

**ВЛИЯНИЕ МАТЕРИАЛА ПОКРЫТИЯ ПОВЕРХНОСТИ
НА ФОРМИРОВАНИЕ ОТРОСТКОВ КЛЕТОК
В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ
*Lymnaea stagnalis***

Харитонов В. Р., Сидоров А. В.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
sidorov@bsu.by

Введение. Первичные культуры нейронов широко используются для решения многих задач современной физиологии, в том числе для исследования механизмов межклеточных взаимодействий. В этой связи перспективным видится более активное внедрение в практику научно-исследовательских работ культуры клеток, полученных от модельных нейробиологических объектов (моллюски, насекомые, аннелиды и т. д.). Их центральные нейроны относятся к идентифицированным, когда известны и позиция, занимаемая ими в нейронной сети, и нейромедиаторное обеспечение, и характер связи с другими клетками. Кроме того, многие из этих животных относятся к беспозвоночным, а их нейроны значительно более устойчивы к действию чрезвычайных физических и/или химических раздражителей по сравнению с аналогичными клетками высших позвоночных, что делает более простой задачей нахождение их в условиях культуры.

Нервные клетки, как и многие другие, являются поверхностно-зависимыми. Существует множество факторов, влияющих на развитие нервной ткани как в организме, так и в культуре. При этом особую роль приобретает способность нервных клеток формировать отростки (спрутинг), определяющая последующее взаимодействие между нейронами посредством синаптических соединений.

Целью данной работы было оценить влияние материала покрытия поверхности, на которую помещались изолированные нейроны ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis*, на возможность формирования ими отростков и контактов между ними.

Методы исследования. Использовали препараты нервной системы (центральное кольцо нервных ганглиев) половозрелых особей *Lymnaea stagnalis* (высота раковины не менее 3 см). Выделенную ЦНС троекратно промывали в стерильном, содержащем антибиотик (пенициллин/стрептомицин), нормальном растворе Рингера для *Lymnaea*. При помощи пинцетов разрывали соединительнотканную оболочку нервных ганглиев, «вытряхивая» из них клетки. Последующую их сегрегацию проводили механически, многократно забирая использованный раствор с находящимися в нём клетками в наконечник пипетки. Для выращивания клеток использовали модифицированную среду Лейбовица (L-15) с добавлением глутамина (10 мМ) и глюкозы (1 мМ), из которой 20% составляла т. н. подготовленная среда (L-15, в которой предварительно были проинкубированы 12 ЦНС моллюска на 6 мл в течение 72 ч). Использовали три варианта поверхности: пластиковое покрытие чашки (полистерен), желатин (0,2 %) и поли-(L-лизин) (0,01 %). Выделенные и помещенные в чашки Петри клетки оставляли в темноте, при комнатной температуре (20°C) и нормальной атмосфере, на 72 ч. Оценку морфологии клеток проводили при помощи микроскопа Axiovert 25 (Carl Zeiss), увеличение объектива 10 (20, 32).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что способность клеток к адгезии и их последующая посадка на субстрат зависят от типа используемой поверхности. При использовании необработанного пластика (полистерен) отмечено слабое сцепление нейронов с поверхностью, что влечет за собой их нестабильную посадку и невозможность формирования ими отростков. Сходные результаты получены и при использовании в качестве подложки 0,2% раствора желатина, нанесенного на полистереновую поверхность культуральной чашки.

Напротив, изначальная обработка поверхности чашки Петри посредством поли-(L-лизина) приводила к более прочному сцеплению нейронов с поверхностью. При этом отмечена их способность распластаться по поверхности и начать формирование многочисленных отростков с выраженным конусом роста аксона (рис. 1).



Рисунок 1. – Примеры формирования мультиполярных клеток (а, б) и ветвления аксона (в, обозначенная пунктиром область) в первичной культуре нейронов *Lymnaea stagnalis* (подложка – поли-(L-лизин))

Более того, результатом активного спрутинга рядом расположенных нервных клеток является взаимодействие их отростков друг с другом и с телом соседней клетки (рис. 2), а также формирование аутапсов, когда отросток нейрона контактирует со своим собственным телом. Оценка природы таких соединений (химический, электрический или смешанный типы) нуждается в дополнительном изучении.



