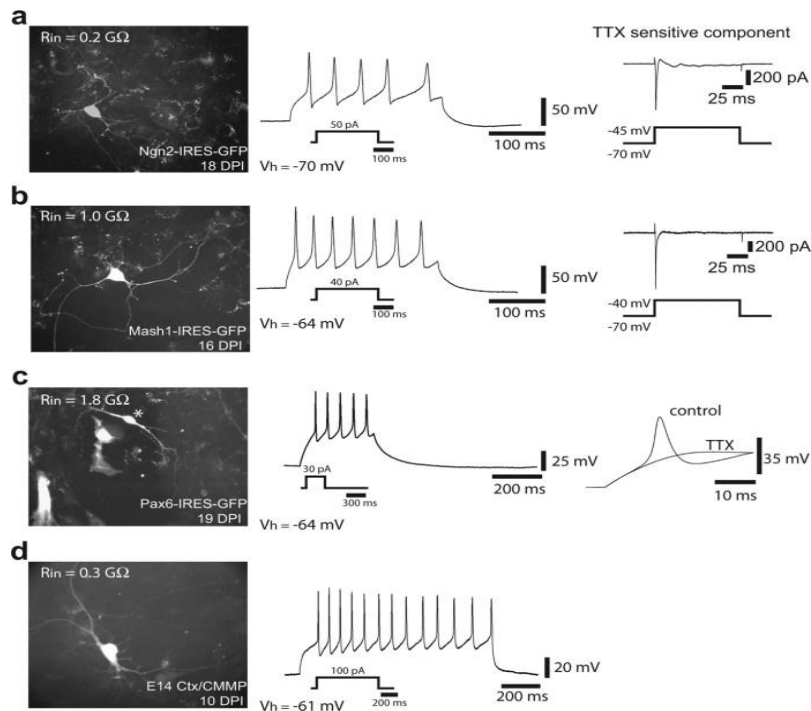


Рис. 2.2 Відповідь нейронів на ураження струмом.

Малюнок демонструє перехід від пасивних астрогліальних до активних електрофізіологічних властивостей перепрограмованих клітин. Після трансдукція за допомогою Ngn2 змінені клітини спочатку показують пасивні струм-напруги і не можуть викликати спайк або колосок.

Проте, через деякий час виявлено, що перепрограмовані клітини почали рости, з'явилися невеликі колоски, і це корелюється з наявністю ТТХ-чутливого струму Na^+ під час деполяризації.

Пізніше нейрони стали запускати окремі дієпотенціали у відповідь на поточну ін'єкцію, і співвідношення струм-напруга показують зменшення вхідного опору при деполяризованих потенціалах. На пізніших стадіях

розвитку, клітини запускати більше, ніж один потенціал, стаючи повторюваними.

Це супроводжується збільшенням чутливого ТТХ-струму Na^+ і зовнішнім направленням.

Активація потенціалу дії нейронів. а , Приклад клітини, що експресує Ngn2-IRES-GFP; a1 не викликала сплеск або колосок; a2 струм-напруга; b Приклад клітини, що експресує Ngn2-IRES-GFP X [29].

