

УДК 615.361.451.014.41

*О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ

Разработан способ получения первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, которую возможно в последующем использовать для трансплантации. Исследованы морфологические особенности клеток первичной культуры на различных этапах культивирования. Показано, что в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят формируются сферические клеточные колонии и, возможно, происходят процессы клеточной дифференцировки.

Ключевые слова: *первичная культура клеток, надпочечник, сферические клеточные колонии, дифференцировка.*

Трансплантация клеток и тканей все чаще применяется при лечении заболеваний эндокринных органов, сопровождающихся гормональной недостаточностью [1]. Такой подход может являться альтернативой заместительной гормональной терапии, поскольку в организме реципиента создается пул клеток, секретирующих гормоны в зависимости от физиологического состояния организма и в соответствии с его потребностями.

При лечении первичной и вторичной гормональной надпочечниковой недостаточности доказана эффективность трансплантации клеточных и органотипических культур надпочечников [2–4]. Однако органотипическая культура надпочечных желез при длительном культивировании не проявляет пролиферативной активности, что связано с нарушением ее трофической поддержки и накоплением вредных продуктов обмена веществ. Такая культура деградирует на 5–70-е сутки культивирования. В связи с этим актуальной является проблема получения первичной культуры клеток (ПКК) надпочечников и разработки метода ее длительного хранения. Культивирование клеток в виде монослоя позволяет хранить биологический материал до момента трансплантации длительное время. Кроме того, путем множественных пассажей можно в несколько раз увеличить количество клеток, а также произвести их дифференцировку в определенном направлении.

Наиболее перспективными донорами тканей и клеток для трансплантации человеку являются свиньи. При этом предпочтительнее получать биологический материал от новорожденных животных, поскольку он содержит большее количество прогениторных клеток, а также обладает меньшей иммуногенностью, чем клетки и ткани взрослых животных. Кроме того, клетки новорожденных животных более устойчивы к действию ишемии, что позволяет снизить потери ценного материала в процессе его получения. На сегодняшний день нет данных об особенностях получения и культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят, поэтому, учитывая потенциальную возможность использования этих клеток в клинической практике, проблема их культивирования остается актуальной.

Первичные культуры клеток надпочечников применяются главным образом для изучения их гормонопродуцирующей активности *in vitro* при длительном культивировании, а также *in vivo* при трансплантации. Однако в последнее время все больше внимания уделяется изучению клеточного состава надпочечных желез, особенно активно исследуются свойства стволовых/прогениторных клеток коры и мозгового вещества и их способность к дифференцировке *in vitro* [5–7].

Целью работы была разработка способа получения первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, при-

© О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, 2011

годной для трансплантации, и анализ ее морфологических особенностей.

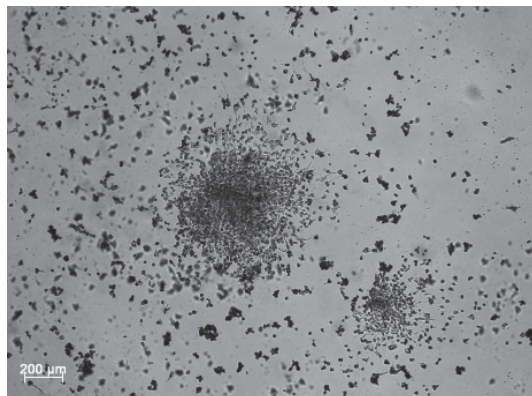
Материал и методы. Для получения клеток надпочечников использовались новорожденные поросята пород крупная белая и украинская мясная, доставленные с Агрокомплекса «Слобожанский» Харьковской области, Чугуевского района, с. Граково.

Надпочечные железы после выделения помещали в среду 199 либо DMEM/F12 (Sigma), измельчали на фрагменты размером приблизительно 1 мм³, которые затем подвергали ферментативной обработке коллагеназой IA (1 мг/мл) и деоксирибонуклеазой (0,10–0,15 мг/мл). Полученные клетки отмывали от ферментов и подсчитывали жизнеспособность клеток с помощью окрашивания трипановым синим. При получении клеток по данной методике жизнеспособность составляла 80–90 %.