**Рисунок 2. – Взаимодействующие отростки клеток первичной культуры нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis*:
1 – формирующие отростки клетки;
2 – тела нейронов, не формирующих отростки**

Полилизин широко используется в качестве материала покрытия при выращивании клеток, в том числе и нервных. В частности, использование разветвленного полилизина улучшает адгезионную способность клеток гиппокампа в культуре по сравнению с его линейной формой [2]. При этом низкая адгезивная способность нейронов характерна для пластмасс, в том числе и для такого как полистирол [3], что подтверждается и результатами наших наблюдений. Согласно литературным данным, наилучшими субстратами для клеток являются компоненты внеклеточного матрикса, которые чаще всего используют при культивировании клеток *in vitro*. Так, ламинин и коллаген, обладая схожей эффективностью, способствуют большей адгезии клеток даже по сравнению с фибронектином [4].

Известно и об использовании гибридных технологий покрытия, когда полилизин наносится на модифицированные пленки, содержащие нити, представленные рекомбинантными белками паутины (спидроин-1) [5], вызывающими повышение экспрессии адгезионных молекул нервных клеток, способствуя их росту и дифференцировке. Кроме того, использование различных ростовых факторов (фактор роста нервов и т. п.) значительно улучшает параметры культивирования нейронов, выражено влияя на число нейритов, их средней длины и стабильности [1], что определяет использование предварительно подготовленных сред, содержащих требуемые регуляторные факторы.

Выводы. Таким образом, использование полилизинового покрытия видится перспективным в плане как получения первичной культуры нервных клеток модельных беспозвоночных, так и изучения характера взаимодействия клеток друг с другом.

Литература

1. Darlene G. A., Ross A. K., Tejal A. D. Characterization of PC12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors // J. of Materials Sci.: Materials in Medicine. – 2003. – Vol. 14. – P. 1005-1009.
2. Kojima C., Fusaoka-Nishioka E., Imai T. et al. Dendrigraft polylysine coated-poly(glycolic acid) fibrous scaffolds for hippocampal neurons // J. Biomed. Material. Research. – 2016. – Vol. 104. – P. 2744-2750.

3. Orłowska A., Perera P.T., Al Kobaisi M. et al. The effect of coatings and nerve growth factor on attachment and differentiation of pheochromocytoma cells // *Materials*. – 2018. – Vol. 11. – P. E60.

4. Tomaselli J. K., Damsky C. H., Reichardt L. F. Purification and characterization of mammalian integrins expressed by a rat neuronal cell line (PC12) evidence that they function as α/β heterodimeric receptors for laminin and type IV collagen // *J. Cell Biol.* – 1988. – Vol. 107. – P. 1241-1252.

5. Zhao X. et al. Effect of poly (L-lysine) modified silk fibroin film on the growth and differentiation of neural stem cells // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* – 2018. – Vol. 34. – P. 1650-1659.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ NO-СИНТАЗНОЙ ФУНКЦИИ НА ЭФФЕКТ ЭРИТРОПОЭТИНА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

Ходосовский М. Н.

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Беларусь
hodosowsky@grsmu.by

Введение. Ранее было показано, что под влиянием однократного введения эритропоэтина (ЭПО) у крыс при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени (ИРП) улучшаются параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния, снижается активность трансаминаз крови, а также повышается продукция монооксида азота (NO) [1]. Поскольку NO, как представитель класса газотрансмиттеров, может потенцировать ряд протективных механизмов, включая коррекцию окислительных повреждений.

Целью работы было выяснение вклада данного газотрансмиттера в защитный эффект ЭПО при моделировании ИРП у крыс.

Методы исследования. Работа выполнена на 34 взрослых белых крысах-самцах, массой 280-360 г. Ишемию печени вызывали маневром Прингла в течение 30 минут, реперфузионный период длился 120 минут. В конце эксперимента осуществляли забор смешанной венозной крови и тканей печени для оценки