

... КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ... CELL BIOLOGY ...

УДК: 612.811.3.085.2:576.31

Вплив складу живильного середовища на морфологічні характеристики культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят

С.Г.Алі, О.С.Сидоренко, Г.А.Божок

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)
bozhokgaru@gmail.com*

Спінальні ганглії (СГ) є потенційним джерелом нейральних стовбурових клітин, оскільки містять клітини-похідні нервового гребеню, здатні до диференціювання в нейрони та клітини глії. Адекватною сучасною моделлю для досліджень *in vitro* можна вважати культури клітин, отримані від тварин, близьких за фізіологічними характеристиками до людини. В цьому відношенні зручним модельним об'єктом є культури клітин, отримані зі СГ свині домашньої (*Sus scrofa domesticus*). Метою роботи було отримання первинної культури клітин зі СГ неонатальних поросят і вивчення їх морфологічних і проліферативних властивостей в залежності від складу середовища культивування. Склад середовищ, приготованих на основі α -MEM, варіювався залежно від наявності фетальної телячої сироватки (ФТС) або її сучасних замінників B-27 та НейроМакс. Встановлено морфологічні відмінності первинних культур клітин СГ неонатальних поросят в залежності від складу живильного середовища. При культивуванні в присутності 10% ФТС спостерігається прикріплення клітин та формування моношару з мантійних гліоцитів (МГ) і фібробластоподібних клітин. На моношарі присутні невеликі колонії нейронів, які продукують довгі відростки. При культивуванні в присутності НейроМакс та B-27 основна маса клітин не прикріплюється, але організується у флотуючі мультиклітинні сфероїди (МС). При пересіві культури, отриманої в присутності 10% ФТС, спостерігається швидке прикріплення та проліферація клітин. При пересіві МС, отриманих в присутності НейроМакс та B-27, в середовище з 10% ФТС спостерігається прикріплення МС до субстрату та міграція з них клітин. Ці клітини зберігають здатність до активної проліферації, оскільки на 5–7 добу субкультивування моношар досягає конфлюентності. Незалежно від складу середовища первинного культивування у всіх субкультурах морфологічно розрізняються 3 типи клітин: МГ, нейроноподібні та фібробластоподібні клітини. Тип клітин, що превалює в субкультурі, залежить від складу живильного середовища. При пересіві МС з середовища, яке містило B-27, спостерігається значне зростання фібробластоподібних клітин, тоді як при пересіві МС з середовища, яке містило НейроМакс, були присутні в основному МГ та нейроноподібні клітини.

Ключові слова: культура клітин спінальних гангліїв, неонатальні поросята, мантійні гліоцити, мультиклітинні сфероїди, нейрони.

Influence of nutrient medium composition on the morphological characteristics of culture of dorsal root ganglion cells of neonatal piglets

S.G.Ali, O.S.Sidorenko, G.A.Bozhok

Dorsal root ganglion (DRG) is a potential source of neural stem cells because it contains neural crest derived cells that are capable to differentiate into neurons and glial cells. Cell cultures obtained from animals that are close to humans by physiological characteristics can be regarded as an adequate modern model for *in vitro* studies. In this respect, DRG cell culture obtained from the domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) is a convenient model. The aim of the work was to obtain a primary cell culture of DRG of neonatal piglets and to study its morphological and proliferative properties depending on culture medium composition. The composition of the media prepared on the basis of α -MEM varied depending on the presence of fetal calf serum (FCS) or its modern supplements B-27 and NeuroMax. It is established that morphological differences of primary DRG cell cultures of neonatal pigs depend on the composition of the nutrient medium. When cultured in the presence of 10% FCS, the formation of monolayer which includes satellite glial cells (SGC) and fibroblast-like cells was observed. Small colonies of neurons producing long processes were on the monolayer. When cultured in the presence of NeuroMax and B-27 supplements, the bulk of the cells is not attached, but organized into floating multicellular spheroids (MS). With the passage of culture obtained in the presence of 10% FCS, rapid attachment and proliferation of cells was observed. When MS obtained in the presence of NeuroMax and B-27 were transferred to the medium with 10% FCS, the attachment of MS to the substrate and cell migration were observed. The cells retain the ability to actively proliferate, because the

monolayer achieves confluence by 5–7 days of subculture. Regardless of the composition of the primary culture medium, there were 3 morphologically different types of cells in the subcultures: SGC, neuron-like and fibroblast-like cells. The type of cells prevailing in the subculture depends on the composition of the nutrient medium. When MS is transferred from a B-27-containing medium, a significant growth of fibroblast-like cells is observed, whereas when MS is transferred from NeuroMax-containing medium MG and neuron-like cells were abundant.

Key words: culture of dorsal root ganglion cells, neonatal pigs, satellite glial cells, multicellular spheroids, neurons.

Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят

С.Г.Али, О.С.Сидоренко, Г.А.Божок

Спинальные ганглии (СГ) являются потенциальным источником нейральных стволовых клеток, поскольку содержат клетки-производные нервного гребня, способные к дифференцировке в нейроны и глиальные клетки. Адекватной современной моделью для исследований *in vitro* можно считать культуры клеток, полученные от животных, близких по физиологическим характеристикам к человеку. В этом отношении удобным модельным объектом являются культуры клеток, полученные из СГ свиньи домашней (*Sus scrofa domestica*). Целью работы было получение первичной культуры клеток из СГ неонатальных поросят и изучение ее морфологических и пролиферативных свойств в зависимости от состава среды культивирования. Состав сред, приготовленных на основе α -МЕМ, варьировался в зависимости от наличия фетальной телячьей сыворотки (ФТС) или ее современных заменителей B-27 и НейроМакс. Установлены морфологические различия первичных культур клеток СГ неонатальных поросят в зависимости от состава питательной среды. При культивировании в присутствии 10% ФТС наблюдается прикрепление клеток и формирование монослоя из мантийных глиоцитов (МГ) и фибробластоподобных клеток. На монослое присутствуют небольшие колонии нейронов, продуцирующих длинные отростки. При культивировании в присутствии НейроМакс и B-27 основная масса клеток не прикрепляется, а организовывается во флотирующие мультиклеточные сфероиды (МС). При пересеве культуры, полученной в присутствии 10% ФТС, наблюдается быстрое прикрепление и пролиферация клеток. При пересеве МС, полученных в присутствии НейроМакс и B-27, в среду с 10% ФТС наблюдается прикрепление МС к подложке и миграция из них клеток. Данные клетки сохраняют способность к активной пролиферации, поскольку к 5–7 суткам субкультивирования монослой достигает конfluence. Независимо от состава среды первичного культивирования во всех субкультурах морфологически различаются 3 типа клеток: МГ, нейроноподобные и фибробластоподобные клетки. Тип клеток, преобладающий в субкультуре, зависит от состава питательной среды. При пересеве МС из B-27-содержащей среды наблюдается значительный рост фибробластоподобных клеток, тогда как при пересеве МС из НейроМакс-содержащей среды в основном присутствовали МГ и нейроноподобные клетки.

Ключевые слова: культура клеток спинальных ганглиев, неонатальные поросята, мантийные глиоциты, мультиклеточные сфероиды, нейроны.

Введение

Спинальные ганглии (СГ) являются потенциальным источником нейральных стволовых клеток, поскольку было показано, что они содержат клетки-производные нервного гребня (КПНГ), которые способны дифференцироваться в нейроны и различные субпопуляции глиальных клеток (Ciaroni et al., 2000; Lagares et al., 2007; Li et al., 2007; Singh et al., 2009). Эксперименты показывают, что нейрогенез в СГ поддерживается на протяжении всей жизни за счет этой популяции покоящихся стволовых/прогениторных клеток (Farel, 2003).

Отдельный интерес представляют собой мантийные глиоциты (МГ), в англоязычной литературе известные как «satellite glial cells». Они представляют собой специализированные клетки, окружающие нейроны в ганглиях периферической нервной системы. Считается, что МГ участвуют в регуляции химического микроокружения нейронов, осуществляют структурную и трофическую поддержку нейронов, выделяют глиотрансмиттеры и облегчают передачу сигнала (Hanani, 2005, 2010; Gu et al., 2010). Установлена важная роль МГ в патогенезе некоторых неврологических расстройств и, особенно, в состояниях, сопровождающихся хроническим болевым синдромом (Caruano et al., 2009; Hanani, 2012; Warwick, Hanani, 2013).

Технологии культивирования, разработанные за прошедшие годы, позволили получить несколько типов культур из СГ: обогащенные нейронами, МГ или шванновскими клетками, а также культуры, содержащие стволовые КПНГ (Backström et al., 2000; Svennigsen et al., 2004; Li et al., 2007; de Luca et al., 2015; Tongtako et al., 2017).

Нужно отметить, что основной пул работ по культивированию МГ и изучению влияния различных физико-химических и фармакологических факторов проведен на СГ, полученных от крыс или мышей. Однако при интерпретации такого рода данных и попытке переноса их в область практической медицины или фармакологии нужно учитывать значительные эволюционные различия, наблюдаемые между организмами лабораторных грызунов и человека. В связи с этим существует задача по получению культуры клеток МГ от вида животных, который является более близким по физиологическим характеристикам к человеку.

В этом отношении удобным модельным объектом является свинья домашняя (*Sus scrofa domestica*) из-за физиологического сходства с человеком, а также наличия геномных, транскриптомных и протеомных инструментов анализа, уже разработанных для данного вида. Кроме того, в настоящее время существует широкий спектр линейных и трансгенных пород свиней, что делает удобным их применение в качестве биомедицинских моделей (Bassols et al., 2014). Однако до сих пор не было предпринято попытки получения первичной культуры клеток из СГ свиньи и характеристики ее морфофункциональных свойств.

Цель работы – получить первичную культуру клеток из спинальных ганглиев неонатальных поросят и изучить влияние состава питательной среды на ее морфологические и пролиферативные характеристики.

Материалы и методы исследования

Для получения суспензии клеток использовали СГ поросят возраста P0–P1. После извлечения СГ помещали в охлажденную среду α -МЕМ (Биолот, Россия), содержащую 100 мкг/мл гентамицина (НПП «ПанЭко», Россия), 100 мкг/мл цефотаксима (Биосинтез, Россия), 2,5 мкг/мл амфотерицина В (Biowest, Франция). СГ подвергали ферментативной дезагрегации в среде α -МЕМ, содержащей 1,25 мг/мл коллагеназы типа IА (НПП «ПанЭко») с последующей обработкой 0,25% раствором трипсина-ЭДТА с солями Хенкса (НПП «ПанЭко») по методу de Luca и соавт. (de Luca et al., 2015). Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Сохранность полученных клеток, которую контролировали с помощью окрашивания 0,4% раствором трипанового синего, во всех опытах составляла 80 ± 10 %.

Клетки высевали в концентрации 5×10^5 кл/мл и культивировали в пластиковых чашках Петри с поверхностью, обработанной поли-D-лизином (Orange Scientific, Бельгия) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

В работе были использованы среды следующего состава:

Среда 1 – α -МЕМ, 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, BioSera, Франция), по 100 мкг/мл гентамицина/цефотаксима, 2,5 мкг/мл амфотерицина В;

Среда 2 – α -МЕМ, 2% В-27 (Thermo Fisher Scientific, США), по 100 мкг/мл гентамицина/цефотаксима, 2,5 мкг/мл амфотерицина В;

Среда 3 – α -МЕМ, 2% НейроМакс (НПП «ПанЭко»), по 100 мкг/мл гентамицина/цефотаксима, 2,5 мкг/мл амфотерицина В.