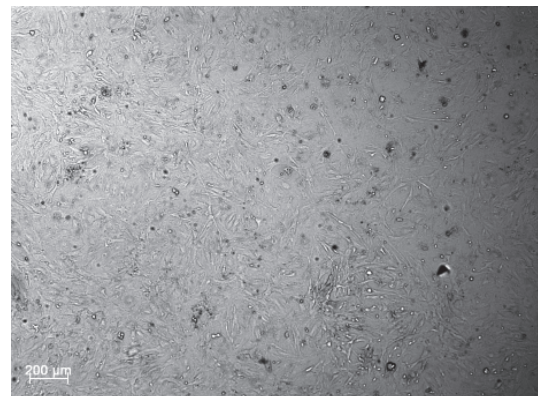
Клетки культивировали во флаконах и 24-луночных планшетах (Sarstedt) при температуре 37 °C и в атмосфере 5 % CO₂. Питательные среды были приготовлены на основе сред 199 либо DMEM/F12, в которые дополнительно добавляли 10 % эмбрио-

нальной телячьей сыворотки, гентамицин (40 мкг/мл) и амфотерицин (5 мкг/мл). Концентрация клеток составляла (1–3)·10⁶ клеток/мл при культивировании во флаконах и (1–3)·10⁵ клеток/мл при культивировании на планшете. Через сутки культивирования производили замену среды, удаляя при этом мертвые и неприкрепившиеся клетки. В дальнейшем замену питательной среды производили каждые 3–4 суток. Клетки, фиксированные в 4 % растворе параформальдегида, окрашивали гематоксилином и эозином. Микрофотосъемку осуществляли с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z.

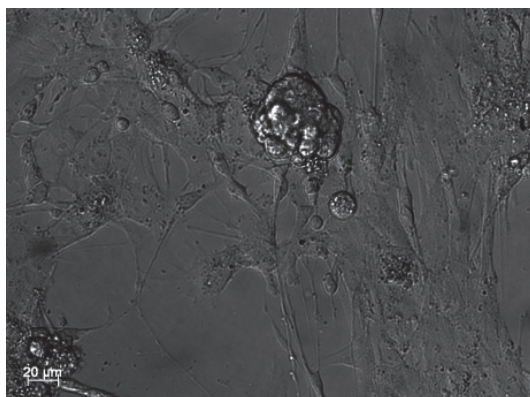
Результаты и их обсуждение. После 1-х суток культивирования клетки прикреплялись к поверхности, некоторые из них распластывались (рисунок, а). Судя по морфологическим признакам, в культуре имели место крупные фибробластоподобные клетки, а также небольшие округлые гормонопродуцирующие клетки, содержащие характерные гранулы. К 3–4-м суткам образовывался монослой, состоящий из фибробластоподобных и веретенообразных



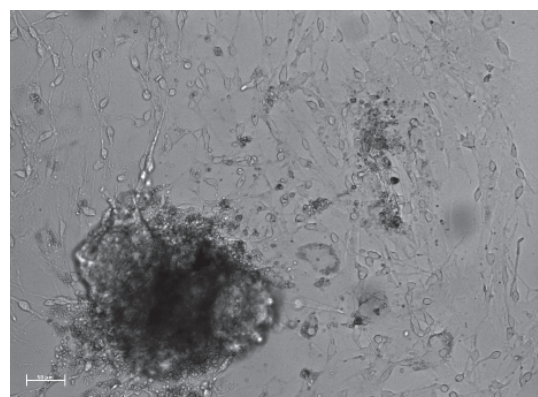
а



б



в



г

Первичная культура клеток надпочечников новорожденных поросят на различные сутки культивирования: а — 2-е сутки; б — 4-е сутки; в — 7-е сутки; г — 10-е сутки

клеток и достигающий 80 % конfluence (рисунок, б). В дальнейшем на клетках монослоя формировались многоклеточные агрегаты шарообразной формы (рисунок, в). Нами было замечено, что при дальнейшем культивировании из таких сферических колоний выселялись клетки необычной морфологии. В отличие от клеток первичного монослоя, они представляли собой относительно мелкие округлые нейроноподобные клетки с двумя длинными отростками (рисунок, г).

