

Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии

Е.М. Плаксина, О.С. Сидоренко, Е.И. Легач, Г.А. Божок
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Neuroblast-Like Cell Culture Derivation from Newborn Piglet Adrenal Glands Using Selective Adhesion Method

K.M. Plaksina, O.S. Sidorenko, E.I. Legach, G.A. Bozhok
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Изучение особенностей роста, пролиферации, миграции, дифференциации нейробластов в культуре *in vitro* имеет большое значение для понимания принципов формирования головного и спинного мозга в онтогенезе. Ранее нами было установлено появление нейробластоподобных клеток в культуре клеток надпочечников (ККН) новорожденных поросят, растущей с образованием цитосфер. Кроме того, в этой культуре присутствовали фибробластоподобные клетки, которые были идентифицированы как клетки соединительнотканной капсулы и коркового вещества надпочечника.

Цель данной работы – получение очищенной культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников поросят разных сроков неонатального развития методом селективной адгезии.

Клеточную суспензию получали ферментативным методом из надпочечников поросят возрастом 1, 7, 14, и 28 дней (P1, P7, P14 и P28 соответственно). Клетки культивировали на низкоадгезивной поверхности при температуре 37°C и атмосфере с 5% CO₂ в среде 199 с 10% фетальной телячьей сыворотки и антибиотиками. При этом наблюдалось образование флотирующих цитосфер. Половину культуральной среды с цитосферами переносили на адгезивную поверхность на 4, 7, 11, 14, 17, 21-е сутки культивирования. Для определения экспрессии β-III-тубулина методом иммуноцитохимии использовали первичные мышинные антитела к β-III-тубулину (1:200) и вторичные козы антимышинные HiLyte Fluor 488 – конъюгированные антитела (1:400).

Цитосферы, образовавшиеся в ККН поросят P1 после переноса на адгезивную поверхность, на 4, 7 и 11-е сутки культивирования прикреплялись, затем наблюдалось выселение из цитосфер фибробластоподобных и нейробластоподобных клеток. При этом конфлюентность монослоя составляла ~50% при переносе на 4-е, 40% – 7-е, 1,5% – 11-е сутки. При переносе на 14, 17, 21-е сутки цитосферы прикреплялись, но монослой из фибробластоподобных клеток не формировался. При переносе на 14-е сутки из цитосфер активно выселялись нейробластоподобные клетки, которые позитивно окрашивались антителами к β-III-тубулину. При переносе на 17-е сутки активно выселения этих клеток уменьшалась, а на 21-е сутки они отсутствовали. В ККН поросят P7 и P14 формировались цитосферы, при переносе которых наблюдалась тот же эффект. При переносе цитосфер, образовавшихся в ККН поросят P28, большая их часть теряла способность к прикреплению, а из тех цитосфер, которые прикреплялись, выселение клеток не наблюдалось.

Таким образом, очищенная культура нейробластоподобных клеток может быть получена при культивировании клеток надпочечников поросят 1–14-суточного возраста в течение 14 суток с последующим переносом флотирующих цитосфер на адгезивную поверхность.

Studying the features of neuroblast growth, proliferation, migration and differentiation in culture *in vitro* is of great importance to understand the principles of brain and spinal cord formation in ontogenesis. Previously we have established the fact of neuroblast-like cell appearance in newborn piglet adrenal gland cell culture (AGCC), featured with the formation of cytospheres. Moreover, this culture contained the fibroblast-like cells, identified as the cells of connective tissue capsule and adrenal cortex.

The research aim was to derive a purified culture of neuroblast-like cells from adrenal glands of piglets of different terms of neonatal development using selective adhesion method.

Cell suspension was procured with enzyme method from adrenal glands of 1-, 7-, 14- and 28-day-old piglets (P1, P7, P14 and P28, respectively). Cells were cultured on low adhesive surface at 37°C and 5% CO₂ atmosphere in medium 199 with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The formation of floating cytospheres was observed under these conditions. The half of culture medium with cytospheres was transferred to adhesive surface to days 4, 7, 11, 14, 17, 21 of culture. To determine the beta III Tubulin expression by means of immunocytochemistry method we used the beta III Tubulin primary mouse antibodies (1:200) and secondary goat anti-mouse HiLyte Fluor 488-conjugated antibodies (1:400).

The cytospheres, formed in AGCC of P1 piglets after transferring to adhesive surface were attached to days 4, 7, and 11 of culture, then the migration of fibroblast-like and neuroblast-like cells out of cytospheres was noted. The monolayer confluency was thereby ~50, 40 and 1.5% during transfer to days 4, 7 and 11, respectively. Following the transfer to days 14, 17 and 21 the cytospheres were attached, but no monolayer of fibroblast-like cells was formed. After the transfer to day 14 the neuroblast-like cells actively migrated from cytospheres, which were positively stained with beta III Tubulin antibodies. When transferring to day 17 the migration activity of these cells reduced, and after transfer to day 21 they were absent. The AGCC of P7 and P14 piglets contained the cytospheres, representing the same features following their transfer. Transferring the cytospheres formed in AGCC of P28 piglets showed that majority of the structures lost their ability to attach, and no migration was observed from the attached cytospheres.

Thus, a purified culture of neuroblast-like cells may be derived following culturing of adrenal gland cells from 1–14-day-old piglets involving the transfer of floating cytospheres to an adhesive surface.