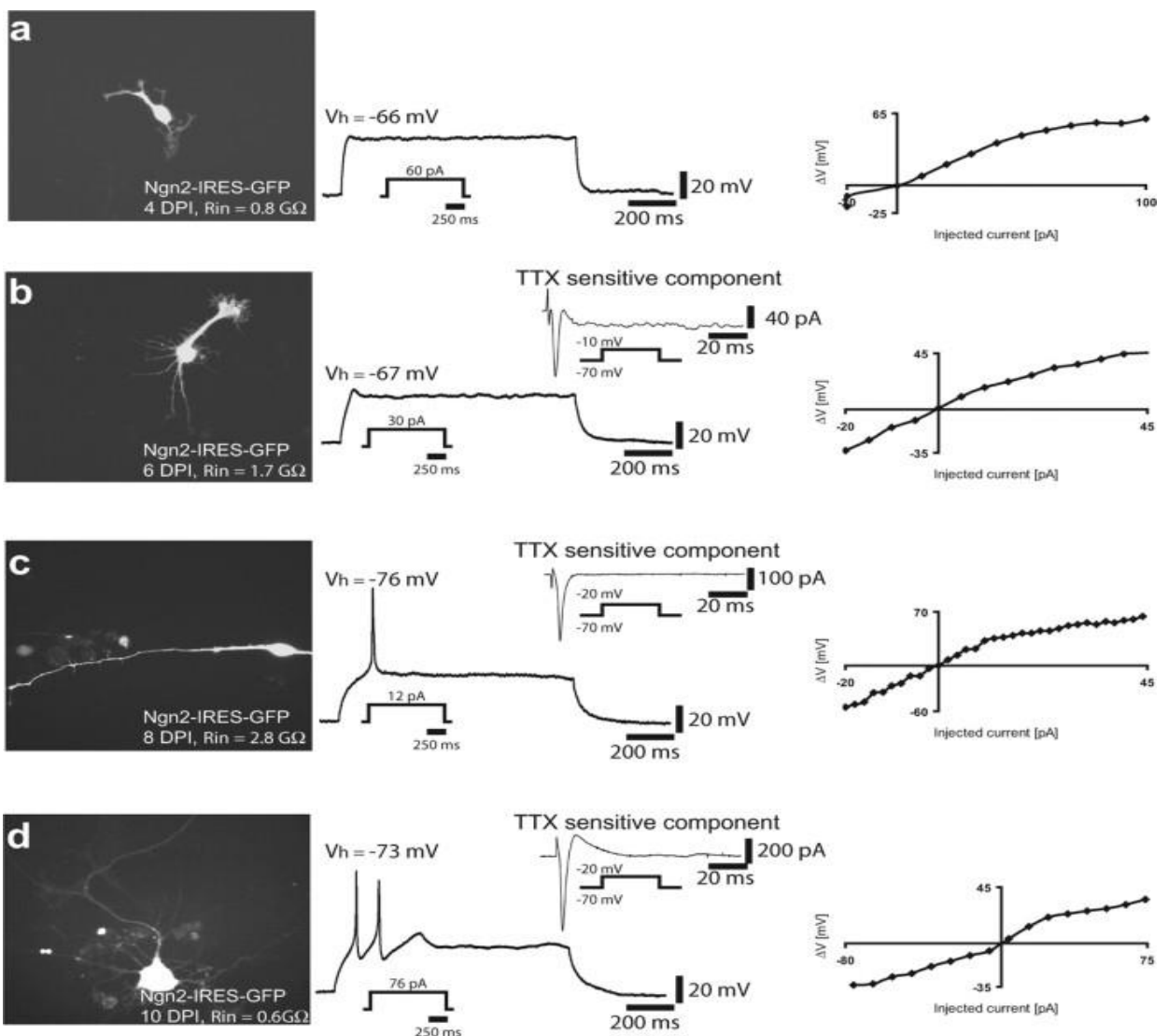


Рис. 2.2 Активація потенціалу дії в нейронах, отриманих з перепрограмованої Ngn2 астроглії.

На цій стадії нервові клітини продемонстрували спайкову адаптацію та акомодацію [25].

Нейрони, отримані з астроглії, розвиваються трохи повільніше, ніж ембріональні нейрони, але деякі з них досягають стадії дозрівання, подібної до нейронів кори.

Однак, темпи дозрівання дуже неоднорідні, і тому вхідний опір сильно варіюється серед окремих нейронів. Після 3 тижнів у культурі, нейрони, отримані з астроглії, мають порівнянний рівень дозрівання з ембріональними нейронами кори за всіма досліджуваними параметрами.

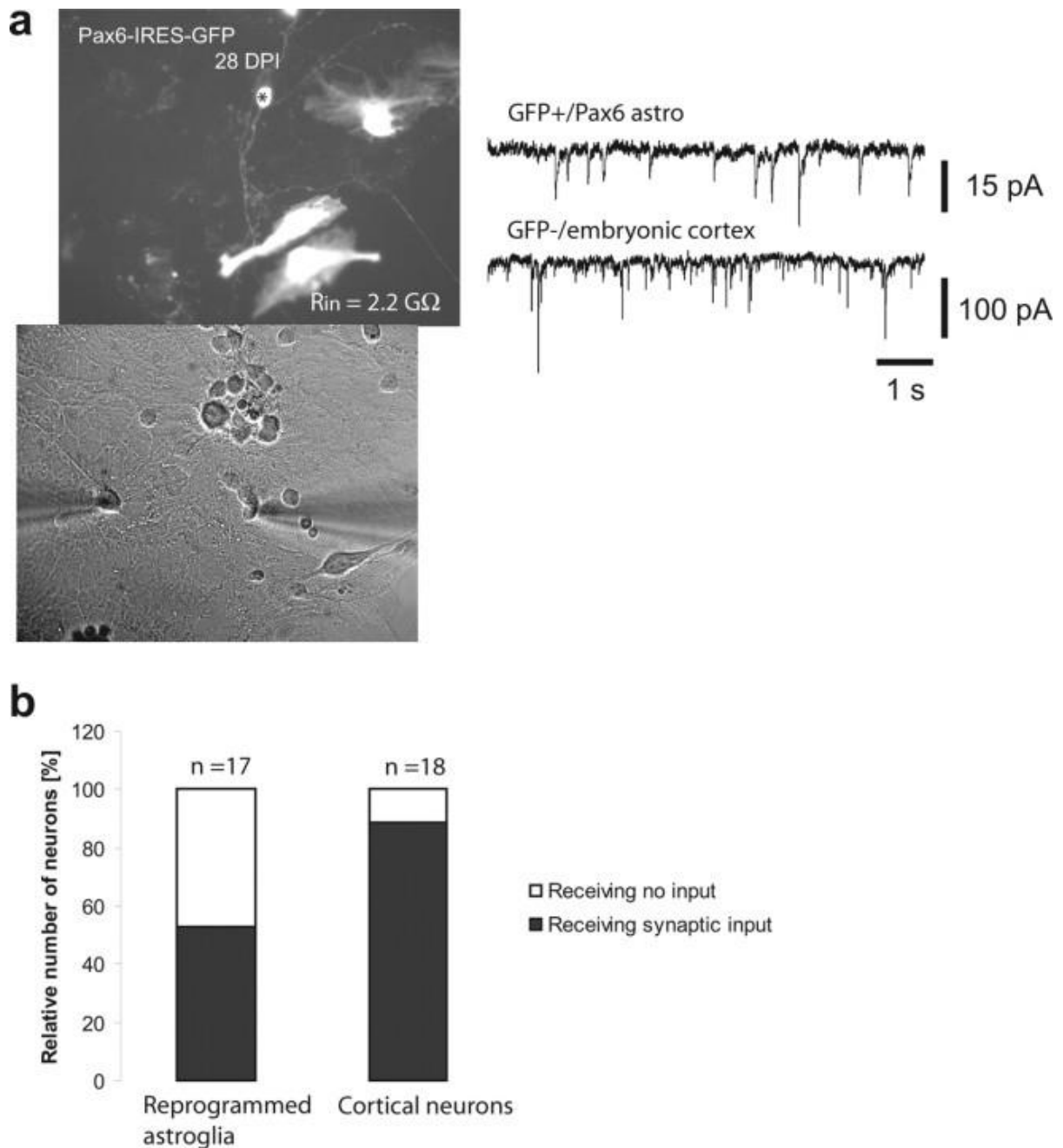


Рис. 2.3 Відсоток нейронів, отриманих від перепрограмованих астрогліальних попередників і кокультивованих нейронів кори, які отримують синаптичний вхід у культурі.

Нейрони з перепрограмованої астроглії - це нейрони, що були отримані з астроглії, гліальної клітини центральної нервової системи, за допомогою процесу перепрограмування. Особливістю цих нейронів є те, що вони здатні генерувати дієпримальні потенціали, сигнали, які передаються від одного нейрона до іншого через синаптичні зв'язки. Проте, нейрони, отримані з

перепрограмованої астроглії, не можуть генерувати функціональний пресинаптичний вихід протягом часового вікна культивування. Оскільки астроглія є не нейрональною клітиною, перепрограмування вимагає внесення змін в генетичну програму клітини, які дозволяють їй розвиватися як нейрон. Однак, перепрограмовані нейрони не досягають такої ж функціональної зрілості, як нейрони, що розвиваються з нейрональних попередників під час ембріонального розвитку [10].

