

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc643089>

EDN: GUONMK



Анализ нейрогенного потенциала трёхмерной культуры эксплантов спинномозговых ганглиев мыши

М.Л. Воробьев, О.А. Быстрова, М.Г. Мартынова, И.И. Суворова

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Культивирование спинномозговых ганглиев является широко используемым подходом для моделирования физиологических и патологических состояний периферической нервной системы *in vitro*. Имеющиеся литературные данные указывают на то, что постнатальные спинномозговые ганглии содержат пул глиальных стволовых клеток, которые способны дифференцироваться в нейроны после травмы. Следовательно, извлечённые спинномозговые ганглии, содержащие пул стволовых клеток, могут обладать нейрогенным потенциалом *ex vivo*. Однако в доступной литературе мы не нашли работ, исследующих сохранение регенеративного потенциала спинномозговых ганглиев *ex vivo*.

Цель. В данном исследовании мы оценили нейрогенный потенциал изолированных спинномозговых ганглиев и создали трёхмерную органотипическую культуру из этих эксплантов.

Методы. Мышечные спинномозговые ганглии, выделенные из шейного, грудного и поясничного отделов позвоночника, краткосрочно и долгосрочно культивировали в виде трёхмерной культуры в геле Geltrex. Морфологию, ультраструктуру и профиль экспрессии генов культивируемых спинномозговых ганглиев анализировали с помощью световой и электронной микроскопии, иммунофлуоресцентного окрашивания и количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Установлено, что спинномозговые ганглии, культивируемые в Geltrex в течение 14 дней, стабильно генерировали трёхмерную периганглионарную сеть, состоящую из радиально разветвлённых удлинённых клеток. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Tuj1 (нейронспецифический бета-тубулин класса III) показало, что наблюдаемые клетки были нейрональными клетками. Иммуноокрашивание антителами против O4 подтвердило, что клетки, маркированные Tuj1, не были мигрирующими Шванновскими клетками. Количественный анализ общей РНК, выделенной из культуры эксплантов спинномозговых ганглиев с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, выявил значительное увеличение матричной РНК ключевых генов, связанных с нейрогенезом, таких как *Neurog1*, *Neurog2* и *Sox2*, что указывает на активацию нейрогенной программы в культивируемых эксплантах. Световая и электронная микроскопия показали, что взрослые сенсорные нейроны дегенерировали в эксплантах спинномозговых ганглиев и не вносили вклад в периганглионарную сеть. Используя доступные конфокальные возможности, мы оценили трёхмерные параметры периганглионарной сети по двумерным микроскопическим изображениям, чтобы продемонстрировать топографию нейрональных клеток, экспрессирующих Tuj1, в культуре эксплантов спинномозговых ганглиев.

Заключение. Охарактеризована трёхмерная культура спинномозговых ганглиев. Обнаружено, что выделенные экспланты демонстрируют регенеративную способность в условиях культивирования *in vitro* и могут представлять собой новую органотипическую модель с нейрогенным потенциалом. Полученная модель может быть релевантной для изучения процессов регенерации в спинномозговых ганглиях, расширяя возможности исследований за пределами традиционных двумерных культур, получаемых из стволовых клеток.

Ключевые слова: спинномозговые ганглии; белок Tuj1; периферические нейроны; нейрогенез.

Как цитировать:

Воробьев М.Л., Быстрова О.А., Мартынова М.Г., Суворова И.И. Анализ нейрогенного потенциала трёхмерной культуры эксплантов спинномозговых ганглиев мыши // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 4. С. 325–336. DOI: 10.17816/gc643089 EDN: GUONMK

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc643089>

EDN: GUONMK

Analysis of the Neurogenic Potential of a Three-Dimensional Culture of Mouse Dorsal Root Ganglia Explants

Mikhail L. Vorobev, Olga A. Bystrova, Marina G. Martynova, Irina I. Suvorova

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Cultivation of dorsal root ganglia (DRGs) is a widely used approach for modeling physiological and pathological conditions of the peripheral nervous system *in vitro*. Existing scientific data indicates that postnatal DRGs contain a pool of glial stem cells capable of differentiating into neurons after injury. Therefore, isolated DRGs containing a stem cell pool may retain neurogenic potential *ex vivo*. However, no studies in the available scientific data have investigated the preservation of the regenerative potential of DRGs *ex vivo*.

AIM: This study aimed to evaluate the neurogenic potential of isolated DRGs and establish a three-dimensional organotypic culture from these explants.

METHODS: DRGs were isolated from the cervical, thoracic, and lumbar regions of the spine and cultured short-term and long-term as three-dimensional explants in Geltrex gel. The morphology, ultrastructure, and gene expression profile of the cultured DRGs were analyzed using light and electron microscopy, immunofluorescent staining, and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

RESULTS: DRGs cultured in Geltrex for 14 days consistently generated a three-dimensional periganglionic network composed of radially branching elongated cells. Immunofluorescent staining with Tuj1 antibodies (neuron-specific class III β -tubulin) demonstrated that the observed cells were neuronal. Immunostaining with O4 antibodies confirmed that Tuj1-positive cells were not migrating Schwann cells. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of total RNA extracted from the DRG explant cultures revealed a significant increase in mRNA levels of key neurogenesis-related genes, such as *Neurog1*, *Neurog2*, and *Sox2*, indicating activation of a neurogenic program in the cultured explants. Light and electron microscopy showed that adult sensory neurons degenerated within the DRG explants and did not contribute to the periganglionic network. Using available confocal capabilities, we evaluated three-dimensional parameters of the periganglionic network from two-dimensional microscopic images to demonstrate the topography of Tuj1-expressing neuronal cells in a DRG explant culture.

CONCLUSION: We characterized a three-dimensional culture of DRGs. Isolated explants demonstrate regenerative capacity under *in vitro* conditions. They may represent a novel organotypic model with neurogenic potential. The obtained model may be relevant for studying regenerative processes in DRGs, expanding research opportunities beyond traditional stem cell-derived models.

Keywords: dorsal root ganglia; Tuj1 protein; peripheral neurons; neurogenesis.

To cite this article:

Vorobev ML, Bystrova OA, Martynova MG, Suvorova II. Analysis of the Neurogenic Potential of a Three-Dimensional Culture of Mouse Dorsal Root Ganglia Explants. *Genes & cells*. 2025;20(4):325–336. DOI: 10.17816/gc643089 EDN: GUONMK

ОБОСНОВАНИЕ

Спинномозговые ганглии представляют собой совокупность тел сенсорных нейронов, расположенных по ходу позвоночника в межпозвонковых отверстиях и передающих сигналы со всех периферических частей тела в центральную нервную систему. Нейроны спинномозговых ганглиев имеют только один стволый аксон, который разветвляется внутри ганглия на периферическую и центральную аксональные ветви. Эта уникальная морфология нейронов спинномозговых ганглиев известна как псевдоуниполярная. Центральная ветвь в составе заднего корешка образует синапсы в заднем роге спинного мозга с нейронами в центральной нервной системе. Периферический аксон в составе спинномозгового нерва направляется от спинального ганглия на периферию для восприятия информации от рецепторов тела. В течение многих лет считалось, что в постнатальных спинномозговых ганглиях не активируется нейрогенез и, соответственно, взрослые сенсорные нейроны генерируются только во время эмбриогенеза [1–3]. Однако недавно многочисленные исследования показали, что восстановление нейронов и глиальных клеток всё-таки детектируется в постнатальных спинномозговых ганглиях (подтверждено экспериментами *in vitro* и *in vivo*) [4–10]. Эти исследования выявили, что взрослые спинномозговые ганглии содержат глиальные мультипотентные стволовые клетки, которые могут восполнять сенсорные нейроны, утрачиваемые при различных патологических состояниях. Протоколы выделения стволовых клеток из спинномозговых ганглиев и их дифференцировка в нейрональном и глиальном направлениях уже описаны в литературе [5, 6]. Из этих результатов становится очевидным, что способность спинномозговых ганглиев к активации нейрогенной программы может также сохраняться после выделения из организма, соответственно изолированные экспланты представляют собой перспективную *ex vivo* модель для изучения механизмов регенерации сенсорных нейронов.

ЦЕЛЬ

Целью данной работы стала оценка нейрогенного потенциала эксплантов спинномозговых ганглиев в качестве апробации новой органотипической модели нейрогенеза в условиях *in vitro*.