Для субкультивирования клетки первичной монослойной культуры открепляли от подложки 0,25% раствором трипсина-ЭДТА с солями Хенкса (НПП «ПанЭко»).

Флотирующие мультиклеточные сфероиды (МС), полученные при культивировании в средах 2 и 3, на 5-е сутки переносили в 24-луночные планшеты (SPL LifeSciences, Корея) и продолжали культивировать в среде 1 в течение 10 суток. Замену среды (или половины среды в случае культивирования МС) осуществляли каждые 3–4 суток.

Для морфологического и морфометрического анализа клеточный монослой фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma, США) в течение 15 минут, затем отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH=7,4, Biowest) и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Микрофотосъемку осуществлял с помощью инвертированного микроскопа Биомед-4И (Россия) с видеоокуляром TourCam 9 Мпкс (Китай). Морфометрический анализ проводили по микрофотографиям с использованием программы TourView 3.7 (Китай).

Количественные данные экспериментов представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ данных осуществляли с помощью стандартных пакетов компьютерных программ Excel и Past. Вид распределения определяли с помощью W-критерия Шапиро-Уилка, достоверность различий между группами данных рассчитывали с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента (для групп с нормальным распределением данных) и непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (для групп с ненормальным распределением данных). Расхождение считали статистически значимым, если $p < 0,05$.

Результаты

В работах предыдущих авторов было установлено, что использование питательных сред, обогащенных сывороткой, является необходимым условием для долгосрочного поддержания и пролиферации МГ в культуре *in vitro* (Hayden, Seeds, 1996; Belzer et al., 2010; Tongtako et al., 2017), тогда как для обогащения культуры нейронами необходимо использование специальных ростовых добавок и сред (Neurobasal medium, N2, фактор роста нервов, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста). В нашей работе был сделан выбор в пользу получения культуры, обогащенной МГ, поэтому одной из сред, в которой производили культивирование, была питательная среда с 10% ФТС (среда 1).

ФТС представляет собой наиболее популярную добавку к среде культивирования, поскольку содержит жизненно важные питательные вещества, белки-переносчики и факторы роста, необходимые для поддержания клеток млекопитающих *in vitro*. Однако большим минусом при использовании данного компонента питательной среды является недостижимость одинакового состава сывороток разных партий, риск микробной контаминации и возможная цитотоксичность, поэтому в последнее время появилась тенденция к использованию заменителей сыворотки, например, таких как В-27 и НейроМакс. В связи с этим в нашей работе при культивировании клеток СГ неонатальных поросят нами были использованы среды с заменителями ФТС (среды 2 и 3).

На рис. 1 представлены микрофотографии, позволяющие охарактеризовать морфологические особенности культур клеток СГ, полученных в питательных средах разного состава.

Так, при культивировании клеток в присутствии 10% ФТС, клетки прикреплялись к поверхности в течение первых суток. В это время в культуре можно наблюдать светлые крупные клетки, представляющие собой тела чувствительных нейронов, окруженные группами мелких округлых МГ (рис. 1, А). На 3 сутки морфологические особенности полученной культуры клеток изменялись. Вокруг скоплений, состоящих из тел чувствительных нейронов, наблюдалось расселение и пролиферация 2 типов клеток: полигональных клеток с крупными уплощенными отростками и веретеновидных клеток с двумя тонкими отростками, которые в работах других авторов были идентифицированы как МГ (рис 1, Б).

К 5 суткам образовывался монослой, преимущественно состоящий из МГ. Кроме того, в культуре наблюдались крупные распластаные фибробластоподобные клетки. В некоторых местах сохранялись кластеры нейронов, формировавших длинные радиальные тяжи (рис. 1, В). На 15 сутки культивирования заметно, что крупные одиночные нейроны и клеточные кластеры располагаются на подложке, образованной разросшимися в несколько слоев МГ и спорадически расположенными фибробластоподобными клетками (рис. 1, Г). Наши результаты совпадают с данными других авторов, которые наблюдали подобную морфологическую картину при культивировании в питательной среде с добавлением сыворотки клеток СГ собак (Tongtako et al., 2017), куриных (Mudge, 1981) и мышиных (Backström et al., 2000) эмбрионов, ганглиев тройничного нерва взрослых крыс (Poulsen et al., 2014) и мышей (Belzer et al., 2010).