2.2 Дослідження нейротоксичності нейронів.

Методи випробування *in vitro* можуть забезпечити швидкий підхід до скринінгу великої кількості хімічних речовин на предмет їх потенційної токсичності.

Для тестування на нейротоксичність розвитку клітинні культури *in vitro* можуть бути корисними як модельні системи для хімічного скринінгу. Хоча системи *in vitro* не можуть повністю відтворити складні взаємодії в мозку, що розвивається, культури нейронів можуть повторити багато ключових процесів нейророзвитку, таких як клітинна проліферація, диференціація, ріст і синаптогенез [12].

Клітинні аналізи *in vitro* для цих процесів розвитку нервової системи була запропонована як один із підходів до розробки високопродуктивних методів скринінгу хімічних речовин на їх потенційну нейротоксичність для розвитку.

Нейрогенез і нейрональна проліферація залежать від упорядкованого поділу нейронних клітин-попередників, які зрештою забезпечують повний набір клітин у нервовій системі [28].

Зміни в проліферації нейронів під час розвитку можуть виникати через генетичні причини та причини навколишнього середовища, а зміни в проліферації, викликані хімічними речовинами, як було показано, призводять до нейротоксичності та розладів розвитку [1,4].

Таким чином, проліферація клітин є потенційною мішенню для хімічних речовин, які можуть впливати на нервову систему, що розвивається, і повинна бути включена як компонент скринінгової “батареї” *in vitro* [2].

Було використано різні лінії клітин, включаючи PC12 Neuroscreen-1 (NS-1), N1E-115 та SH-SY5Y.

PC12, Neuroscreen-1 (NS-1), N1E-115 та SH-SY5Y - це клітинні лінії, які використовуються для дослідження нервової системи.

PC12 - це клітинна лінія, яка походить від феохромоцитом (нейроендокринний тумор) крилика наднирника щура. PC12 можуть диференціюватись в клітини симпатичної ганглії за допомогою додавання низьких концентрацій нервового фактора росту (NGF), що робить їх корисними для вивчення диференціації та розвитку нейронів..

Neuroscreen-1 (NS-1) - це іморталізована клітинна лінія, яка була отримана з культивованих нейральних клітин миші. NS-1 є диференційованими нейрональними клітинами та можуть використовуватись для дослідження механізмів нейрональної диференціації та розвитку.

N1E-115 - це іморталізована клітинна лінія, яка була отримана з мезенхімних нейроепітеліальних прекурсорів миші. N1E-115 володіють диференційованими властивостями та можуть диференціюватись в клітини, які виявляють морфологію та функції нейронів.

SH-SY5Y - це іморталізована клітинна лінія, яка була отримана з невробластоми людського ембріону. SH-SY5Y можуть диференціюватись в клітини, які виявляють морфологію та функції нейронів та є корисними для дослідження різних неврологічних захворювань, таких як хвороба Паркінсона та хвороба Альцгеймера.

Клітини культивували в умовах, які були оптимальними для проліферації конкретної використаної лінії клітин. Клітинна лінія PC12 є

класичною моделлю нейронних клітин завдяки своїй здатності набувати властивостей симпатичних нейронів під час роботи з фактором росту нервів (NGF).

PC12 демонструє мінімальне злипання і добре реагує на NGF [2].

Клітини культивували в середовищі RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), що містило:

1. 10% кінської сироватки (HyClone, Logan, UT);
2. 5% термоактивованої фетальної бичачої сироватки (HyClone);
3. 1% L-глутамату (BioWhittaker);
4. 1% пеніциліну/стрептоміцину.

Клітини N1E-115 були культивовані в середовищі DMEM що містить 10% фетальної бичачої сироватки.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - це базальне середовище для підтримки росту багатьох різних клітин ссавців. Клітини, успішно культивовані в DMEM, включають первинні фібробласти, нейрони, гліальні клітини, а також клітинні лінії, такі як HeLa.

Клітини SH-SY5Y культивували в DMEM/F12 (поживна суміш), 10% термоінактивованої фетальної бичачої сироватки (Gibco) і 1% пеніциліну/стрептоміцину (Bio Whittaker).

Генотип і фенотип клітинних ліній можуть змінюватися протягом багатьох пасажів [16].

Таким чином, клітини були перенесені в колби об'ємом 75 см² до досягнення конфлюентності близько 80%. Колби, використовувані для клітин NS1, були покриті колагеном I, тоді як для SH-SY5Y та N1E 115 колагеновий субстрат не використовувався.

Після досягнення необхідної конфлюентності клітини були пересіяні на 96-лункові планшети.

Клітини були підтримувались при 37 °C в інкубаторі. Ці умови дозволяють забезпечити оптимальні умови для росту та розвитку клітин.

Клітинна лінія PC12 була культивована в середовищі RPMI (глутамінове середовище), що містить:

- ✓ 10% кінської сироватки;
- ✓ 5% термоактивованої фетальної бичачої сироватки;
- ✓ 1% l-глутамату;
- ✓ 1% пеніциліну/стрептоміцину.

Клітини N1E-115 та SH-SY5Y були культивовані в DMEM з 10% фетальної бичачої сироватки та 1% пеніциліну/стрептоміцину. Клітини були розміщені в колбах об'ємом 75 см² та пересажені на 96-лункові планшети для досліджень проліферації або визначення життєздатності. Клітини були культивовані при 37°C у зволоженому інкубаторі.

Клітини PC12, N1E-115 та SH-SY5Y були пересіяні в 96-лункові планшети з початковою щільністю 2000 клітин/лунку (для PC12 та N1E-115) та 10 000 клітин/лунку (для SH-SY5Y).

Підрахунок клітин проводився кожні 24 години після посіву шляхом фарбування ядер за допомогою ДНК-зв'язування барвника Hoechst 33342.