МЕТОДЫ

Выделение и культивирование спинномозговых ганглиев мыши

Мышей линии BALB/c в возрасте 3–4 мес подвергали эктаназии путём шейной дислокации. Анестезию не использовали, чтобы не повлиять на функцию ганглиев. Позвончик изолировали в соответствии с имеющимся в литературе протоколом [10]. Спинномозговые ганглии

извлекали из шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга и тщательно очищали от мозговых оболочек. Спинномозговые ганглии крестцового отдела не изолировали из-за технически затруднённой их экстракции из окружающей костной структуры. Спинномозговые ганглии в количестве от 22 до 32 выделяли от одной мыши и помещали в фосфатно-солевой буфер. Количество изолированных спинномозговых ганглиев зависело от точности разрезания позвоночника на две равные продольные части. Далее каждый спинномозговой ганглий индивидуально помещали в каплю растворимой формы базальной мембраны Geltrex™ LDEV (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) объёмом 20 мкл на одинаковом расстоянии друг от друга в чашке Петри и инкубировали при температуре 37 °C в течение 45 мин. После полимеризации Geltrex спинномозговые ганглии культивировали в среде DMEM (HiMedia, Индия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HiMedia, Индия) при температуре 37 °C в течение одного месяца.

Электронная микроскопия

Для просвечивающей электронной микроскопии изолированные ганглии фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4) в течение 1 ч при 4 °C и постфиксировали в 1% OsO₄ также в течение 1 ч, обезживали в растворах этанола повышающейся концентрации от 50 до 96% и помещали в смесь смол Epon и Araldit (Sigma-Aldrich, Германия). Подготовленные алмазным ножом на ультрамикротоме LKB (Швеция) ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца (TLC Pharmaceutical Standards, Канада) и исследовали с помощью электронного микроскопа Zeiss Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Световая микроскопия и измерение длины проекций выростов спинномозговых ганглиев

Для светооптической микроскопии были получены полутонкие срезы (5 мкм) эксплантов спинальных ганглиев, которые окрашивали метиленовым синим (HiMedia, Индия). Светооптическую микроскопию проводили с использованием микроскопа AxioVert 200M (Carl Zeiss, Германия) и цифровой камеры Leica DFC420C (Leica Microsystems, Германия) для получения изображений с разрешением 2592×1944 пикселей. Темнопольные изображения эксплантов спинальных ганглиев получали при увеличении 2,5× (объектив Plan-NEOFLUAR 2,5×/0,075; Carl Zeiss, Германия), а изображения отростков спинальных ганглиев — при увеличении 10× (Plan-NEOFLUAR 10×/0,30) в четырёх полях зрения, соответствующих условному делению ганглия на 4 равных сектора. Микрофотографии анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ [11]. Длины трёхмерных выростов спинальных ганглиев на полученных двумерных изображениях были обозначены как проекции. В каждом из четырёх секторов

измеряли длину самой длинной проекции от тёмного края экспланта, а затем вычисляли среднюю длину проекций для отдельного экспланта.

Иммунофлуоресценция

Культуру эксплантов спинномозговых ганглиев, закреплённых в Geltrex в чашке Петри со стеклянным дном, промывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 30 мин. Далее экспланты пермеабелизовали 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Германия) в течение 25 мин и инкубировали с первичными антителами к белку Tuj1 в разведении 1:300 (#T8578; Sigma-Aldrich, Германия) или к белку O4, конъюгированному с Alexa Fluor 488 (1:50) (#MAB345A4; Millipore, Германия). После связывания с антителами к Tuj1 экспланты спинномозговых ганглиев, окрашенных антителами против Tuj1, инкубировали со вторичными антителами ABflo 488 goat anti mouse (#AS037; ABclonal Technology, Китай) в разведении 1:500 в течение 1 ч. Специфичность выбранного антитела к Tuj1 была ранее подтверждена в культуре дифференцированных нейтральных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [12]. Специфичность выбранного антитела O4 подтверждена для использования в иммуноцитохимии производителем и в литературе [13]. Ядра окрашивали DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные иммунофлуоресцентные препараты фиксировали с использованием флуоресцентной монтажной среды LumiMount (#12144; Lumiprobe, Россия) и анализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus, Япония); применяли программное обеспечение Olympus FluoView (Olympus, Япония). Для получения изображений с разрешением 1024×1024 пикселей использовали 10× объектив UPlanFL N 10×/0.30 (Olympus, Япония) и лазеры с длинами волн 405 и 488 нм с последующей детекцией сигнала в диапазоне 430–470 и 500–600 нм соответственно. Для получения изображений методом Z-stack (Z-стек) проведена Z-серия из 32 оптических срезов с шагом 8,8 мкм.

Выделение РНК и количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Общую РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA (#BC032; «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя: ганглии лизировали в 1 мл реагента ExtractRNA с последующим добавлением 250 мкл 1-бром-3-хлорпропана. Для осаждения РНК в водной фазе добавляли 600 мкл изопропанола к 1 мл реагента. Осадок промывали 75% этанолом три раза, высушивали и растворяли в воде, обработанной диэтилпиракарбонатом. Концентрацию выделенной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT (#SK021; «Евроген», Россия) в 20 мкл

общего объёма с 3 мкг общей РНК, согласно протоколу производителя. 3 мкг общей РНК, 1,5 мкг случайных гексапраймеров и деионизированную воду смешивали и инкубировали при 70 °C в течение 2 мин. К раствору добавляли реакционную смесь, содержащую 4 мкл 5-кратного буфера для синтеза комплементарной ДНК, 2 мкл дитиотреитола, 2 мкл смеси dNTP, деионизированную воду и 1 мкл обратной транскриптазы MMLV. Реакцию обратной транскрипции проводили при 42 °C в течение 90 мин. Синтез останавливали нагреванием образцов до 70 °C в течение 10 мин. Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (#PK147; «Евроген», Россия). Каждая реакция состояла из 2 мкл комплементарной ДНК, 5 мкл 5× буфера qPCRmix-HS SYBR, 1 мкл прямого и обратного праймеров, 16 мкл деионизированной воды. Протокол ПЦР включал инициацию амплификации при 95 °C в течение 5 мин, за которыми следовали 40 циклов денатурации (95 °C, 30 с), отжига (60 °C, 30 с), элонгации (72 °C, 30 с). Данные порогового цикла Ct в режиме реального времени измеряли на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Праймеры для генов были подобраны в NCBI Primer-BLAST [14]. Уровни экспрессии мРНК рассчитывали относительно *Gapdh* с использованием метода $\Delta\Delta Ct$. Последовательности используемых праймеров были следующими:

- *Neurog1*, F-TCCTGCCTCCGCAGTGTGTCC, R-GTCAGAGAGTGGTGATGCCACA;
- *Neurog2*, F-AGACGGTGCAGCGCATCAAGAA, R-AGCGTCTCGATCTTCGTGAGCT;
- *Sox2*, F-AACGGCAGCTACAGCATGATGC;
- R-CGAGCTGGTATGGAGTTGTAC;
- *Gapdh*, F-GAGGTCAATGAAGGGGTCAT;
- R-GTCAACGGATTGGTCGTA.

Статистическая обработка

Полученные результаты количественной ПЦР с обратной транскрипцией анализировали с помощью программного обеспечения Prism 8 (GraphPad, США). Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Для сравнения средних значений использовали критерий Стьюдента. Оценку нормальности распределения выполняли с помощью теста Шапиро–Уилка. Статистическая значимость установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В зависимости от генетического фона у мышей имеется 30 или 31 пара спинномозговых ганглиев [15]. В настоящее время описаны различные протоколы выделения спинномозговых ганглиев мыши с последующим этапом получения монокультуры взрослых сенсорных нейронов [15–17]. Эти протоколы, как правило, используют физическую и ферментативную диссоциацию спинальных

ганглиев, что не приводит к серьёзному повреждению взрослых сенсорных нейронов и не препятствует установлению стабильных нейронных культур. Однако в случае с культивированием целых эксплантов мы наблюдали, что сам по себе процесс выделения является критическим фактором для дальнейшего культивирования спинальных ганглиев. При излишнем надавливании на ганглии в процессе изоляции из межпозвонковых отверстий их последующее культивирование сопровождалось масштабной миграцией и высоким уровнем пролиферации глиальных клеток, контаминирующих культуру эксплантов. По этой причине мы предоставили подробные инструкции этапа извлечения спинальных ганглиев из межпозвонковых отверстий, чтобы продемонстрировать, как избежать риска повреждения зоны нейронов в ганглии при выделении.