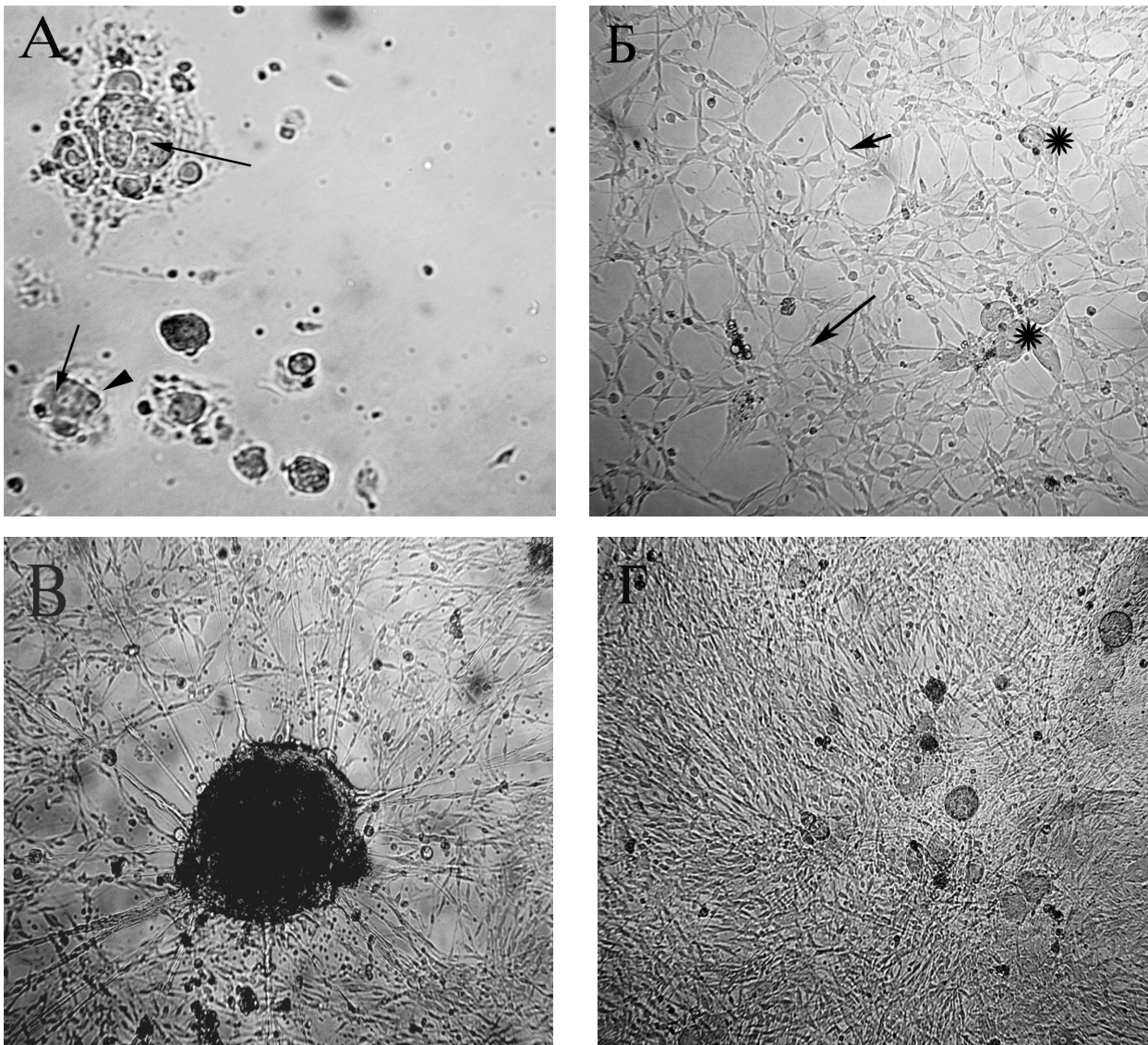


Рис. 1. Первичная культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в среде 1 (10% ФТС): А – 1-е сутки (длинные стрелки – тела чувствительных нейронов, одиночные или собранные в кластеры, короткая стрелка – МГ, окружающие чувствительные нейроны), об. 20, ок. 10; Б – 3-и сутки (звездочки – тела чувствительных нейронов, длинная стрелка – полигональная клетка, короткая стрелка – веретеновидная клетка с двумя тонкими отростками), В – 5-е сутки, об. 10, ок. 10; Г – 15-е сутки, об. 10, ок. 10

При использовании сред 2 и 3 на 1-е сутки в культуре наблюдались крупные круглые клетки – тела чувствительных нейронов (рис. 2, А). На 3-и сутки в культуре наблюдались флотирующие агрегаты, преимущественно состоящие из небольшого количества клеток, а также одиночные клетки и клеточный дебрис. На 5–7-е сутки в обеих средах формировались флотирующие МС, более темные в центре и с округлыми крупными и мелкими клетками по краям. (рис. 2, Б). К 15-м суткам культивирования МС увеличивались в размерах, уплотнялись, приобретали ровные очертания (рис. 2, В). Некоторые МС имели тенденцию к слиянию между собой.