Кількість ядер на поле визначали за допомогою програмного забезпечення Cellomics Target Activation Bioapplication, яке ідентифікує об'єкти (ядра) на основі розміру, форми та флуоресценції інтенсивності.

Об'єкти, які не відповідали заданим критеріям інтактних клітинних ядер, не враховувалися та виключалися з аналізу, щоб переконатися, що підраховано лише ядра з інтактних (живих) клітин. У кожній лунці достатня кількість полів були зображені, щоб підрахувати щонайменше 400 інтактних клітин.

Для оцінки чутливості клітинних ліній до змін у проліферації було використано набір із 16 комерційно доступних хімічних речовин, в якому 8 хімічних речовин було обрано на основі попередніх доказів, отриманих з опублікованої літератури статистично значущих впливів на проліферацію нейронів *in vitro* в будь-якій моделі. Другий набір із 8 хімічних речовин було обрано через відсутність доказів впливу на проліферацію в опублікованій літературі.

Хімічні речовини були розчинені у 100% DMSO. Базові розчини готували в діапазоні концентрацій від 1 М до 100 мМ, за винятком афідіколіну (найвища концентрація 10 мМ), гліфосату (найвища концентрація 30 мМ), охратоксин-А (найвища концентрація 10 мМ) і транс-ретиноєва кислота (найвища концентрація 30 мМ). Всі хімічні речовини зберігалися в температурі, рекомендованій виробником. В день використання хімія була доведена до кімнатної температури, розводили 1/1000 у відповідних культуральних середовищах, і додавали до клітин через 2 години після посіву. Кінцева концентрація ДМСО в культурі медіа була 0 Мал.

Name	CAS	Vehicle	Source	Neuronal Proliferation <i>in vitro</i> ^a
Aphidicolin	38966-21-1	DMSO	EMD	Breier et al. (2008)
Cadmium chloride	7790-78-5	DMSO	Aldrich	Gulisano et al. (2009)
Cytosine Arabinoside	147-94-4	DMSO	Sigma	Hashimoto et al. (2003)
Dexamethasone	50-02-2	DMSO	Sigma	Kim et al. (2004)
5-Fluorouracil	51-21-8	DMSO	Sigma	Bogdahn et al. (1987)
Methylmercury chloride	115-09-3	DMSO	Aldrich	Burke et al. (2006)
Ochratoxin-A	303-47-9	DMSO	Sigma	Sava et al. (2007)
<i>trans</i> -Retinoic acid	302-79-4	DMSO	Sigma	Blanco et al. (2001)
Acetaminophen	103-90-2	DMSO	Sigma	Holownia et al. (1997) ^b
Amoxicillin	26787-78-0	DMSO	Sigma	NR ^c
Dimethyl phthalate	131-11-3	DMSO	Aldrich	NR ^c
Diphenhydramine HCl	147-24-0	DMSO	Sigma	NR ^c
Glyphosate	1071-83-6	H ₂ O	Chem Service	NR ^c
Omeprazole	73590-58-6	DMSO	Sigma	NR ^c
Saccharin sodium salt	82385-42-0	DMSO	Sigma	NR ^c
d-Sorbitol	50-70-4	H ₂ O	Sigma	NR ^c

Рис. 2.4 Досліджувані сполуки, що використовуються для оцінки проліферації клітинних ліній нейронів.

У даному дослідженні оцінювали проліферацію клітин, використовуючи набір Cellomics BrdU Cell Proliferation kit. Це набір реагентів, що використовуються в біологічних дослідженнях для виявлення процесів клітинної проліферації, тобто поділу клітин.

Клітини були засіяні на прозорих пластинках у 96-луночкових чистих пластинах та піддалися обробці з хімічними речовинами на протязі 20 годин, після чого BrdU був доданий безпосередньо до кожної ямки на протязі наступних 4 годин інкубації. Потім клітини були фіксовані. Клітини, що ділилися та демонстрували BrdU, маркувалися за допомогою первинного антитіла миші проти BrdU, а після цього - другорядним антитілом кози проти мишиного IgG з DyLight 549 (флуоресцентний барвник), та ядра були позначені фарбником DAPI. Кількісна флуоресцентна зйомка проводилась за допомогою системи автоматичного зображення з 10× об'єктивом, а зображення аналізувалися за допомогою біопроеграми Cellomics Target Activation [11].

Ядра визначалися за їх розміром, формою та інтенсивністю флуоресценції, після чого навколо всіх правильних ядер створювалась помітка для ідентифікації клітин з маркуванням BrdU. Ядра з середньою інтенсивністю флуоресценції, вважалися позитивними для маркування BrdU. Кількість клітин, що аналізувалися, складала не менше 300 на лунку. Дослідження встановило, що 24-годинний період обробки є достатнім для виявлення хімічного впливу на проліферацію клітин [5,17].

Результати

Результати 1-го дослідження.

У цьому дослідженні було встановлено, що гени *Ngn2* і *Mash1* можуть індукувати розвиток нейрональної ідентичності в культурах, які містять постнатальну кортикальну астроглію. Було доведено, що такі нейрональні клітини насправді мають характеристики астроглії. Додатково, було показано, що нащадки, отримані з астрогліальних клітин після індукції мають функціональні властивості справжніх нейронів.

Було показано кілька ліній доказів того, що астрогліальні клітини з кори головного мозку можуть генерувати нейрони після експресії *Ngn2*, але не після трансдукції контрольним вірусом.

Таким чином, астрогліальні клітини з кори головного мозку можуть генерувати нейрони після експресії *Ngn2*.

Дослідження показали, що клітини астроглії можуть бути перепрограмовані у функціональні нейрони, які володіють потенціалами дії і можуть отримувати синаптичний вхід від інших нейронів. Ці нейрони проявляють електрофізіологічні властивості, характерні для зрілих нейронів, зокрема вони можуть генерувати потенціали дії, що залежать від напруги каналів Na^+ і K^+ .

Крім того, ці нейрони можуть підтримувати повторювані схеми розряду та адаптувати свої спайкові розряди за допомогою активних електропровідностей, таких як Ca^{2+} .

