

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

(г. Харьков)

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской темы «Структурно-функциональные свойства и пролиферативный потенциал эндокринных тканей при культивировании, криоконсервировании и трансплантации», шифр 2.2.6.64, № государственной регистрации 0111U001196.

Вступление. Способность отдельных популяций клеток надпочечников к трансдифференцировке в нейрональном направлении позволяет рассматривать их в качестве альтернативного источника трансплантационного материала при лечении различных патологий нервной системы [6, 10]. Культура клеток надпочечников (ККН) также применяется для изучения регуляции процессов нейрогенеза *in vitro*, поскольку среди адреномедуллярных клеток были обнаружены стволовые/прогениторные клетки, способные к нейрональной дифференцировке [5, 8]. Работы, ведущиеся в данном направлении, являются перспективными с точки зрения возможности использования аутологических клеток, полученных из надпочечников, для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Криоконсервирование является единственным способом долгосрочного хранения биологического материала, которое требуется как при длительной работе с тканями и клетками в лабораторных условиях, так и при их использовании для трансплантации в клинику. Однако под влиянием факторов криоконсервирования изменяются структурно-функциональные особенности замораживаемых образцов, что может существенно повлиять на поведение и свойства клеток при их последующем культивировании.

Сходство ряда физиологических и биохимических параметров организма человека и свиньи обуславливает широкое использование последней в качестве объекта исследования при моделировании различных патологий, а также предполагает вероятное сходство поведения клеток обоих видов *in vitro* [7]. Кроме того, это делает свиней наиболее перспективными донорами клеток и тканей при ксено-трансплантации человеку.

Цель исследования – провести морфологическую и иммуноцитохимическую оценку первичной культуры клеток, полученной из криоконсервированных фрагментов ткани надпочечников новорожденных поросят.

Объект и методы исследования. Источником биологического материала служили новорожденные поросята первого поколения пород крупная белая и украинская мясная, поставляемые из Агрокомплекса «Слобожанский» с. Граково, Чугуевского района, Харьковской области. Эксперименты проведены с соблюдением правил биоэтики в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и одобрены комитетом по биоэтике ИПКиК.

Надпочечные железы после выделения помещали в охлажденную среду DMEM/F12 (PAA Laboratories, Австрия), содержащую антибиотик (40 мкг/мл гентамицина, Здоров'я, Украина), и измельчали на фрагменты размером приблизительно 1 мм³, затем дважды отмывали от крови и жировой ткани средой с антибиотиком. В дальнейшем отмытые фрагменты ткани надпочечников использовали для получения клеточной суспензии, либо для криоконсервирования. Фрагменты криоконсервировали под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) в конечной концентрации 10%. Криозащитную среду готовили на основе питательной среды DMEM/F12. Для насыщения ткани криопротектором фрагменты выдерживали в криозащитной среде 20 мин при комнатной температуре. Криоконсервирование проводили в программном замораживателе Cryoson (Германия) со скоростью охлаждения 0,3°/мин до -70 °C с последующим погружением в жидкий азот. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре +40°C до исчезновения твердой фазы. После оттаивания фрагменты отмывали от ДМСО питательной средой, а затем использовали для получения суспензии клеток.

Суспензию клеток из свежевыделенных или криоконсервированных фрагментов ткани получали

ферментативным методом. Клетки дезагрегировали, используя коллагеназу I типа (Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл и дезоксирибонуклеазу (Sigma, США) в концентрации 0,1 мг/мл. Ферменты растворяли в среде DMEM/F12. Ферментативную обработку проводили в три этапа (30, 10, 10 мин) на водяной бане при 37°C и постоянном встряхивании. После ферментации полученные клетки отмывали путем центрифугирования в среде с 0,2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). Затем клетки фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Жизнеспособность полученных клеток оценивали с помощью окрашивания трипановым синим.

Клетки культивировали в пластиковых флаконах (PAA Laboratories, Австрия) на питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, PAA Laboratories, Австрия), 40 мкг/мл гентамицина, 5 мкг/мл амфотерицина В (Sigma, США) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После 1-х суток культивирования ККН ополаскивали средой с антибиотиком, удаляя при этом неприкрепившиеся и мертвые клетки, и производили замену питательной среды. В дальнейшем среду меняли каждые 3-4 суток.

Экспрессию β-III-тубулина в ККН определяли иммуноцитохимическим методом после фиксации культуры в 4%-м растворе параформальдегида. В качестве первичных антител использовали моноклональные [TU-20] анти-β-III-тубулин антитела мыши (1:500, Abcam, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали козы поликлональные FITC – конъюгированные антитела к IgG1 мыши (1:1000, Abcam, Великобритания). В качестве отрицательного контроля использовались ККН, прошедшие все этапы иммуноцитохимического окрашивания, за исключением инкубации с первичными и вторичными антителами (контроль аутофлуоресценции), а также ККН, которые не инкубировались с первичными, но инкубировались со вторичными антителами (контроль неспецифического связывания вторичных антител). В качестве положительного контроля использовали культуру клеток мозга новорожденных крыс, предоставленную сотрудником

отдела криобиохимии ИПКиК НАН Украины Сукачем Александром Николаевичем [4].

Микрофотосъемку осуществляли с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z и светооптического микроскопа Meiji Techno с цифровой камерой.