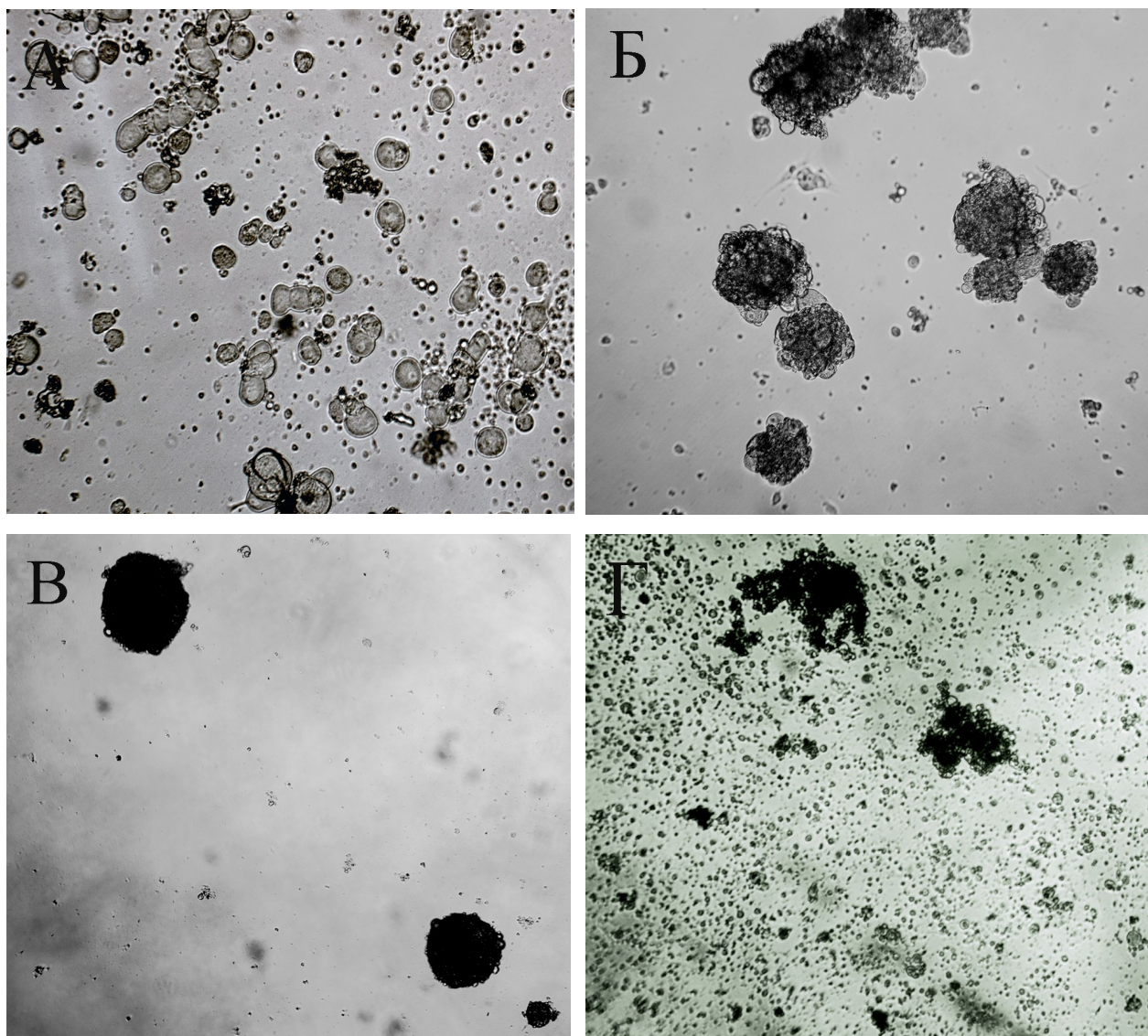


Рис. 2. Первичная культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в средах 2 и 3 (В-27 и Нейромакс): А – 1-е сутки; Б – 5-е сутки; В – 15-е сутки, Г – 25-е сутки. Об. 10, ок. 10

На 21–25-е сутки культивирования количество МС уменьшалось (рис. 2, Г). В культуре присутствовали небольшие клеточные агрегаты, неприкрепленные одиночные клетки и клеточный дебрис. Дегенерация культуры указывала на нехватку ростовых факторов, необходимых для роста и поддержания в культуре уже сформировавшихся МС.

На рис. 3 представлены данные, свидетельствующие об изменении размера и количества МС, образованных в результате культивирования в средах 2 и 3. Значимое увеличение размера МС происходит к 25 суткам культивирования в обеих средах (Рис. 3, А). Однако эти изменения более выражены при культивировании в среде 3, поскольку максимальный диаметр МС на среде 3 был 243 ± 43 мкм по сравнению с 134 ± 18 мкм на среде 2.

В то же время, в процессе культивирования количество сфероидов начинает постепенно снижаться (рис. 3, Б). В терминальные сроки культивирования (25 суток) количество МС значимо

меньше по сравнению с 5-ми сутками. Это дополнительно указывает на то, что в средах 2 и 3 не создается достаточных условий для долгосрочного поддержания МС.

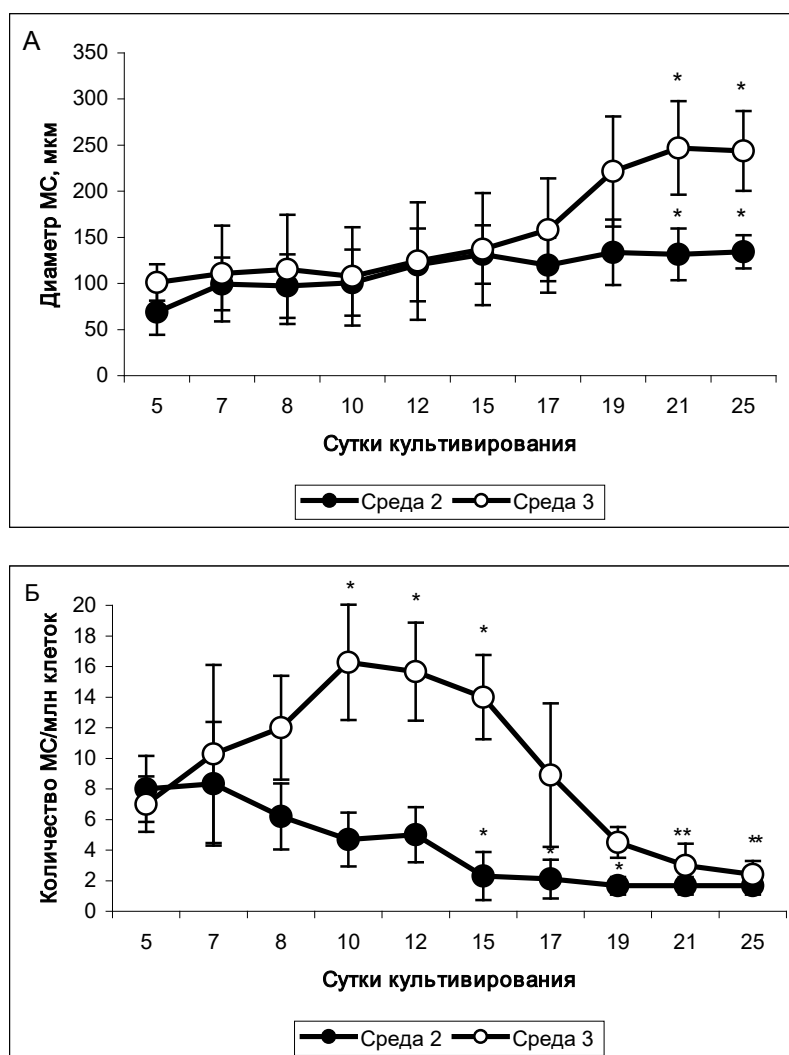


Рис. 3. Изменение диаметра (А) и количества (Б) МС, которые культивировались в течение 25 суток на средах 2 и 3