Нейрони з перепрограмованої астроглії - це нейрони, що були отримані з астроглії, гліальної клітини центральної нервової системи, за допомогою процесу перепрограмування. Особливістю цих нейронів є те, що вони здатні генерувати дієприймальні потенціали, сигнали, які передаються від одного нейрона до іншого через синаптичні зв'язки. Проте, нейрони, отримані з

перепрограмованої астроглії, не можуть генерувати функціональний пресинаптичний вихід протягом часового вікна культивування. Оскільки астроглія є не нейрональною клітиною, перепрограмування вимагає внесення змін в генетичну програму клітини, які дозволяють їй розвиватися як нейрон. Однак, перепрограмовані нейрони не досягають такої ж функціональної зрілості, як нейрони, що розвиваються з нейрональних попередників під час ембріонального розвитку.

Отже, нейрони, отримані з перепрограмованої глії, дійсно набувають фізіологічних ознак функціональних нейронів, що є необхідною передумовою для функціонального відновлення.

Результати 2-го дослідження.

У пасажі описано експеримент, в якому було вивчено проліферацію трьох нейрональних клітинних ліній (PC12, N1E-115 та SH-SY5Y) шляхом вимірювання частки клітин, що інкорпорували BrdU під час фази S клітинного циклу. BrdU є аналогом тимідину, який інкорпорується в ДНК реплікуючихся клітин під час фази S, що дозволяє ідентифікувати клітини, які активно діляться.

Клітинні лінії були вирощені у форматі 96-лунок та їхній ріст був контрольований з часом. Час подвоєння був обчислений на основі лінійної частини кривої росту і склав приблизно 32 години для клітин PC12, 46 годин для клітин N1E-115 та 40 годин для клітин SH-SY5Y.

Для вимірювання проліферації клітини були забарвлені барвником ДНК DAPI та зображені за допомогою автоматизованого збору та аналізу зображень. Було створено маску навколо всіх ідентифікованих ядер, а забарвлення BrdU було зображено в окремому каналі. Було визначено кількість ядер на полі, які були позитивні для BrdU, та обчислено частку BrdU-позитивних клітин.

Інгібітор полімерази ДНК афідиколін був використаний для гальмування проліферації клітин, і було виміряно його вплив на частку BrdU-позитивних клітин. Афідиколін значно зменшив частку BrdU-позитивних клітин у всіх трьох клітинних лініях.

У клітинній лінії PC12 негативні контрольні речовини не мали впливу на проліферацію чи життєздатність, тоді як позитивні контрольні речовини інгібували проліферацію принаймні на 50%. Дексаметазон не повністю інгібував проліферацію, а інгібітори синтезу ДНК збільшували кількість клітин, що інтегрують BrdU. Охратоксин-А та транс-ретинова кислота не мали впливу на проліферацію або життєздатність

Результати для клітинної лінії N1E-115 показали екстремальну змінливість ефектів речовин на проліферацію клітин з пластини на пластину, з великими стандартними похибками у значеннях I50. Лише афідиколін та цитозин арабінозид мали значення I50 для проліферації, які були відмінними від відповідного значення для життєздатності клітин.

Результати, отримані в клітинній лінії SH-SY5Y, були подібні до тих, що спостерігалися в клітинах PC12, хоча клітини SH-SY5Y були трохи менш чутливими до хімічних впливів

ВИСНОВКИ

1. Дослідження показали, що астрогліальні клітини можуть бути перепрограмовані у функціональні нейрони, здатні генерувати дійсні потенціали дії.
2. Результати для клітинної лінії N1E-115 показали екстремальну варіабельність впливу речовин на проліферацію клітин, з великими стандартними похибками в значеннях I50.
3. Результати, отримані в клітинної лінії SH-SY5Y, були схожі на ті, що спостерігалися в клітинах PC12, хоча клітини SH-SY5Y були трохи менш чутливі до хімічних впливів.
4. Унікальною рисою цих нейронів є те, що вони здатні генерувати дійсні потенціали дії, сигнали, які передаються від одного нейрона до іншого через синаптичні зв'язки. Однак нейрони, отримані з перепрограмованих астроглій, не можуть генерувати функціональний пресинаптичний вихід протягом культивування.
5. Оцінка нейротоксичності різних речовин на культивовані нейрони може бути важливим етапом у визначенні їхньої безпеки для використання в лікарській практиці. Вона дозволяє визначити дозу, яка може бути токсичною для нервової системи та розробити стратегії зниження ризику негативного впливу різних речовин на нервову систему.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