Во время хирургической процедуры каждый спинномозговой ганглий извлекали, удерживая только за периферический аксон у основания, как показано на рис. 1, *a*. Анатомически спинномозговой ганглий расположен очень близко к соединению дорсального и вентрального корешков спинномозгового нерва. Удерживая спинальный ганглий за спинномозговой нерв, можно легко удалить пинцетом аксон вентрального корешка, который не входит в состав спинального ганглия (рис. 1, *b*). Аксон дорсального корешка также был удалён пинцетом, но как часть спинального ганглия он мог быть частично сохранён в эксплантах (см. рис. 1, *b*). После очищения спинального ганглия от аксональных корешков спинномозговой нерв перерезали ниже, как показано на рис. 1, *a*.

Для создания трёхмерной модели культуры эксплантов спинномозговые ганглии, изолированные из разных областей позвоночника, были отдельно зафиксированы в полимеризованной капле Geltrex на одинаковом расстоянии друг от друга в чашке Петри. Согласно полученным данным, экспланты спинномозговых ганглиев стабильно формировали обширную периганглионарную сеть в трёхмерном матриксе Geltrex к 14-му дню культивирования (рис. 1, *c–h*). Изображения темнопольной микроскопии позволили визуализировать радиально разветвлённые выросты периганглионарной сети на фоне плотной ганглионарной структуры (см. рис. 1, *c–h*). Формирование периганглионарной сети было регулярным событием в большинстве изолированных спинномозговых ганглиев. Эффективность формирования проекций спинальных ганглиев определялась как отношение числа спинальных ганглиев с периганглионарной сетью к общему числу изолированных спинальных ганглиев, умноженному на 100, и составляло не менее 90% на мышь (из 108 выделенных ганглиев от 6 мышей у 10 эксплантов не были образованы отростки). Таким образом, только 1–2 экспланта, полученные от одной взрослой мыши, не формировали периганглионарную сеть. Измерение средней длины проекций радиально разветвлённых выростов в 18 спинномозговых ганглиях, полученных от одной мыши (общее количество мышей — шесть), показало, что периганглионарная

сеть простирается от 250 до 1000 мкм по направлению к периферической области к 14-му дню культивирования в Geltrex (рис. 1, *i*).

Формирование периганглионарной сети может быть результатом образования новых глиальных или нейрональных клеток, результатом миграции Шванновских клеток, а также результатом аксогенеза взрослых сенсорных нейронов. Чтобы фенотипировать клетки, образующие наблюдаемую периганглионарную сеть, были использованы антитела против белка Tuj1. Известно, что белок Tuj1 ограниченно экспрессируется в нейронах центральной и периферической нервной системы на различных стадиях нейрональной спецификации [18]. Согласно данным иммунофлуоресценции, детектируемая периганглионарная сеть состоит из удлинённых клеток, положительных по белку Tuj1, что указывает на нейрональный тип анализируемых клеток (рис. 2, *a*). Нейрональные клетки, меченные Tuj1, были пространственно распределены в Geltrex, образуя трёхмерную клеточную сеть. Для подтверждения того, что наблюдаемые периганглионарные клетки не являются Шванновскими клетками, были использованы антитела против поверхностного антигена O4. Маркёр O4 представляет собой сульфатированный галактоцереброзид, присутствующий на поверхности как миелинизированных, так и немиелинизированных шванновских клеток [13, 19]. На рис. 2, *b* показано, что антитела против белка O4 маркируют ганглий и его остаточный аксон, при этом периганглионарные клетки остаются неокрашенными. С целью проверки нейрогенного потенциала спинальных ганглиев, культивируемых в Geltrex в течение 14 дней, была проанализирована РНК, выделенная из культуры эксплантов спинномозговых ганглиев, для исследования экспрессии генов *Neurogenin1* (*Neurog1*), *Neurogenin2* (*Neurog2*) и *Sox2*. *Neurog1* и *Neurog2* известны как основные пронеурональные факторы транскрипции, участвующие в развитии сенсорных нейронов спинальных ганглиев. Фактор транскрипции *Sox2* является широко признанным маркёром нейральных стволовых клеток. Установлено, что *Sox2*-позитивные глиальные клетки индуцируют нейрогенез в спинномозговых ганглиях при хронической боли [7]. Полученные нами результаты показали, что экспрессия ключевых нейральных генов *Neurog1*, *Neurog2* и *Sox2* значительно увеличена в культуре эксплантов спинальных ганглиев, генерирующих периганглионарную сеть в Geltrex (рис. 2, *c*).

Как видно на изображениях конфокальной микроскопии (см. рис. 2, *a*, *b*), периганглионарная сеть представляет собой трёхмерную ветвящуюся структуру из нейрональных клеток, маркированных Tuj1. Для надлежащей визуализации наблюдаемой трёхмерной клеточной архитектуры и определения пространственной ориентации отростков Tuj1-позитивных нейрональных клеток с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была получена серия горизонтальных оптических срезов, также называемая Z-стеком (рис. 3). Для анализа