* различия достоверны по сравнению в 5-ми сутками культивирования ($p \leq 0,05$)

При пересеве культуры клеток СГ, полученных на среде 1 (содержащей 10% ФТС), крупные тела нейронов исчезают, при этом культура становится более однородной (рис. 4). Основная ее часть представлена МГ. Кое-где сохраняются прикрепленные кластеры клеток, от которых отходят длинные тяжи.

При пересеве МС, сформированных в средах 2 и 3 (В-27 и НейроМакс), в среду 1 (10% ФТС) наблюдалось их прикрепление к поверхности культуральной посуды в течение первых суток. Из МС выселялись клетки, которые быстро пролиферировали и заполняли практически всю поверхность к 10-м суткам. При пересеве МС, сформированных в обеих средах, выявлены клетки трех морфологических типов: крупные фибробластоподобные (ФБ) клетки, нейроноподобные клетки с пирамидальным телом и длинными ветвящимися отростками, а также МГ – веретеновидные мелкие темные клетки с двумя тонкими отростками (рис. 5). Отростчатые клетки образовывали сеть, которая частично располагалась на подложке из ФБ клеток. Подсчет клеток показал, что при пересеве МС из среды 2 нейроноподобные клетки составляют около 15%, МГ –

27%, а ФБ клетки – 58%, а при пересеве МС из среды 3 ФБ клеток было значительно меньше, а нейроноподобные клетки и МГ присутствовали в одинаковом количестве и составляли около 90% всех клеток.

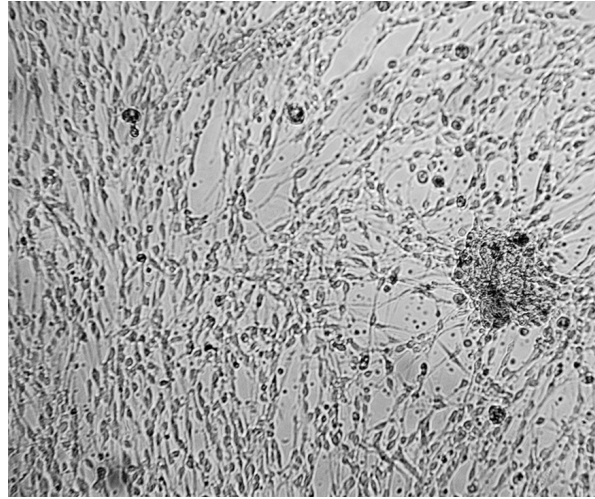


Рис. 4. Культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в присутствии 10% ФТС, на 3-и сутки после пересева. Об. 10, ок. 10

Обсуждение

СГ содержат тела афферентных (чувствительных) нейронов, передающих сенсорную информацию с периферии в центральную нервную систему. Морфологически в СГ различаются два типа сенсорных нейронов: большие светлые и малые темные (Lawson, 1992). Тела нейронов окружены МГ, которые являются представителями глии периферической нервной системы, как и шванновские клетки, создающие миелинизацию аксонов. СГ окружены соединительнотканной капсулой, между нервными волокнами также находятся прослойки соединительнотканых компонентов (эндонервия) с проходящими по ним кровеносными сосудами. Таким образом, первичная культура клеток, полученная из СГ, может содержать разные типы клеток (тела нейронов, фибробласты, глиальные и эндотелиальные клетки). Долгосрочное выживание того или иного типа клеток *in vitro* зависит от условий культивирования (состава питательной среды, специальной подложки, наличия ростовых факторов).

Культуры клеток из СГ активно изучались, начиная с середины 20 века, и до сих пор они являются удобным объектом, благодаря простоте получения. Однако в культуре *in vitro* в основном исследовали функциональные свойства сенсорных нейронов, в то время как глиальные клетки оставались на периферии интереса широкого круга исследователей вплоть до последнего времени.

Учитывая роль МГ в формировании структурного и функционального микроокружения нейрона (механическая и трофическая поддержка, регуляция состава внеклеточного пространства, создание барьера между нейронами и фенестрированными кровеносными капиллярами, получение и передача химических сигналов), большинство исследователей соотносят МГ периферической нервной системы с астроцитами центральной нервной системы. Но, несмотря на определенное сходство, МГ имеют набор собственных уникальных свойств.

Например, было установлено, что МГ как производные нервного гребня (Le Douarin et al., 1991) могут дифференцироваться в шванновские клетки, астроциты и олигодендроциты (Svennigsen et al., 2004). Кроме того, Н.У.Ли и соавт. (Li et al., 2007) показали, что из эксплантатов СГ выселяются прогениторные клетки, морфологически сходные с МГ, которые при определенной стимуляции дифференцируются в нейроны. В связи с этим авторы предположили, что МГ могут участвовать в регенеративном нейрогенезе при повреждениях периферической нервной системы.