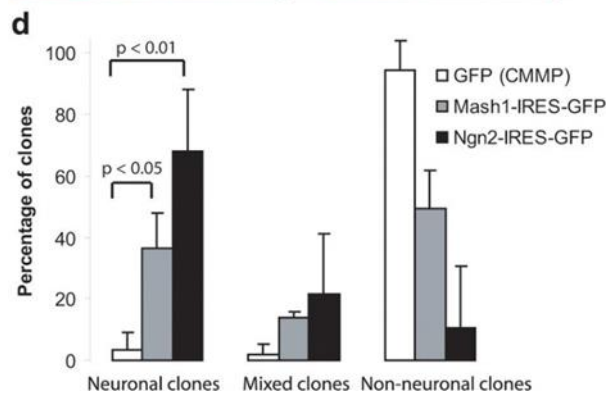
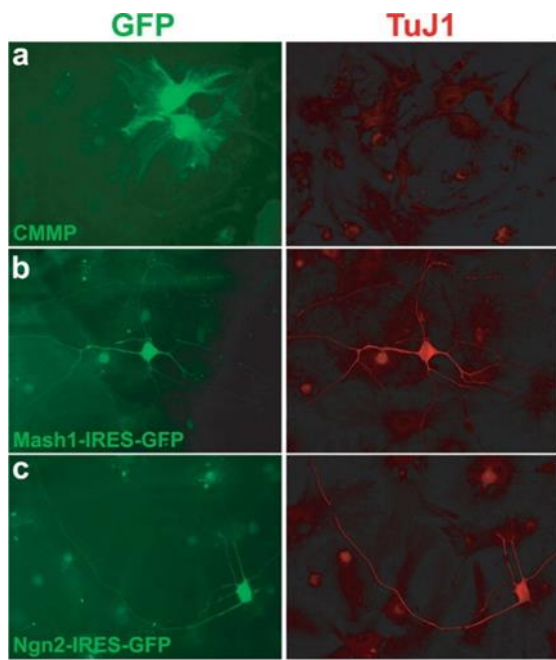
1. Бароне, М. Дж., Міядзакі, А. Д. і Тейлор, К. А. Вплив цілеспрямованого маркетингу на вибір споживача: чи один хороший поворот заслуговує іншого?. Ж. акад. Марк. Sci. 28 , 248–262 (2000).
2. Микола М. Радіо; Вільям Р. Манді (2008). Тестування нейротоксичності розвитку *in vitro*: моделі для оцінки хімічних впливів на ріст нейритів. , 29(3), 0–376.
3. Рікард-Блюм С. Сімейство колагену. Cold Spring Harb Perspect Biol . 2011;3(1):a004978. Опубліковано 1 січня 2011 р.
4. Солано Акоста, Олександра; Ерреро Креспо, Анхель; Колладо Агудо, Хесус (2018). Вплив ринкової орієнтації, можливостей мережі та підприємницької орієнтації на міжнародну діяльність малих і середніх підприємств (МСП). International Business Review, (), S0969593117304961–.
5. Aguirre, P., Valdés, P., Aracena-Parks, P., Tapia, V., Núñez, M.T., 2007. Upregulation of -glutamate-cysteine ligase as part of the long-term adaptation process to iron accumulation in neuronal SH-SY5Y cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292, C2197–C2203
6. Berninger B, Costa MR, Koch U, et al. Functional properties of neurons derived from *in vitro* reprogrammed postnatal astroglia. J Neurosci. 2007;27(32):8654-8664.
7. Bogdahn, U., Weber, H., Zapf, J., Dunisch, G., Lobering, H.G., Mertens, H.G., 1987. Therapy of malignant brain tumors: comparison of the *in vitro* activities of vidarabin-monophosphate, BCNU and 5-fluorouracil. Acta Neurol. Scand. 75, 28–36.
8. Constantinescu, R., Constantinescu, A.T., Reichmann, H., Janetzky, B., 2007. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. J. Neural Transm. 72 (Suppl.), 17–28.

9. Berninger B, Guillemot F, Götz M. Керівництво ідентифікацією нейромедіаторів нейронів, отриманих із розширених дорослих нервових стовбурових клітин. *Eur J Neurosci* . 2007; 25 (9): 2581-2590.
10. Götz M, Stoykova A, Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*. 1998;21(5):1031-1044.
11. Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2424–2428.
12. Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A та ін. Методи *in vitro* для оцінки нейротоксичності. Перспектива здоров'я навколишнього середовища . 1998; 106 Додаток 1 (Додаток 1): 131-158.
13. Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Götz M. Регіоналізація та специфікація долі в нейросферах: роль Olig2 і Pax6. *Mol Cell Neurosci* . 2004; 25 (4): 664-678.
14. Heng JS, Dubal DB, Kim DH та ін. Колаген VI захищає нейрони від токсичності Aβ. *Nat Neurosci* . 2009;12(2):119-121.
15. Nevner et al., 2006. Nevner RF, Hodge RD, Daza RA, Englund C. Транскрипційні фактори в глутаматергічному нейрогенезі: консервативні програми в неокротексі, мозочку та дорослому гіпокампі. *Neurosci Res*. 2006 рік; 55 :223–233
16. Neumann D, Leuba G, Rabinowicz T. Постнатальний розвиток неокортекса головного мозку миші. II. Кількісна цитоархітектоніка зорової та слухової зон. *Дж Гірнфорш* . 1977;18(6):483-500.
17. Kimhi, Y., Palfrey, C., Spector, I., Barak, Y., Littauer, U.Z., 1976. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 462–466.
18. Lockery SR, Goodman MB. The quest for action potentials in *C. elegans* neurons hits a plateau. *Nat Neurosci*. 2009;12(4):377-378.

