

Экспрессия некоторых нейральных маркеров при субкультивировании нативных и криоконсервированных сфероидов, полученных из клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят

С.Г. Али, Г.А. Божок

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

Expression of Some Neural Markers During Subculturing of Native and Cryopreserved Spheroids Derived from Neonatal Porcine Dorsal Ganglia Root Cells

S.G. Ali, G.A. Bozhok

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

Криоконсервирование культур клеток, полученных из спинальных ганглиев (СГ), является актуальным для биомедицинских исследований. Эти культуры – ценный модельный объект для изучения механизмов сенсорного восприятия, аксонального транспорта и регенерации нервов. Они содержат мультипотентные клетки-производные нервного гребня, способные дифференцироваться в нейроны и субпопуляции глиальных клеток [RP. Singh *et al.*, 2009]. Ранее [С. Али и соавт., 2018] в клеточной культуре из СГ неонатальных поросят нами были получены сфероиды (Сф), из которых при пересеве мигрировали клетки различных морфологических типов. Однако вопрос о принадлежности их к субпопуляциям нейронов или глиальных клеток остается открытым.

Цель работы – определение экспрессии β -III-тубулина, глутаминсинтетазы и S-100 при субкультивировании нативных и криоконсервированных сфероидов, полученных в первичной культуре клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят.

Клеточную суспензию, полученную ферментативным методом из СГ неонатальных поросят, высевали в концентрации $0,5 \times 10^4$ кл/мл и культивировали на среде альфа-МЕМ с 2% «Нейромакс» при 37°C и 5% CO₂. Сформировавшиеся на 8-е сутки Сф криоконсервировали в криозащитных средах на основе альфа-МЕМ и 25%-й фетальной телячьей сыворотки (ФТС), содержащих ДМСО в концентрациях 5, 7,5 и 10%. Криоконсервирование проводили по трехэтапной программе замораживания с начальной скоростью 0,5 град/мин до –20°C, далее со скоростью 1 град/мин до –80°C с последующим погружением в жидкий азот. Нативные и криоконсервированные Сф субкультивировали на среде альфа-МЕМ, обогащенной 10%-й ФТС. На 10-е сутки в культурах методом иммуноцитохимии анализировали клетки, экспрессирующие β -III-тубулин, глутаминсинтетазу (ГС) и S-100.

В культуре, полученной из нативных Сф, наблюдались крупные распластаные мультиполярные клетки (тип 1), мелкие веретеноподобные клетки с двумя небольшими отростками (тип 2), округлые или пирамидальные клетки с длинными отростками (тип 3). При этом в нативной культуре экспрессии S-100 не было обнаружено. В клетках 1 и 2 типов была выявлена экспрессия ГС (маркера сателлитных глиальных клеток), а в клетках 3 типа – β -III-тубулина (маркера нейробластов и нейронов). В культурах, полученных из криоконсервированных Сф, сохранялись все вышеописанные типы клеток и характер их окрашивания специфическими маркерами.

Таким образом, в культуре, полученной при пересеве Сф, присутствуют клетки, экспрессирующие нейральные маркеры ГС и β -III-тубулин. Криоконсервирование в использованном режиме сохраняет данные субпопуляции клеток.

Cryopreservation of cell cultures derived from dorsal root ganglia (DRG) is relevant in biomedical research. These cultures are valuable model objects for studying the mechanisms of sensory perception, axonal transport and nerve regeneration. DRG contain multipotent neural crest derived stem cells, capable to differentiate into neurons and various subpopulations of glial cells [Singh RP. *et al.*, 2009]. In previous study of cell culture [Ali C. *et al.*, 2018] we obtained the spheroids (Sph) from neonatal piglets' DRG, wherefrom after re-plating there was a migration of the cells of different morphological types. However, the question about belonging them either to the subpopulations of neurons or glial cells has remained unanswered.

The research object was to study the expression of β -III-tubulin, glutaminedeaminohydrolase and S-100 with subculturing native and cryopreserved spheroids derived from the cells of neonatal porcine dorsal root ganglia.

The cell suspension obtained from DRG of the neonatal piglets by enzymatic method was plated at a concentration of 0.5×10^4 cells/ml and cultured with alpha-MEM medium with 2% Neuromax at 37°C and 5% CO₂. The spheroids formed on day 8 were cryopreserved in the cryoprotective media based on alpha-MEM and 25% fetal bovine serum (FBS) containing cryoprotectant DMSO in the concentrations of 5%, 7.5% and 10%. Cryopreservation was performed by a three-stage freezing program with an initial cooling rate of 0.5 deg/min down to –20°C, then with cooling rate of 1 deg/min down to –80°C followed by an immersion into liquid nitrogen. Native and cryopreserved Sph were subcultured with alpha-MEM medium enriched with 10% FBS. To day 10 the expression of β -III-tubulin, glutaminedeaminohydrolase (GS) and S-100 was analyzed in native and cryopreserved cultures by means immunocytochemistry methods.

In the culture derived from native Sph, large, spreading multipolar cells (type 1), small spindle-like cells with two small processes (type 2), and round or pyramidal cells with long processes (type 3) were observed. No expression of S-100 was found in the culture derived from native Sph. Expression of GS (a marker of satellite glial cells) was detected in the cells of the 1st and 2nd types, and expression of β -III-tubulin (a marker of neuroblasts and neurons) was revealed in the cells of the 3rd type. All the types of cells described above as well as the characteristics of their staining with specific markers were present in the culture derived from cryopreserved Sph.

Thus, in the culture obtained with subculturing Sph, there were the cells expressing the neural markers GS and β -III-tubulin. Cryopreservation in the used regimen preserves these cell subpopulations.