Поскольку для получения клеток использовался целый орган, изначально первичная культура была неоднородна по своему клеточному составу и могла содержать гормонопродуцирующие клетки коры и мозгового вещества надпочечников, а также нервные, эндотелиальные и соединительнотканые клетки. Однако к 3-м суткам культивирования монослой состоял в основном из фибробластоподобных клеток, а округлые гранулярные клетки (являющиеся скорее всего гормонопродуцирующими) из первичной культуры исчезли. Это может быть связано с тем, что дифференцированные гормонопродуцирующие клетки не способны к пролиферации и имеют ограниченное время существования. В то же время интенсивно пролиферирующие фибробласты приводят к быстрому истощению среды, конкурируя за питательные вещества с остальными типами клеток.

В последнее время особый интерес у исследователей вызывает изучение недифференцированных клеток надпочечников. Такие клетки поддерживают клеточный состав и отвечают за зональную дифференцировку коры надпочечников [6]. Недифференцированные клетки мозгового вещества надпочечников рассматриваются как источник материала для трансплантаций при лечении нейродегенеративных заболеваний [8–10], поскольку под влиянием определенных ростовых факторов из них могут быть получены полноценные нейроны [7, 11]. Возможности дифференцировки клеток мозгового вещества в нейрональном направлении связаны с ее эмбриональным происхождением, так как хромаффинные клетки мозгового вещества и симпатические нейроны принадлежат к клеткам симпатoadrenalовой линии и имеют общего предшественника [12, 13]. Развитие клетки-предшественника по эндокринному или нейрональному пути определяется набором специфических факторов, выделяемых клетками микро-

окружения [14]. Предположив, что в мозговом веществе надпочечников могут в недифференцированном состоянии сохраняться клетки-предшественники симпатoadrenalовой линии, ученые занимались их выделением и изучали возможности их направленной дифференцировки [7, 9, 11].

Для выделения недифференцированных клеток из общей суспензии используется метод, основанный на способности таких клеток к пролиферации в суспензионной культуре. При этом они формируют так называемые сферы — клеточные скопления шарообразной формы. Таким методом были выделены недифференцированные клетки нервной системы [15, 16], щитовидной железы [17], роговицы [18], молочной железы [19].

Показано, что в культуре клеток надпочечников быка также формируются сферические структуры-хромосферы, клетки которых под влиянием определенных ростовых факторов и гормонов дифференцируются в хромаффинные клетки, а также нейроны [7]. Так, под действием фактора роста нервов (NGF) клетки хромосфер формируют отростки, экспрессируют нейронаспецифические маркеры, а также генерируют потенциал действия, т. е. приобретают характерные свойства зрелых нейронов. При культивировании в среде с высоким содержанием глюкокортикоидов развитие нейрональных признаков тормозится и формируются хромаффинные клетки [11]. Интересно, что у млекопитающих были обнаружены клетки, одновременно экспрессирующие маркеры, характерные как для хромаффинных клеток, так и для нейронов [7, 20].

В нашем эксперименте из сферических колоний при дальнейшем культивировании выселялись клетки, морфологически отличающиеся от клеток первичного монослоя. Поскольку клеток такого типа мы не наблюдали на начальных стадиях культивирования, можно предположить, что они появились в результате дифференцировки прогениторных клеток, находящихся в культуре. Возможно, источником таких недифференцированных клеток могут быть сферические многоклеточные структуры, появляющиеся в ПКК на более поздних сроках культивирования. В связи с этим сферы, формирующиеся на монослое в нашем эксперименте, могут являться интересным объектом для исследования направленной дифференцировки клеток под действием различных ростовых факторов и требуют тщательного изучения.

Выводы

1. Разработан способ получения клеток надпочечников новорожденных поросят, а также подобраны условия для их культивирования.

2. Показана неоднородность первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, наличие морфологически отличающихся типов клеток и возможность их дифференцировки в разных направлениях.