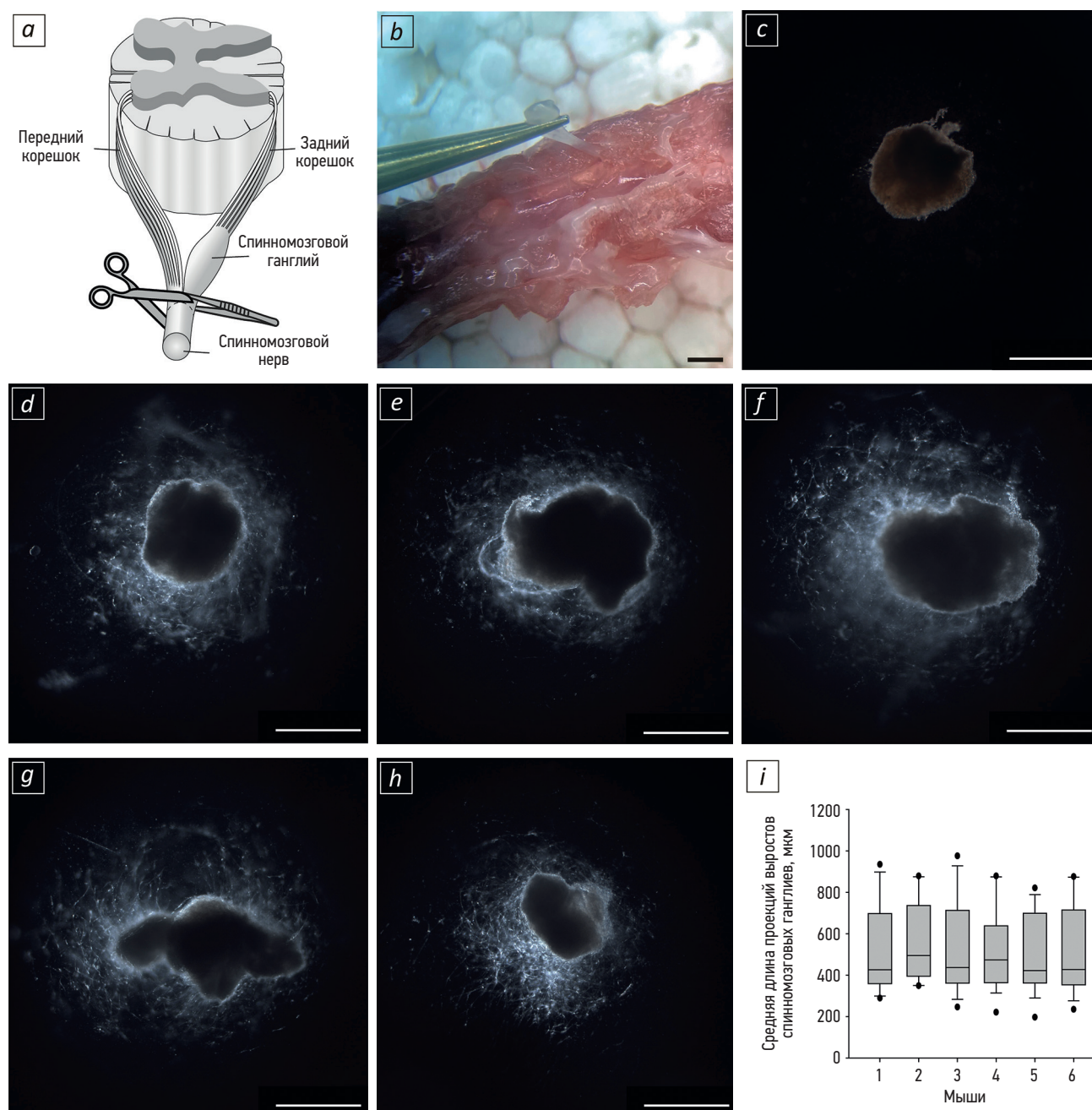


Рис. 1. Изолированные спинномозговые ганглии формируют периганглионарную сеть при культивировании в трёхмерных условиях Geltrex: *a* — схематическое изображение области лигирования спинномозгового ганглия при выделении; *b* — репрезентативный ганглий, очищенный от спинномозговых оболочек и аксонов, удерживается у основания спинномозгового нерва пинцетом; *c* — визуализация живого ганглия, культивируемого в течение 2 дней в Geltrex; *d–h* — визуализация живых ганглиев, культивируемых в течение 14 дней в Geltrex; внешний вид периганглионарной сети показан с помощью темнопольного микроскопа; *i* — диаграмма распределения средней длины проекций выростов спинномозговых ганглиев. Представлены медианы средних значений, посчитанных для каждого экспланта.

Fig. 1. Isolated dorsal root ganglia (DRG) forming a periganglionic network under three-dimensional Geltrex culture conditions: *a*, schematic representation of the ligation area of the DRG during isolation; *b*, representative ganglion, cleared of meninges and axons, held at the base of the spinal nerve with forceps; scale bar 1 mm; *c*, live explant visualized after 2 days of culture in Geltrex; scale bar 700 μm; *d–h*, live explant visualized after 14 days of culture in Geltrex; the periganglionic network by dark-field microscopy; scale bar 700 μm; *i*, diagram of the distribution of the mean projection length of DRG outgrowths. Medians of mean values calculated for each explant are shown.

и визуализации выбраны две случайные периферические области периганглионарной сети из культуры эксплантов спинальных ганглиев (рис. 3, *a*, *b*). Репрезентативные Z-стеки этих двух областей периганглионарной сети показали, что клетки, экспрессирующие Tuj1, образовывали как «сеть», так и «узлы», причём узел пространственно

располагался над сетью. Z-серия, представленная как двумерная Z-проекция, не даёт представления о топографии клеток, демонстрируя ориентацию сети и узлов в одной плоскости. По этой причине были получены ортогональные изображения двух анализируемых областей периганглионарной сети (рис. 3, *c*, *d*). Обнаружено,

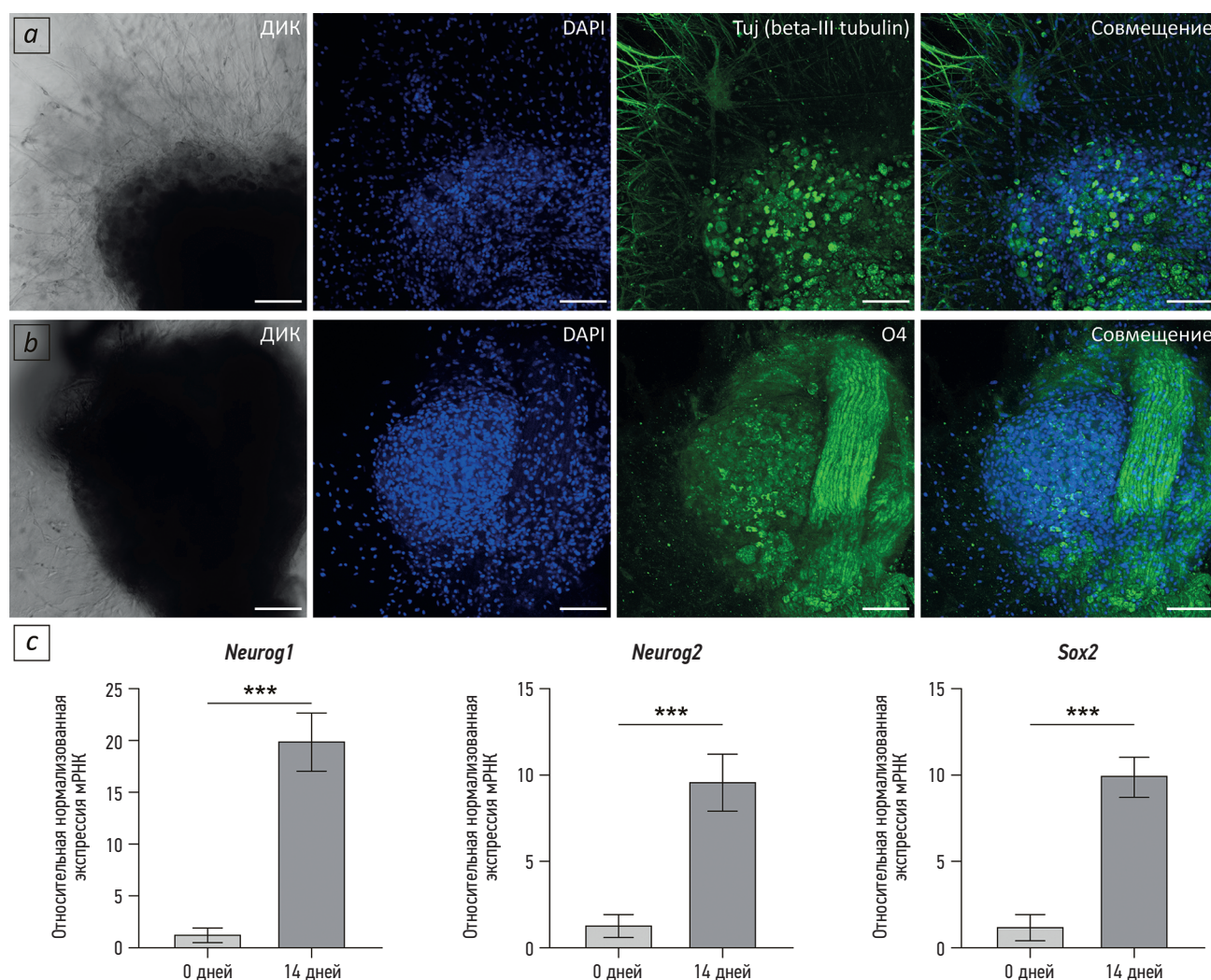


Рис. 2. Анализ нейрогенных маркёров в культуре эксплантов спинномозговых ганглиев: *a* — окрашивание антителами Tuj1 (зелёный); *b* — окрашивание антителами O4 (зелёный) спинальных ганглиев после 14 дней культивирования в Geltrex; ядра окрашены DAPI (синий); иммунофлуоресцентные изображения представлены в виде Z-проекции 32 оптических срезов с шагом 8,8 мкм; в проходящем свете клетки визуализировались с помощью дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии (ДИК); бар 100 мкм; *c* — относительная экспрессия мРНК генов *Neurog1*, *Neurog2* и *Sox2* в нативных эксплантах и эксплантах, культивируемых в течение 14 дней в Geltrex. Данные нормализованы по экспрессии *Gapdh* и представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, три независимые полимеразные цепные реакции (ПЦР), четыре технические повторности для каждой ПЦР; *** $p \leq 0,001$.

Fig. 2. Analysis of neurogenic markers in a dorsal root ganglia (DRG) explant culture: *a*, immunostaining with Tuj1 antibodies (green); *b*, immunostaining with O4 antibodies (green) of DRGs after 14 days of culture in Geltrex; nuclei stained with DAPI (blue); immunofluorescence images shown as Z-projections of 32 optical sections at 8.8 μm intervals; cells visualized in transmitted light by differential interference contrast (DIC) microscopy; scale bar 100 μm ; *c*, relative mRNA expression of *Neurog1*, *Neurog2*, and *Sox2* in native explants and in explants cultured for 14 days in Geltrex. Data normalized to *Gapdh* expression and presented as mean \pm standard error of the mean, three independent polymerase chain reactions (PCRs), four technical replicates per PCR; *** $p \leq 0.001$.