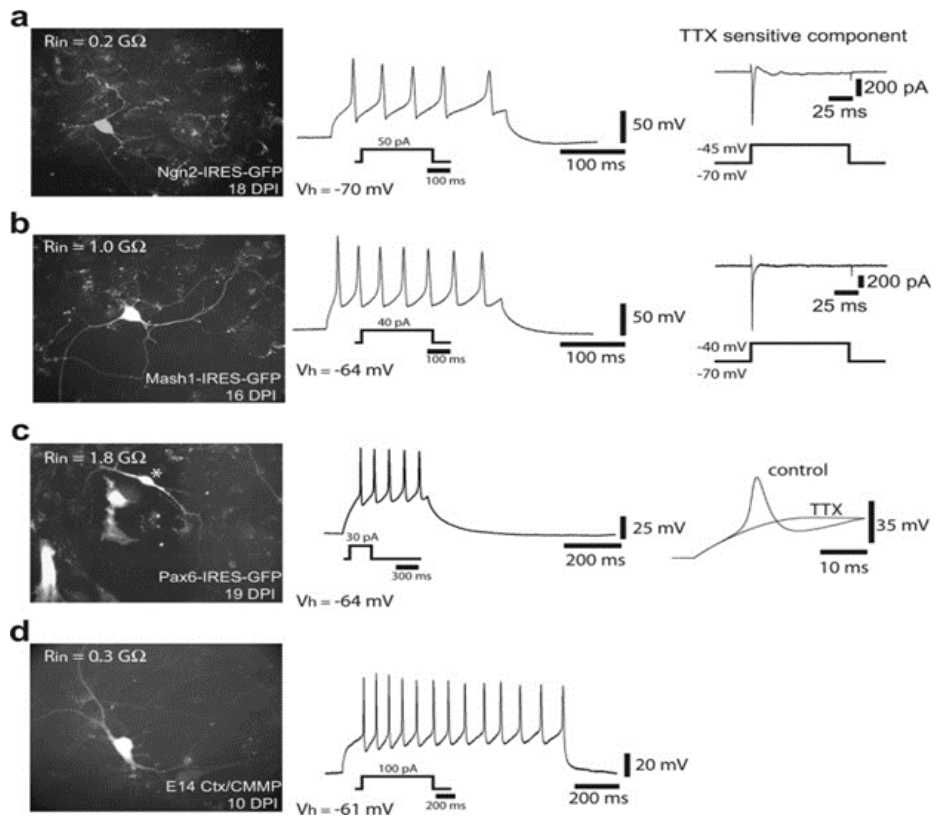
19. Li ST, Archibald SJ, Krarup C. і Madison RD Відновлення периферичних нервів за допомогою колагенових каналів . *Clin Mater* 9 , 195, 1992
20. Merten OW, Manuguerra JC, Hannoun C, van der Werf S. Production of influenza virus in serum-free mammalian cell cultures. *Dev Biol Stand.* 1999;98:23-74.
21. Morrow T, Song MR, Ghosh A. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development.* 2001;128(18):3585-3594. doi:10.1242/dev.128.18.3585
22. Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* 2000;127(24):5253-5263. doi:10.1242/dev.127.24.5253
23. Najafi MF, Zahri S, Vahedi F, Toosi LE, Ariaee N. Яка форма колагену підходить для культури нервових клітин?. *Neural Regen Res* . 2013; 8 (23): 2165-2170.
24. Pazos P, Boveri M, Gennari A, Casado J, Fernandez F, Prieto P. Culturing cells without serum: lessons learnt using molecules of plant origin. *ALTEX.* 2004;21(2):67-72.
25. Saint Mleux B, Moore LE. Стріляючі властивості та електротонічна структура спинномозкових нейронів личинок *Xenopus*. *J Neurophysiol* . 2000;83(3):1366-1380.
26. Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Sanchez-Ramos, J., 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology* 27, 82–92.
27. Warren N, Caric D, Pratt T, et al. The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 1999;9(6):627-635.
28. Zhong W, Chia W. Нейрогенез і асиметричний поділ клітин. *Curr Opin Neurobiol* . 2008;18(1):4-11.
29. <https://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=212&sim=1309&cnt=1>