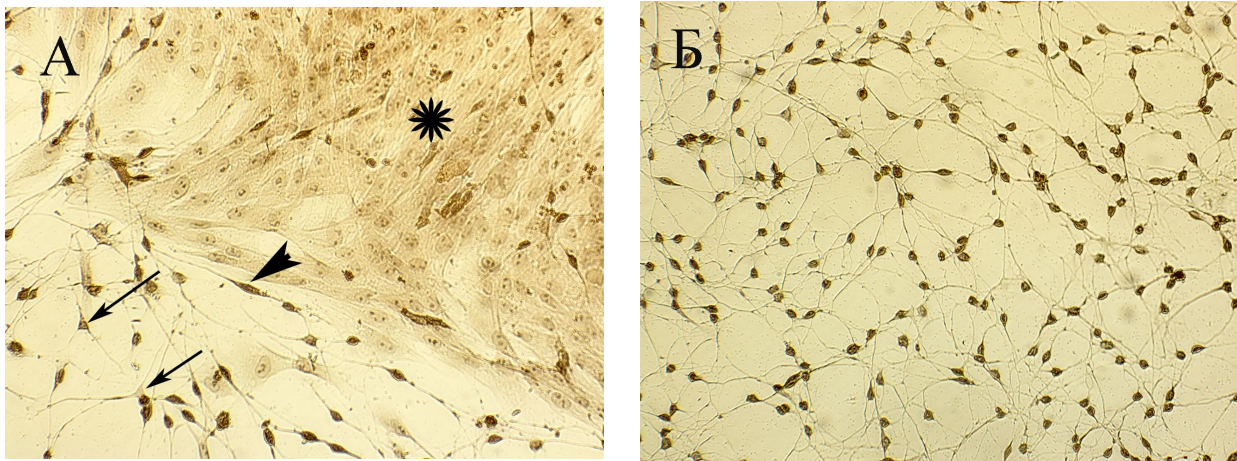


Рис. 5. Культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при культивировании в средах 2 (А) и 3 (Б), на 10-е сутки культивирования после пересева на среду 1. Окраска гематоксилином и эозином. Звездочка – монослой из ФБ клеток, тонкие стрелки – нейроноподобные клетки, толстая стрелка – МГ. Об. 20, ок. 10

Известно, что не только при культивировании, но и в условиях *in vivo* МГ обладают высоким пролиферативным потенциалом. Например, после аксотомии значительно возрастает соотношение МГ/нейрон (Hanani, 2005).

Как правило, культуры СГ получали от эмбриональных, неонатальных или взрослых мышей и крыс, некоторых других видов животных (цыпленка, обезьяны, собаки, быка). В представленной работе мы впервые получили первичную культуру из СГ неонатальных поросят.

Известно, что МГ способны быстро разрастаться в условиях поддержания культуры в присутствии 10% ФТС. Снижение концентрации ФТС до 1–2 % приводит к торможению пролиферации МГ (de Luca et al., 2015). Результаты морфологического анализа, полученные нами на СГ неонатальных поросят, подтверждают наблюдения, сделанные на культурах клеток СГ от других видов животных. В среде с 10% ФТС (среда 1) мы наблюдали активный рост МГ в течение 14 суток. Конфлюентный монослой формировался уже на 3–5 сутки, а в дальнейшем клетки росли в несколько слоев.

Однако при использовании заменителей сыворотки В-27 и НейроМакс (среды 2 и 3) в культуре не наблюдалось активной пролиферации клеток и формирования монослоя. Это означало, что в питательных средах данного состава отсутствовали компоненты, необходимые для стимуляции прикрепления и пролиферации МГ. Интересно, что при этом наблюдалось формирование МС, которые при пересеве на среду с 10% ФТС способны были продуцировать не только МГ, но и нейроноподобные и фибробластоподобные клетки. При пересеве МС из среды, содержащей В-27, наблюдается значительный рост ФБ клеток, тогда как при пересеве МС из среды, содержащей НейроМакс, культура была практически очищена от ФБ клеток и содержала преимущественно нейроноподобные клетки и МГ.

В некоторых предыдущих работах также была показана возможность образования флотирующих МС в культурах СГ или ганглия тройничного нерва (Lagares et al., 2007; Li et al., 2007; Singh et al., 2009; Ogawa et al., 2017). Однако для этого в состав базовой питательной среды вводили различные комбинации ростовых факторов (EGF/FGF, LIF/BMP2/FGF2). В нашей работе МС образовывались при культивировании без специальных ростовых добавок, что, возможно, свидетельствует о сохранности субпопуляции КПНГ в СГ неонатальных поросят.

Возможно, что для образования МС в культуре СГ неонатальных поросят достаточно базовой среды и отсутствия ФТС для уменьшения прикрепления и пролиферации МГ и фибробластов (замена на В-27 или НейроМакс). Однако тот факт, что в нашей работе МС дегенерировали к 25 суткам культивирования, говорит о том, что на определенном этапе для поддержания и развития МС необходимо вводить в состав среды ростовые добавки. Этот вывод подтверждают данные работы R.Огавы и соавт. (Ogawa et al., 2017), в которой было установлено

уменьшение диаметра МС при культивировании в отсутствии ростовых факторов и увеличение – при комбинации факторов LIF/BMP2/FGF2.

Таким образом, первичная культура клеток СГ неонатальных поросят, впервые полученная в результате нашей работы, является перспективным источником нервных клеток. В зависимости от условий ее поддержания (сывороткосодеждающая или бeссывороточная среды) возможно получать культуры с превалярованием определенного типа клеток (нейронов, МГ и ФБ).

Выводы

1. Первичные культуры, полученные из клеток СГ неонатальных поросят, сильно различаются морфологически в зависимости от наличия ФТС в питательной среде. При культивировании в присутствии 10% ФТС наблюдается прикрепление клеток и формирование монослоя, состоящего из МГ, нейроноподобных и фибробластоподобных клеток. При культивировании в присутствии заменителей сыворотки НейроМакс и В-27 основная масса клеток не прикрепляется, а организовывается во флотирующие МС.

