

Экспрессия β -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят

О.С. СИДОРЕНКО, Г.А. БОЖОК, Е.И. ЛЕГАЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Expression of Beta-III Tubulin in Newborn Piglet Adrenal Cell Culture

O.S. SIDORENKO, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последнее время все больше внимания уделяется недифференцированным клеткам мозгового вещества надпочечников и рассматривается возможность их использования в регенеративной медицине. Вместе с симпатическими нейронами они являются производными клеток нервного гребня, относящимися к симпатoadrenal-линии, то есть имеют общего предшественника. Развитие клетки-предшественника по эндокринному или нейрональному пути определяется набором специфических факторов, выделяемых клетками микроокружения. Методика обогащения культуры такими мультипотентными клетками включает в себя формирование сферических колоний клеток (хромосфер) в условиях, препятствующих их адгезии к поверхности культивирования. Из клеток медуллы надпочечников быка были получены хромосферы, клетки которых дифференцировались в нейроны под действием NGF.

Цель работы – получение сферических структур (хромосфер) и исследование экспрессии β -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят.

Клетки, полученные из надпочечных желез ферментативным методом, культивировали в среде 199 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. К 3–4-м суткам образовывался монослой, состоящий из крупных фибробластоподобных клеток, на котором в дальнейшем формировались сфероподобные структуры. Затем часть клеток культивировали в среде с добавлением фактора роста нервов (NGF), остальные – в среде без NGF, и исследовали экспрессию β -III тубулина в обоих случаях.

При культивировании сферические колонии увеличивались в размере, из них выселялись клетки нейроноподобной морфологии. Местами такие клетки образовывали цепочки, соединенные тяжами, формируя сеть на монослое из фибробластоподобных клеток. Иммуноцитохимическое окрашивание выявило экспрессию β -III тубулина в соме и отростках клеток, выселяющихся из сферических колоний. При этом фибробластоподобные клетки, формирующие монослой, не экспрессировали β -III тубулин. Экспрессия β -III тубулина наблюдалась в культурах, выращенных как в среде с NGF, так и без него.

Таким образом, в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят на монослое из фибробластоподобных клеток формируются сферические клеточные колонии. В дальнейшем из них выселяются клетки нейроноподобной структуры, экспрессирующие β -III тубулин. Экспрессия β -III тубулина не зависит от присутствия NGF в среде культивирования.

Nowadays more and more attention has been paid to non-differentiated cells of adrenal medulla and the possibility of their application in regenerative medicine has been considered. Along with sympathetic neurons they are derivatives of the cells of neural crest referred to sympathoadrenal line, *i. e.* have the common progenitor. The development of progenitor cell according to endocrine or neuronal lineage is determined by the set of specific factors, released by the microenvironment cells. The methods of enriching the culture with these multipotent cells comprise the formation of spherical cell colonies (chromospheres) under the conditions preventing their adhesion to the culturing surface. From the cells of bovine adrenal medulla there were obtained chromospheres, the cells which differentiated into neurons under NGF effect.

The research aim was to obtain spherical structures (chromospheres) and investigate the expression of beta-III tubulin in culture of newborn piglet adrenal cells.

The cells obtained from adrenal glands by enzyme method were cultured in medium 199 with 10% fetal calf serum. To the 3–4th day there was formed the monolayer consisting of large fibroblast-like cells, on which later the sphere-like structures appeared. Then a part of cells was cultured in the medium supplemented with the nerve growth factor (NGF) and the rest of them were cultured without NGF and there was examined the expression of beta-III tubulin in both cases.

During culturing the spherical colonies increased, and the cells of neuron-like morphology migrated from them. Somewhere these cells formed the chains, connected with the bundles, forming the net on monolayer of fibroblast-like cells. Immune cytochemical staining revealed the expression of beta-III tubulin in the soma and processes of cells, migrated from spherical colonies. Herewith the fibroblast-like cells forming monolayer did not express beta-III tubulin. The expression of beta-III tubulin was observed in the cultures grown both in the medium with NGF and without it.

Consequently, spherical cell colonies are formed in adrenal cell culture of newborn piglets on the monolayer of fibroblast-like cells. Thereafter the cells of neuron-like structure migrate from them, and express beta-III tubulin. Expression of beta-III tubulin does not depend on the presence of NGF in culture medium.