30. <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>

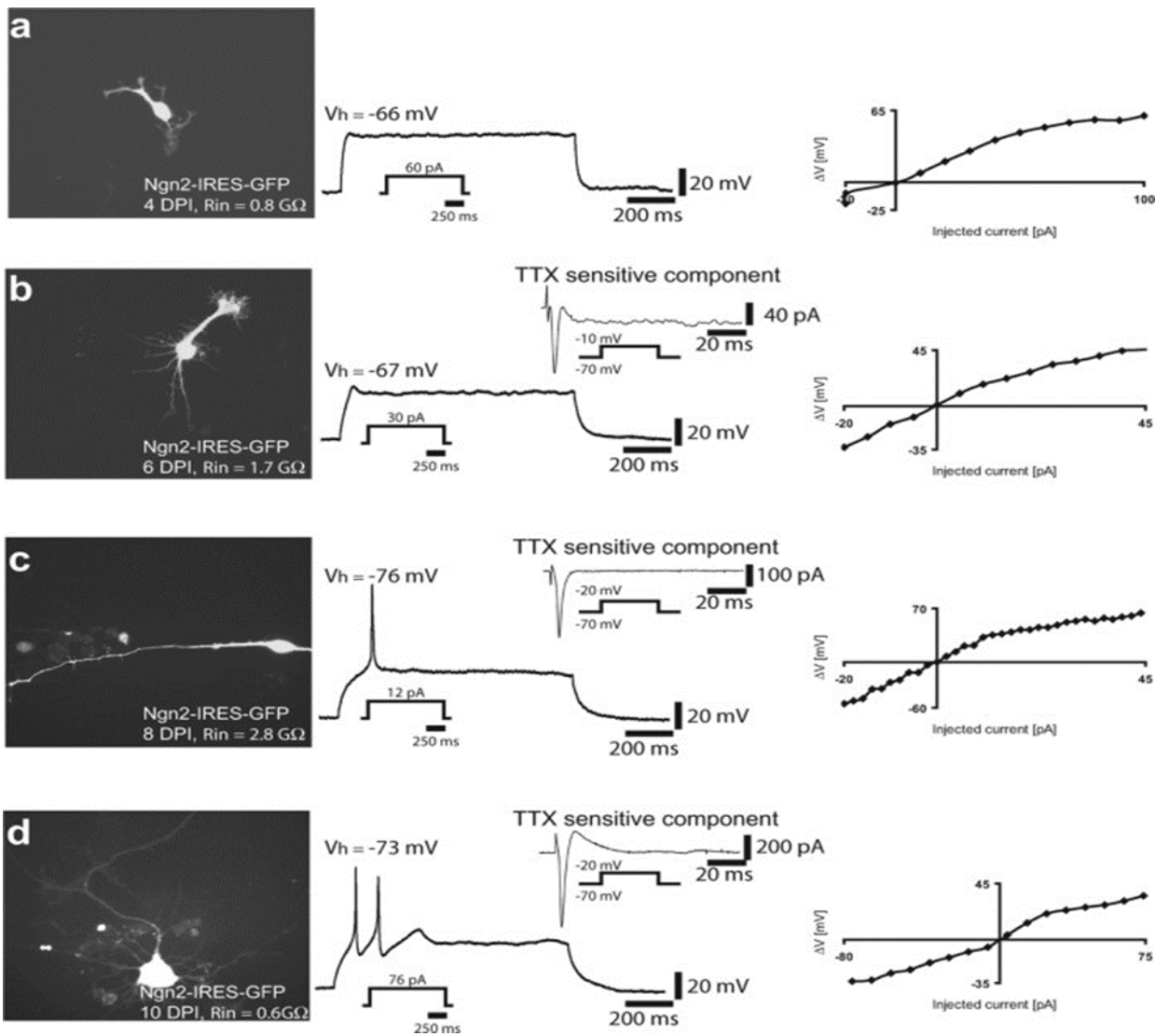
Додаток А



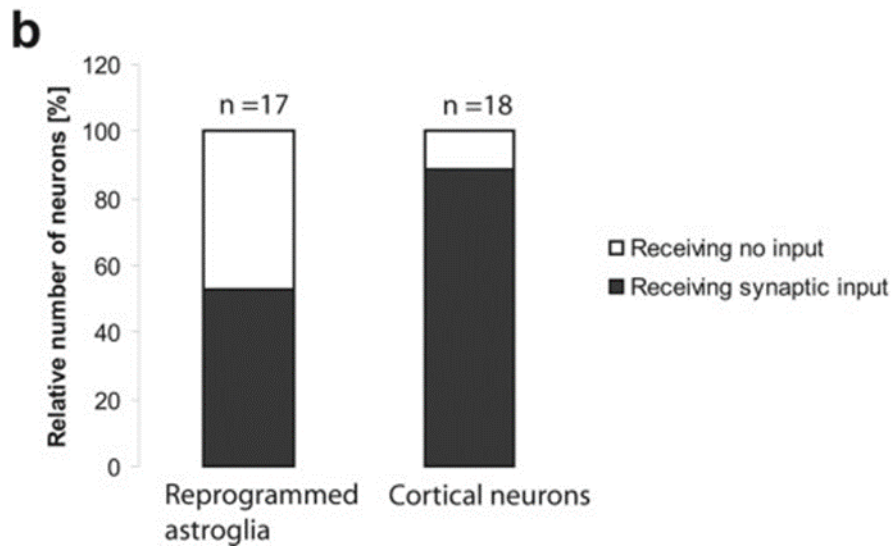
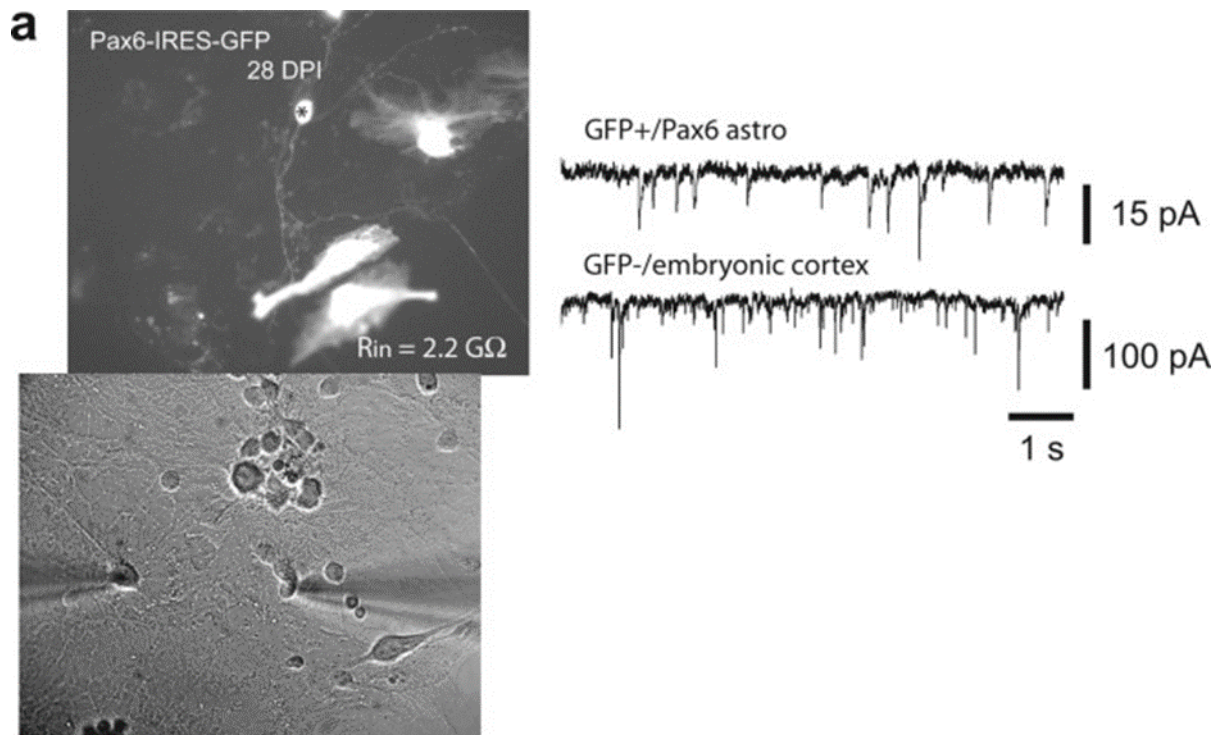
Додаток Б



Додаток В



Додаток Г



Додаток Д

Name	CAS	Vehicle	Source	Neuronal Proliferation <i>in vitro</i> ^a
Aphidicolin	38966-21-1	DMSO	EMD	Breier et al. (2008)
Cadmium chloride	7790-78-5	DMSO	Aldrich	Gulisano et al. (2009)
Cytosine Arabinoside	147-94-4	DMSO	Sigma	Hashimoto et al. (2003)
Dexamethasone	50-02-2	DMSO	Sigma	Kim et al. (2004)
5-Fluorouracil	51-21-8	DMSO	Sigma	Bogdahn et al. (1987)
Methylmercury chloride	115-09-3	DMSO	Aldrich	Burke et al. (2006)
Ochratoxin-A	303-47-9	DMSO	Sigma	Sava et al. (2007)
<i>trans</i> -Retinoic acid	302-79-4	DMSO	Sigma	Blanco et al. (2001)
Acetaminophen	103-90-2	DMSO	Sigma	Holownia et al. (1997) ^b
Amoxicillin	26787-78-0	DMSO	Sigma	NR ^c
Dimethyl phthalate	131-11-3	DMSO	Aldrich	NR ^c
Diphenhydramine HCl	147-24-0	DMSO	Sigma	NR ^c
Glyphosate	1071-83-6	H ₂ O	Chem Service	NR ^c
Omeprazole	73590-58-6	DMSO	Sigma	NR ^c
Saccharin sodium salt	82385-42-0	DMSO	Sigma	NR ^c
d-Sorbitol	50-70-4	H ₂ O	Sigma	NR ^c