2. При пересеве как монослойной культуры, так и МС в среду, содержащую 10% ФТС, наблюдается быстрое прикрепление и пролиферация клеток. При этом независимо от состава среды первичного культивирования во всех субкультурах морфологически различаются 3 типа клеток – МГ, нейроноподобные и фибробластоподобные клетки. Тип клеток, превалярующий в субкультуре, зависит от состава питательной среды. При пересеве МС из В-27-содержащей среды наблюдается значительный рост ФБ клеток, тогда как при пересеве МС из НейроМакс-содержащей среды культура состоит преимущественно из МГ и нейроноподобных клеток.

Авторы выражают благодарность А.А.Лаврику и компании ООО «НовиСтем» за помощь в проведении экспериментов.

Список литературы / References

- Backström E., Chambers B.J., Kristensson K., Ljunggren H.G. Direct NK cell-mediated lysis of syngenic dorsal root ganglia neurons in vitro // J. Immunol. – 2000. – Vol.165, no. 9. – P. 4895–4900.
- Bassols A., Costa C., Eckersall P.D. et al. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective // Proteomics Clin. Appl. – 2014. – Vol.8, no. 9. – P. 715–731.
- Belzer V., Shraer N., Hanani M. Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia // Neuron Glia Biology. – 2010. – Vol.6, no. 4. – P. 1–7.
- Capuano A., De Corato A., Lisi L. et al. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology // Mol. Pain. – 2009. – Vol.5. – P.43.
- Ciaroni S., Cecchini T., Cuppini R. et al. Are there proliferating neuronal precursors in adult rat dorsal root ganglia? // Neurosci. Lett. – 2000. – Vol.281, no. 1. – P. 69–71.
- de Luca A.C., Faroni A., Reid A.J. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration // J. Vis. Exp. – 2015. – Vol.96. – e52543.
- Farel P.B. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat // Brain Res. Dev. Brain. Res. – 2003. – Vol.144, no. 1. – P. 91–98.
- Gu Y., Chen Y., Zhang X. et al. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors // Neuron Glia Biol. – 2010. – Vol.6. – P. 53–62.
- Hanani M. Inter cellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: implications for chronic pain // Brain Res. – 2012. – Vol.1487. – P. 183–191.
- Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function // Brain Res. Dev. Brain. Res. – 2005. – Vol.48, no. 3. – P. 457–476.
- Hanani M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function // Brain Res. Rev. – 2010. – Vol.64, no. 2. – P. 304–327.
- Hayden S.M., Seeds N.W. Modulated expression of plasminogen activator system components in cultured cells from dissociated mouse dorsal root ganglia // J. Neurosci. – 1996. – Vol.16, no. 7. – P. 2307–2317.
- Lagares A., Li H.Y., Zhou X.F., Avendano C. Primary sensory neuron addition in the adult rat trigeminal ganglion: Evidence for neural crest glio-neuronal precursor maturation // J. Neurosci. – 2007. – Vol.27, no. 30. – P. 7939–7953.

- Lawson S.N. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons / S.A.Scott (Ed.) Sensory neurons, diversity, development and plasticity. – Oxford University Press, New York, 1992. – P. 27–59.
- Le Douarin N., Dulac C., Dupin E., Cameron-Curry P. Glial cell lineages in the neural crest // *Glia*. – 1991. – Vol.4, no. 2. – P. 175–184.
- Li H.Y., Say E.H., Zhou X.F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia // *Stem Cells*. – 2007. – Vol.25, no. 8. – P. 2053–2206.
- Mudge A.W. Effect of non-neuronal cells on peptide content of cultured sensory neurones // *J. Exp. Biol.* – 1981. – Vol.95. – P. 195–203.
- Ogawa R., Fujita K., Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells // *Biol. Open*. – 2017. – Vol.6, no. 5. – P. 602–618.
- Poulsen J.N., Larsen F., Duroux M., Gazerani P. Primary culture of trigeminal satellite glial cells: a cell-based platform to study morphology and function of peripheral glia // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2014. – Vol.6, no. 1. – P. 1–12.
- Singh R.P., Cheng Y.-H., Nelson P., Zhou F.C. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells // *Cell Transplant.* – 2009. – Vol.18, no. 1. – P. 55–68.
- Svennigsen A.F., Colman D.R., Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors // *Neuron Glia Biol.* – 2004. – Vol.1, no. 1. – P. 85–93.
- Tongtako W., Lehmbecker A., Wang Y. et al. Canine dorsal root ganglia satellite glial cells represent an exceptional cell population with astrocytic and oligodendrocytic properties // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol.7, no. 1. – P.13915.
- Warwick R.A., Hanani M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain // *Eur. J. Pain*. – 2013. – Vol.17, no. 4. – P. 571–580.

Представлено: Н.С.Кавок / Presented by: N.S.Kavok

Рецензент: Ю.Г.Кот / Reviewer: Yu.G.Kot

Подано до редакції / Received: 14.03.2018

About the authors: S.G.Ali – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, ali.s@novistem.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0528-671X>

O.S.Sidorenko – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, lesunec@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1340-7235>

G.A.Bozhok – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

Про авторів: С.Г.Алі – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, ali.s@novistem.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0528-671X>

О.С.Сидоренко – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, lesunec@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1340-7235>

Г.А.Божок – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

Об авторах: С.Г.Али – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, ali.s@novistem.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0528-671X>

О.С.Сидоренко – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, lesunec@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1340-7235>

Г.А.Божок – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>