что Tuj1-позитивные клетки разветвляются в плоскости толщиной 23 мкм, в то время как отростки клеток, экспрессирующих Tuj1, образуют восходящий узел в области сканирования 157 мкм. Сложно предположить, какие топографические сигналы послужили триггером для создания наблюдаемых узлов из нейрональных клеток.

Наблюдаемая периганглионарная сеть нейрональных клеток также может быть результатом неспецифического аксоногенеза взрослых сенсорных нейронов *in vitro*, называемого нейритогенезом. Для оценки аксонального вклада взрослых сенсорных нейронов в формирование радиально-разветвлённых проекций эксплантов спинномозговых ганглиев исследовали ультраструктуру

изолированных спинальных ганглиев в условиях краткосрочного и долгосрочного культивирования в трёхмерном матриксе Geltrex. Полученные результаты показали, что нативный спинномозговой ганглий (0 дней *in vitro*) состоит из плотного кластера тел нейронов, которые окружены глиальными сателлитными клетками, образующими структурную и функциональную единицу спинального ганглия (рис. 4, *a, b*). Цитоплазма сенсорных нейронов спинальных ганглиев характеризуется обилием веществ Ниссля, которые являются специализированными органеллами, обнаруживаемыми в соме здоровых нейронов (см. рис. 4, *b*). Световая и электронная микроскопия спинномозговых ганглиев, культивируемых в Geltrex в течение

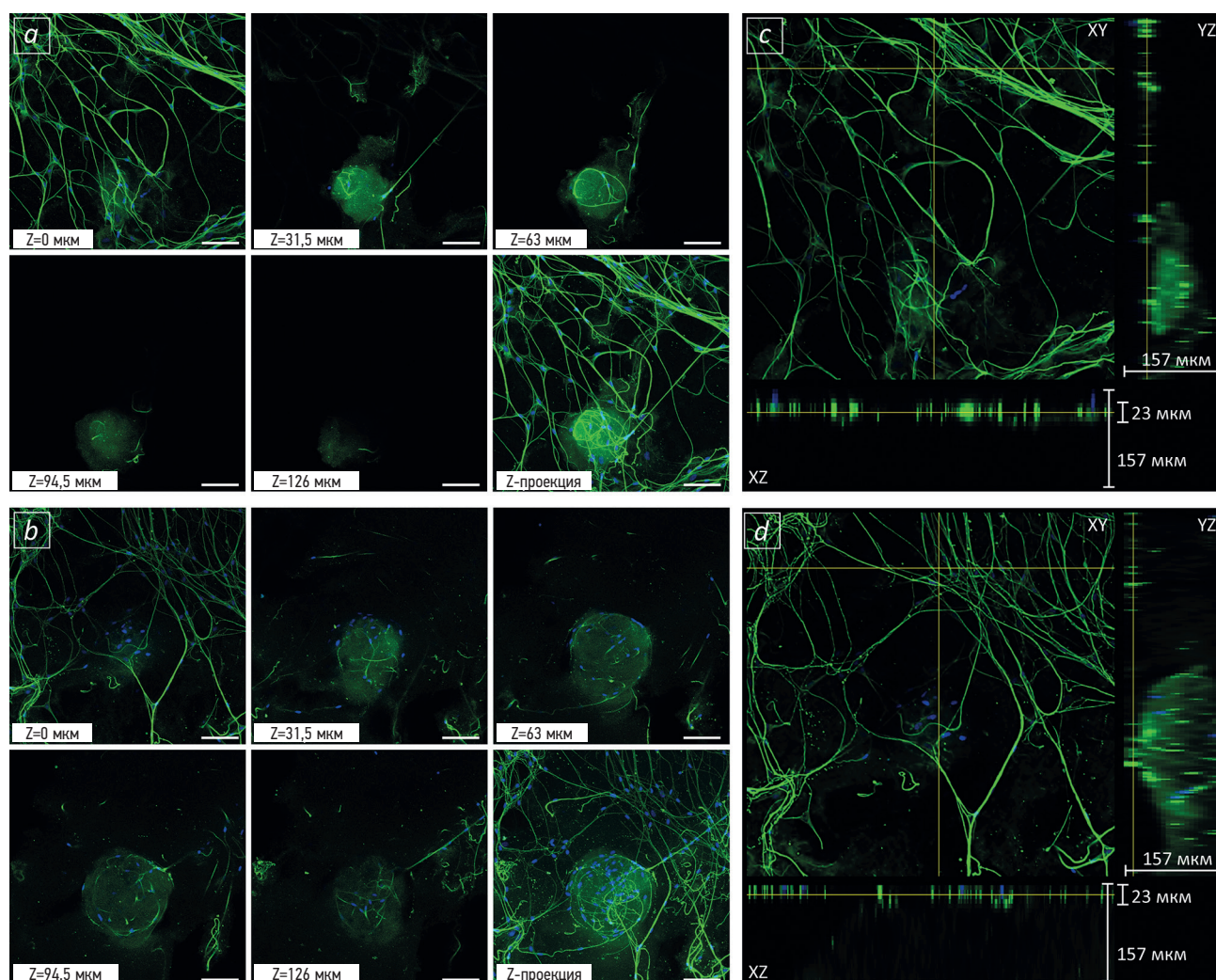


Рис. 3. Визуализация и анализ трёхмерного распределения нейрональных клеток, маркированных антителами Tuj1 (зелёный); ядра были окрашены DAPI (синий); культура эксплантов спинномозговых ганглиев после 14 дней культивирования в Geltrex (a, b); конфокальные изображения Z-стека двух выбранных областей периганглионарных сетей из двух случайных эксплантов; представлены 5 репрезентативных Z-серий из 32 оптических срезов с шагом 8,8 мкм; показаны 3D-проекции 32 изображений Z-стека тех же областей; c, d — ортогональный вид пространственного распределения нейрональных выростов, маркированных Tuj1, в Geltrex; 32 изображения Z-стека показаны с перспективы XZ и YZ; глубина сканирования составляет 157 мкм; рассчитанная толщина 23 мкм соответствует толщине Geltrex, которую занимают отростки Tuj1-позитивных нейрональных клеток. Бар 100 мкм.

Fig. 3. Visualization and analysis of the three-dimensional distribution of neuronal cells labeled with Tuj1 antibodies (green); nuclei stained with DAPI (blue); a, b, a dorsal root ganglia (DRG) explant culture after 14 days in Geltrex; confocal Z-stack images of two selected regions of periganglionic networks from two random explants; 5 representative Z-series out of 32 optical sections at 8.8 μm intervals are shown; 3D projections of 32 Z-stack images of the same regions; c, d, orthogonal views of the spatial distribution of Tuj1-labeled neuronal processes in Geltrex; 32 Z-stack images shown in XZ and YZ views; scanning depth 157 μm; the calculated thickness of 23 μm corresponds to the Geltrex volume occupied by Tuj1-positive neuronal processes. Scale bar 100 μm.