Список литературы

1. Lee M. K. Cell transplantation for endocrine disorders / M. K. Lee, Y. H. Bae // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2000. — V. 42, № 1–2. — P. 103–120.
2. Легач Е. И. Опыт клинического использования криоконсервированной адренокортикальной ткани / Е. И. Легач // *Проблемы криобиологии.* — 2000. — № 3. — С. 85–90.
3. Adrenal cortical cell transplantation / J. C. Y. Dunn, Y. Chu, M. M. Lam [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* — 2004. — V. 39, № 12. — P. 1856–1858.
4. Transplantation of H-2Kb-transgenic adrenocortical cells in the mouse having undergone an adrenalectomy: functional and morphological aspects / H. Seeliger, M. W. Hoffmann, M. Behrend [et al.] // *Transplantation.* — 2000. — V. 69, № 8. — P. 1561–1566.
5. In search of adrenocortical stem and progenitor cells / A. C. Kim, F. M. Barlaskar, J. H. Heaton [et al.] // *Endocrine Reviews.* — 2009. — V. 30, № 3. — P. 241–263.
6. Kim A. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances / A. Kim, G.D. Hammer // *Mol. Cell Endocrinol.* — 2007. — V. 265–266. — P. 10–16.
7. Chung K. F. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla / K. F. Chung, F. Sicard, V. Vukicevic // *Stem cells.* — 2009. — V. 27. — P. 2602–2613.
8. Transplants of immunologically isolated xenogeneic chromaffin cells provide a long-term source of pain-reducing neuroactive substances / J. Sagen, H. Wang, P. A. Tresco [et al.] // *J. of Neuroscience.* — 1993. — V. 73, № 6. — P. 2415–2423.
9. Transplant of cultured neuron-like differentiated chromaffin cells in a Parkinson's disease patient. A preliminary report / R. Drucker-Colin, L. Verdugo-Diaz, C. Morgado-Valle [et al.] // *Arch. Med. Res.* — 1999. — V. 30, № 1. — P. 33–39.
10. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease / E. FernandezEspejo, J. A. Armengol, J. A. Flores [et al.] // *Brain Res. Rev.* — 2005. — V. 49, № 2. — P. 343–354.
11. Doupe A. J. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity / A. J. Doupe, S. C. Landis, P. H. Patterson // *J. of Neuroscience.* — 1985. — V. 5, № 8. — P. 2119–2142.
12. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives / K. Huber // *Developmental Biology.* — 2006. — V. 298. — P. 335–343.
13. Langley K. Molecular markers of sympathoadrenal cells / K. Langley, N. J. Grant // *Cell Tissue Res.* — 1999. — V. 298. — P. 185–206.
14. Hall B. K. Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives / B. K. Hall, S. Ekanayake // *Int. J. Dev. Biol.* — 1991. — V. 35. — P. 367–387.
15. Li H.-Y. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia / H.-Y. Li, H. M. S. Evonne, Z. Xin-Fu // *Stem cells.* — 2007. — P. 2053–2065.
16. Direct isolation of human central nervous system stem cells / N. Uchida, D. W. Buck, D. He [et al.] // *PNAS.* — 2000. — V. 97, № 26. — P. 14720–14725.
17. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes / L. Lan, D. Cui, K. Nowka [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2007. — V. 92, № 9. — P. 3681–3688.
18. Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells in vitro / S. Uchida, S. Yokoo, Y. Yanagi [et al.] // *IOVS.* — 2005. — V. 46, № 5. — P. 1620–1625.
19. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells / G. Dontu, W. M. Abdallah, J. M. Foley [et al.] // *Genes & Development.* — 2003. — V. 17. — P. 1253–1270.
20. Mammalian adrenal chromaffin cells coexpress the epinephrine-synthesizing enzyme and neuronal properties in vivo and in vitro / M. E. Ehrlich, M. Evinger, S. Regunathan [et al.] // *Dev. Biol.* — 1994. — V. 163, № 2. — P. 480–490.

О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Є.І. Легач, Т.П. Бондаренко

ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

Розроблено спосіб отримання первинної культури клітин надниркових залоз новонароджених поросят, яка в подальшому може бути використана для трансплантації. Досліджено

морфологічні особливості клітин первинної культури на різних етапах культивування. Показано, що в культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят утворюються сферичні клітинні колонії та, можливо, відбуваються процеси клітинного диференціювання.

Ключові слова: *первинна культура клітин, надниркова залоза, сферичні клітинні колонії, диференціювання.*

O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko

OBTAINING OF NEWBORN PIG ADRENAL PRIMARY CELL CULTURE

The method for obtaining of newborn pig adrenal primary cell culture, which may subsequently be used for transplantation, was developed. The morphological features of primary cell culture were investigated during different stages of plating. It was shown, that spherical cell colonies were formed within newborn pig adrenal primary cell culture, and perhaps there are processes of cell differentiation.

Key words: *primary cell culture, adrenal gland, spherical cell colonies, differentiation.*