4 дней, показала, что взрослые сенсорные нейроны подвергались дегенерации в условиях *in vitro* (рис. 5, a, b). Были выявлены известные морфологические признаки, предшествующие гибели нейронов, такие как потеря телец Ниссля, деформация ядра и лизис цитоплазмы. Культивирование спинальных ганглиев в течение одного месяца в Geltrex привело к полной потере сенсорных нейронов и накоплению мелких ганглиозных клеток (рис. 6). Многочисленные мелкие мигрирующие клетки из спинального ганглия были зарегистрированы на полутонких срезах с помощью оптического микроскопа (рис. 6, c), тогда как сателлитные клетки, окутывающие сому нейрона, продолжали контактировать с умирающими нейронами

(рис. 6, b). Таким образом, установлено, что взрослые сенсорные нейроны не участвуют в генерации периганглионарной сети, которая образуется новыми нейрональными клетками.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в литературе не описано ни одной органотипической модели, рекапитулирующей нейрогенез в условиях *in vitro*. Создание нейросфер из изолированных стволовых клеток представляет собой единственный трёхмерный подход для изучения нейрогенеза взрослых сенсорных нейронов за пределами *in vivo*. Настоящая

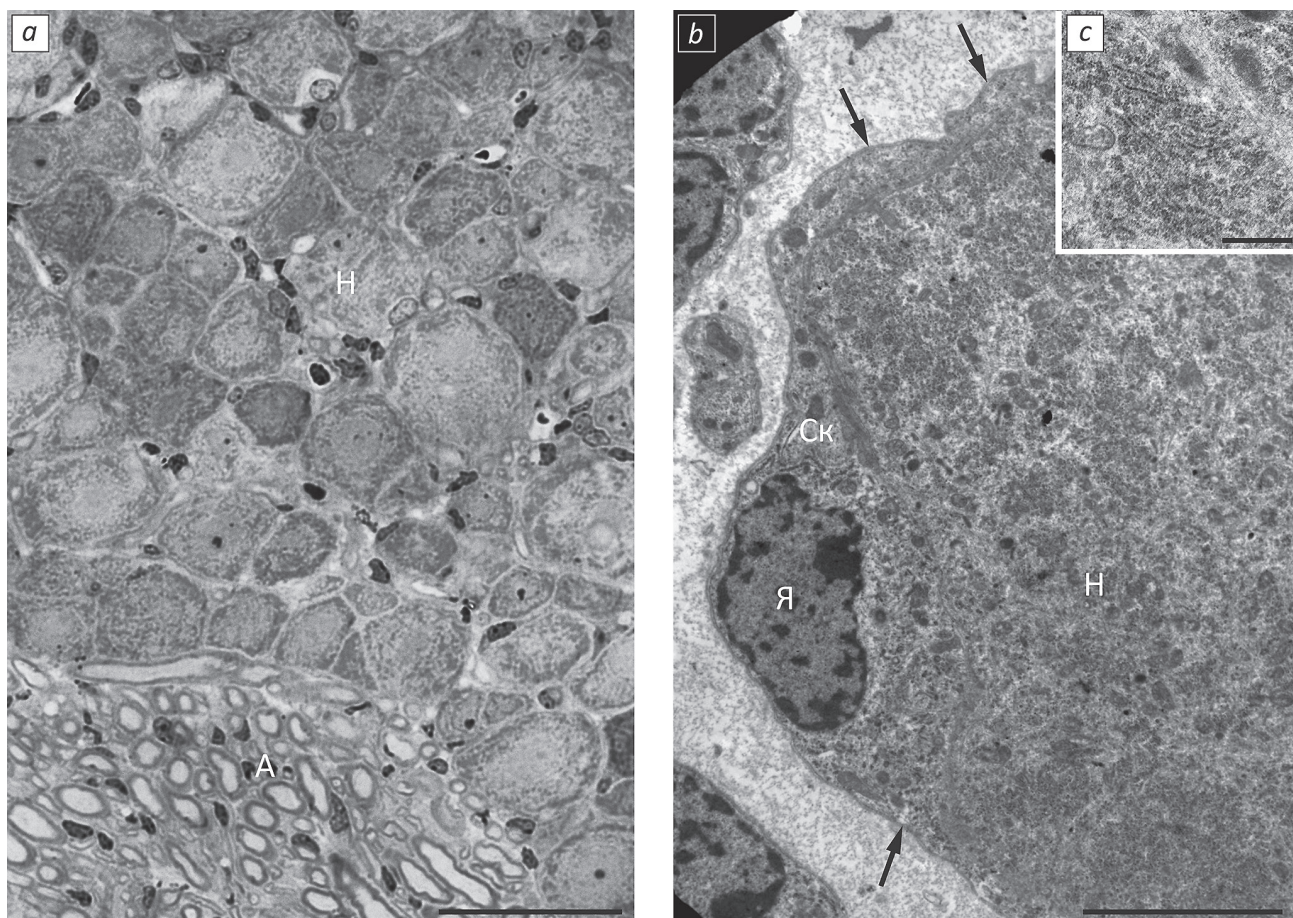


Рис. 4. Анализ морфологии и ультраструктуры экспланта спинномозгового ганглия сразу после извлечения: *a* — полутонкий срез нативного ганглия; Н — область тел нейронов, А — область аксонов; бар 50 мкм; *b* — репрезентативная электронная фотография нативного ганглия; Я — ядро, Н — нейрон, Ск — сателлитная клетка, стрелки — границы сателлитной клетки; бар 4 мкм; *c* — увеличенное изображение субстанции Ниссля; бар 0,5 мкм.

Fig. 4. Morphological and ultrastructural analysis of a dorsal root ganglia (DRG) explant immediately after isolation: *a*, semithin section of a native ganglion; Н, neuronal soma region; А, axonal region; scale bar 50 µm; *b*, representative electron micrograph of a native ganglion; Я, nucleus; Н, neuron; Ск, satellite cell; arrows, satellite cell boundaries; scale bar 4 µm; *c*, magnified image of Nissl substance; scale bar 0.5 µm.

работа является первым исследованием, сообщаящим о том, что регенерационная способность спинальных ганглиев к формированию нейрональных предшественников сохраняется в изолированных эксплантах и может быть продемонстрирована в условиях *in vitro*. Ключевыми основаниями к утверждению, что в эксплантах спинальных ганглиев индуцируется нейрогенез, стали следующие: 1) окрашивание клеток ганглия строго установленным маркером нейрональных клеток *Tuj1*, который является нейрон-специфическим бета-III тубулином и ограниченно экспрессируется в нейронах центральной и периферической нервной системы на различных стадиях нейрональной спецификации; 2) ранняя дегенерация взрослых сенсорных нейронов в культивируемых эксплантах, которая указывает на то, что *Tuj1*-положительные клетки образуются во время культивирования, формируя обширную периганглионарную сеть; 3) значительное увеличение экспрессии двух критических генов нейрогенеза взрослых сенсорных нейронов *Neurog1* и *Neurog2* в изолированных эксплантах во время культивирования. Однако полноценно утверждать, что в эксплантах спинальных ганглиев

индуцируется нейрогенез, подобно тому, как это происходит *in vivo*, в рамках настоящей работы не представляется возможным. Этот факт нуждается в дальнейшем исследовании с использованием дополнительных маркеров нейрогенеза, а также включением генетических методов исследования, например методов отслеживания судьбы клеточных клонов. Однако до сих пор попыток установить культуру эксплантов спинномозговых ганглиев для анализа нейрогенных механизмов предпринято не было, и настоящая работа вносит вклад в развитие этого направления исследований. Культивирование всего экспланта спинального ганглия позволяет сохранить исходный состав ниши стволовых клеток, которые воспроизводят нейрогенную программу *ex vivo*. По этой причине цель настоящей работы заключалась в установлении трёхмерной культуры эксплантов с нейрогенным потенциалом и описанием её как перспективной модельной системы (в сравнении с двумерными культурами) для изучения нейрогенеза *in vitro*.

В настоящей работе изолированные спинномозговые ганглии культивировались в среде DMEM, дополненной

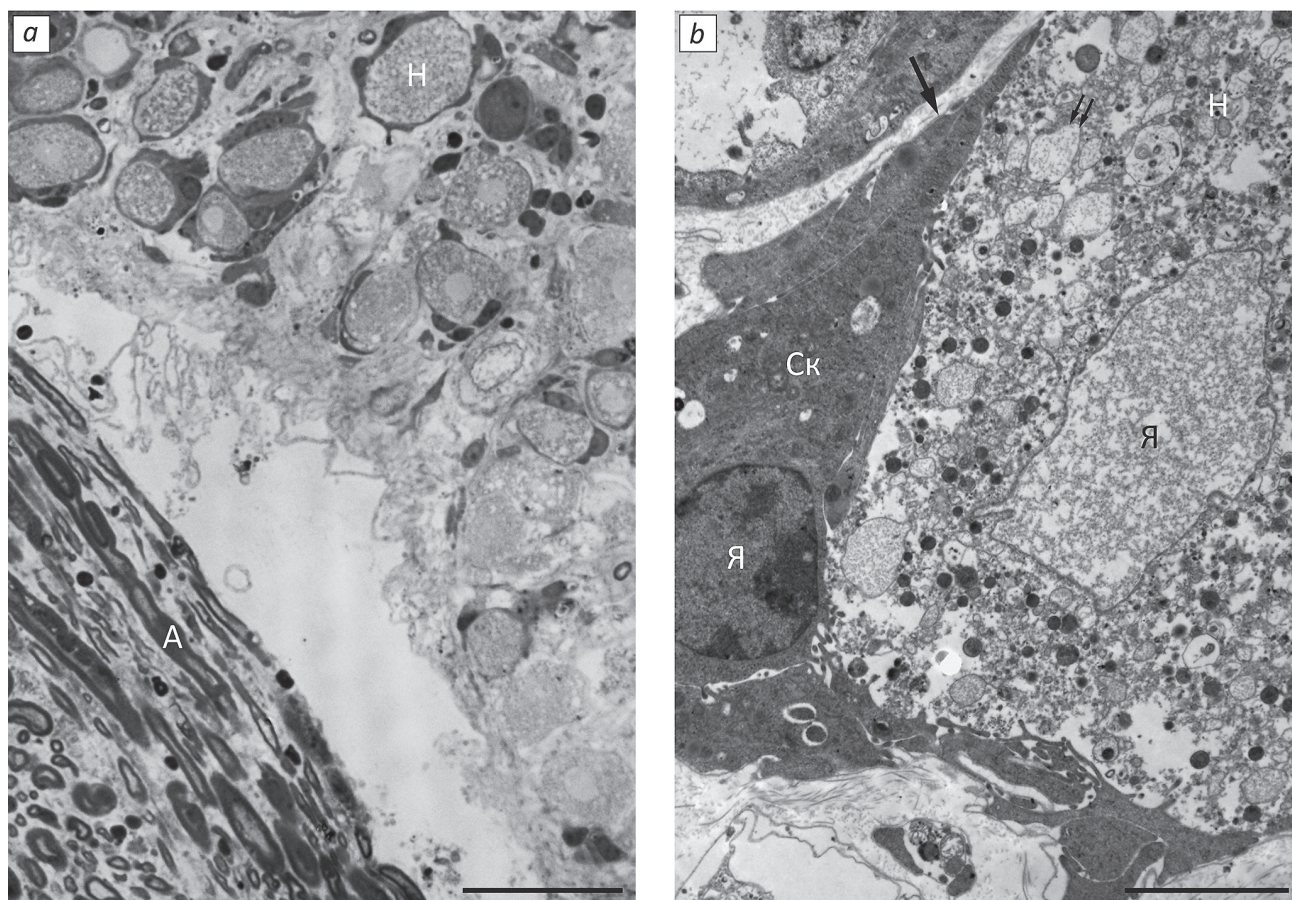


Рис. 5. Анализ морфологии и ультраструктуры экспланта спинномозгового ганглия после 4 сут культивирования в Geltrex: *a* — полутонкий срез; Н — область тел нейронов, А — область аксонов; бар 50 мкм; *b* — репрезентативная электронная фотография спинномозгового ганглия; Я — ядро, Н — тело нейрона, Ск — тело сателлитной клетки, одинарная стрелка — границы сателлитных клеток, двойные стрелки — вещества Ниссля; бар 4 мкм.

Fig. 5. Morphological and ultrastructural analysis of a dorsal root ganglia (DRG) explant after 4 days of culture in Geltrex: *a*, semithin section; Я, neuronal soma region, А, axonal region; scale bar 50 μ m; *b*, representative electron micrograph of a DRG; Я, nucleus; Н, neuronal soma; Ск, satellite cell body; single arrow, satellite cell boundaries; double arrows, Nissl substance; scale bar 4 μ m.

фетальной сывороткой, что обеспечивало подходящие условия активации нейрогенной программы в эксплантах, выделенных из разных областей спинного мозга. Однако в культивируемых эксплантах спинномозговых ганглиев наблюдалась деградация взрослых сенсорных нейронов. С одной стороны, наблюдаемая гибель может быть ограничением представленной модели клеточной культуры, связанным с отсутствием специфических нейротрофических факторов, необходимых для жизнеспособности нейронов, и присутствием сыворотки в среде. Спинномозговые ганглии, как правило, культивируют в бессывороточной нейробазальной среде, дополненной нейротрофическими факторами, которые способствуют жизнеспособности нейронов [16]. С другой стороны, гибель нейронов может быть триггером для генерации *Tuj1*-положительных предшественников в эксплантах спинальных ганглиев и составляет основное ядро этой модели. Таким образом, дальнейшие исследования представленной трёхмерной модели культуры эксплантов спинномозговых ганглиев с нейрогенным потенциалом могут дать новое понимание

механизмов нейрогенеза в постнатальных спинномозговых ганглиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы впервые разработана трёхмерная модель эксплантов спинномозговых ганглиев мыши с нейрогенным потенциалом. С использованием ключевых нейрональных и глиальных маркёров продемонстрировано органотипическое свойство спинномозговых ганглиев генерировать новые нейрональные клетки. Подробно охарактеризована периганглионарная сеть, состоящая из *Tuj1*-меченых нейрональных клеток (для этого использовали доступные конфокальные возможности). Обнаружено также ограничение предложенной модели эксплантов спинномозговых ганглиев — индукция гибели взрослых нейронов. Однако деградация нейронов может быть мощным фактором для инициации нейрогенной программы в спинномозговых ганглиях. По этой причине указанная модель *in vitro* нуждается в дальнейших подробных исследованиях.

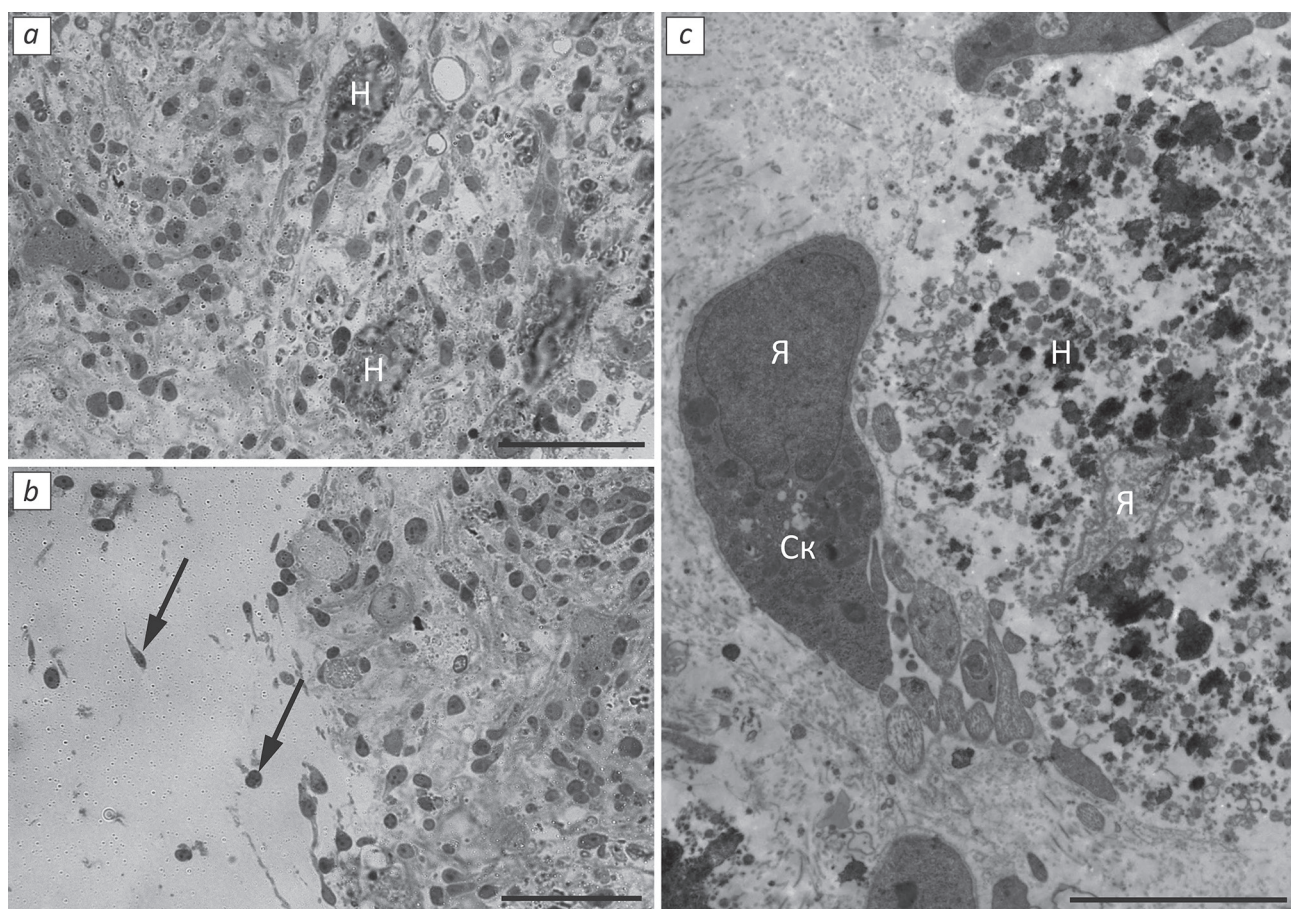


Рис. 6. Анализ морфологии и ультраструктуры спинномозгового ганглия через месяц 3-мерного культивирования в Geltrex: *a* — полутонкий срез; Н — тело нейрона; бар 50 мкм; *b* — полутонкий срез; длинные стрелки — мигрирующие мелкие глиальные клетки; бар 50 мкм; *c* — репрезентативная электронная фотография спинномозгового ганглия; Я — ядро, Н — тело нейрона, Ск — тело сателлитной клетки; бар 4 мкм.

Fig. 6. Morphological and ultrastructural analysis of a dorsal root ganglia (DRG) explant after 1 month of three-dimensional culture in Geltrex: *a*, semithin section; Н, neuronal soma; scale bar 50 µm; *b*, semithin section; long arrows, migrating small glial cells; scale bar 50 µm; *c*, representative electron micrograph of a DRG; Я, nucleus; Н, neuronal soma; Ск, satellite cell body; scale bar 4 µm.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. И.И. Суворова — экспериментальные процедуры, анализ данных, написание текста; М.Л. Воробьев — анализ данных, оформление рисунков и редактирование статьи; О.А. Быстрова — экспериментальные процедуры и анализ данных; М.Г. Мартынова — экспериментальные процедуры и анализ данных. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Все эксперименты *in vivo* одобрены этическим комитетом по содержанию и использованию животных Института цитологии РАН (протокол № 22/23 от 20.12.2023).

Согласие на публикацию. Неприменимо.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-25-10017 и гранта Санкт-Петербургского научного фонда № 23-25-10017.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, один член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: I.I. Suvorova: investigation, formal analysis, writing—original draft; M.L. Vorobev: formal analysis, visualization, writing—review & editing; O.A. Byistrova: investigation, formal analysis; M.G. Martynova: investigation, formal analysis. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: All *in vivo* experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences (protocol No. 22/23, December 20, 2023).

Consent for publication: Not applicable.

Funding sources: This study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-10017) and the St. Petersburg Science Foundation (grant No. 23-25-10017).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: All data obtained in this study are available in this article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two external reviewers, one member of the Editorial Board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. La Forte RA, Melville S, Chung K, Coggeshall RE. Absence of neurogenesis of adult rat dorsal root ganglion cells. *Somatosens Mot Res.* 1991;8(1):3–7. doi: 10.3109/08990229109144723
2. Pover CM, Barnes MC, Coggeshall RE. Do primary afferent cell numbers change in relation to increasing weight and surface area in adult rats? *Somatosens Mot Res.* 1994;11(2):163–167. doi: 10.3109/08990229409028869
3. Mohammed HA, Santer RM. Total neuronal numbers of rat lumbosacral primary afferent neurons do not change with age. *Neurosci Lett.* 2001;304(3):149–152. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01781-5
4. Namaka MP, Sawchuk M, MacDonald SC, et al. Neurogenesis in postnatal mouse dorsal root ganglia. *Exp Neurol.* 2001;172(1):60–69. doi: 10.1006/exnr.2001.7761
5. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells.* 2007;25(8):2053–2065. doi: 10.1634/stemcells.2007-0080
6. Gu Y, Hu N, Liu J, et al. Isolation and differentiation of neural stem/progenitor cells from fetal rat dorsal root ganglia. *Sci China Life Sci.* 2010;53(9):1057–1064. doi: 10.1007/s11427-010-4053-x EDN: ZLXEDM
7. Zhang L, Xie R, Yang J, et al. Chronic pain induces nociceptive neurogenesis in dorsal root ganglia from Sox2-positive satellite cells. *Glia.* 2019;67(6):1062–1075. doi: 10.1002/glia.23588
8. Hu H, Ding Y, Mu W, et al. DRG-derived neural progenitors differentiate into functional enteric neurons following transplantation in the postnatal colon. *Cell Transplant.* 2019;28(2):157–169. doi: 10.1177/0963689718811061
9. Maniglier M, Vidal M, Bachelin C, et al. Satellite glia of the adult dorsal root ganglia harbor stem cells that yield glia under physiological conditions and neurons in response to injury. *Stem Cell Reports.* 2022;17(11):2467–2483. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.10.002 EDN: ZKGYXS
10. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, et al. Generation of new neurons in dorsal root ganglia in adult rats after peripheral nerve crush

injury. *Neural Plast.* 2015;2015:860546. doi: 10.1155/2015/860546 EDN: URBHLN

11. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089

12. Lorenz MR, Brazill JM, Beeve AT, et al. A Neuroskeletal Atlas: spatial mapping and contextualization of axon subtypes innervating the long bones of C3H and B6 mice. *J Bone Miner Res.* 2021;36(5):1012–1025. doi: 10.1002/jbmr.4273 EDN: RPGXWP

13. Stratton JA, Holmes A, Rosin NL, et al. Macrophages regulate schwann cell maturation after nerve injury. *Cell Rep.* 2018;24(10):2561–2572.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.004 EDN: YKHKOD

14. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134 EDN: NWQKWQ

15. Sleigh JN, Weir GA, Schiavo G. A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Res Notes.* 2016;9:82. doi: 10.1186/s13104-016-1915-8 EDN: CGDMZD

16. Klimovich P, Rubina K, Sysoeva V, et al. Three-dimensional model of dorsal root ganglion explant as a method of studying neurotrophic factors in regenerative medicine. *Biomedicine.* 2020;8(3):49. doi: 10.3390/biomedicine8030049 EDN: JVLGTW

17. Perner C, Sokol CL. Protocol for dissection and culture of murine dorsal root ganglia neurons to study neuropeptide release. *STAR Protoc.* 2021;2(1):100333. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100333 EDN: MTEAEQ

18. Memberg SP, Hall AK. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J Neurobiol.* 1995;27(1):26–43. doi: 10.1002/neu.480270104

19. Mirsky R, Dubois C, Morgan L, et al. O4 and A007-sulfatide antibodies bind to embryonic Schwann cells prior to the appearance of galactocerebroside; regulation of the antigen by axon-Schwann cell signals and cyclic AMP. *Development.* 1990;109(1):105–116. doi: 10.1242/dev.109.1.105

ОБ АВТОРАХ

* **Суворова Ирина Игоревна**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-кт, д. 4;
ORCID: 0000-0001-7992-2435;
eLibrary SPIN: 7912-0574;
e-mail: irsuovorov@yandex.ru

Воробьев Михаил Леонидович;
ORCID: 0000-0002-5929-2963;
eLibrary SPIN: 8767-5228;
e-mail: mlv@incras.ru

Быстрова Ольга Алексеевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-0545-5437;
eLibrary SPIN: 1816-4676;
e-mail: o3608338@gmail.com

Мартынова Марина Георгиевна, д-р биол. наук;
ORCID: 0000-0002-0894-4095;
eLibrary SPIN: 3103-5755;
e-mail: mgmart14@mail.ru

AUTHORS' INFO

* **Irina I. Suvorova**, Cand. Sci. (Biology);
address: 4 Tikhoretsky ave, Saint Petersburg, 194064, Russia;
ORCID: 0000-0001-7992-2435;
eLibrary SPIN: 7912-0574;
e-mail: irsuovorov@yandex.ru

Mikhail L. Vorobev;
ORCID: 0000-0002-5929-2963;
eLibrary SPIN: 8767-5228;
e-mail: mlv@incras.ru

Olga A. Bystrova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-0545-5437;
eLibrary SPIN: 1816-4676;
e-mail: o3608338@gmail.com

Marina G. Martynova, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-0894-4095;
eLibrary SPIN: 3103-5755;
e-mail: mgmart14@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author