Статистическую достоверность оценивали с помощью критерия Стьюдента. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Известно, что криоконсервирование является единственным способом долгосрочного хранения биологического материала. Запас криоконсервированной ткани позволяет в любое время получить первичную

культуру клеток. Однако морфологические и функциональные особенности клеточных культур, полученных из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани, могут отличаться. Так, ранее нами было показано, что при замораживании фрагментов ткани надпочечников со скоростью охлаждения более 1°/мин нарушалась способность клеток к распластыванию на поверхности культивирования, что исключало возможность формирования монослоя и цитосфер в таких культурах [1].

В данной работе мы использовали более низкую скорость охлаждения фрагментов надпочечников – 0,3°/мин, а затем исследовали морфологию культуры клеток надпочечников, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани, в том числе возможность их нейрональной дифференцировки.

Следует отметить, что процесс криоконсервирования снижал общее количество получаемых жизнеспособных клеток. Так, из одного свежeweделенного надпочечника мы получали в среднем $4,81 \pm 2,64$ млн жизнеспособных клеток, в то время как из одного криоконсервированного надпочечника только $1,53 \pm 0,13$ млн. При помещении клеток, полученных из криоконсервированного материала, в условия культивирования мы наблюдали динамику развития, характерную для клеток, полученных из свежeweделенных фрагментов ткани: формирование фибробластоподобного монослоя, формирование цитосфер на монослое и миграцию из них клеток нейроноподобной морфологии [2]. Тенденция формировать сферические колонии (цитосферы) при культивировании характерна для стволовых/прогениторных клеток, полученных из различных тканей [3], в том числе мозгового вещества надпочечников [5,8,11], однако природа цитосфер в ККН новорожденных поросят пока остается невыясненной.

Следует отметить, что в культурах клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани, наблюдалось относительное увеличение количества цитосфер из расчета на 1 млн посаженных клеток, а также пропорциональное уменьшение их среднего диаметра (табл.).

На рис. 1 представлены микрофотографии культур клеток, полученных из свежeweделенных и криоконсервированных фрагментов ткани. Сделанные

Таблица

Характеристика цитосфер в ККН новорожденных поросят, полученных из свежeweделенных (Натив) и криоконсервированных (Крио) фрагментов ткани

	Натив	Крио
Количество цитосфер на 1 млн посаженных клеток, 15 сутки	404 ± 160	$1461 \pm 199^*$
Средний диаметр цитосфер на 15 сутки, мкм	240 ± 69	$66 \pm 24^*$
Максимальный диаметр цитосфер на 15 сутки, мкм	413	146

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с нативом, $p < 0,05$.

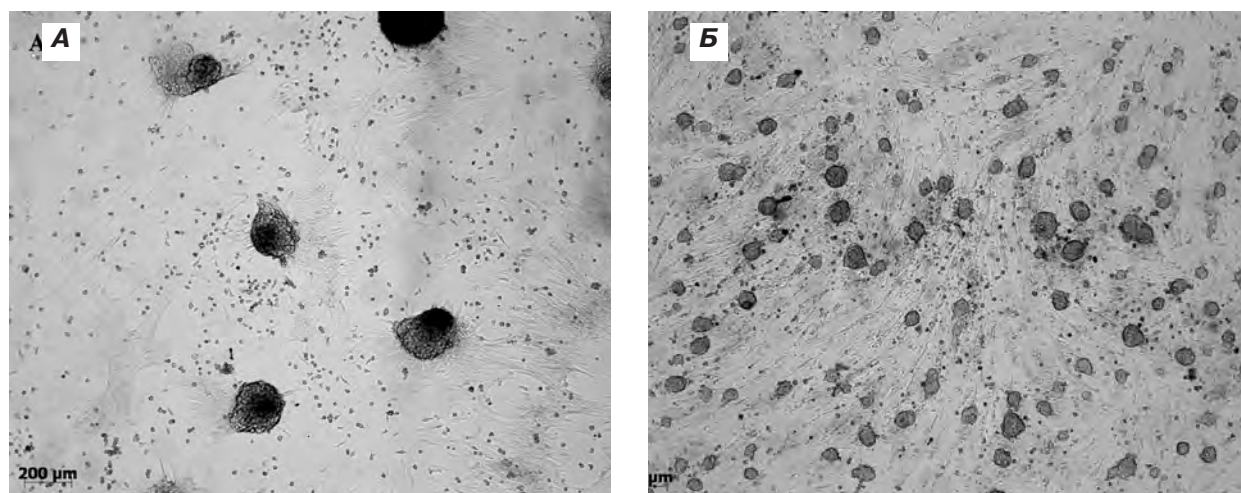


Рис. 1. Цитосферы в ККН новорожденных поросят, полученной из свежевыделенных (А) и криоконсервированных со скоростью охлаждения 0,3°/мин (Б) фрагментов ткани (15-е сутки культивирования).

при одинаковом увеличении, они наглядно демонстрируют разницу в количестве и размере цитосфер.

Очевидно, криоконсервирование фрагментов ткани надпочечников новорожденных поросят под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 0,3°/мин способствует более высокой сохранности клеток, формирующих цитосферы, по сравнению с клетками других популяций.

В ККН, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани, со временем появлялись клетки

с одним или двумя отростками, которые мигрировали из цитосфер. По морфологическим признакам данные клетки были отнесены нами к нейроноподобным [9]. Иммуноцитохимическое окрашивание выявило экспрессию β – III -тубулина в отростках клеток, выселяющихся из цитосфер, что свидетельствует об их нейрональной природе [9] (**рис. 2**).

Таким образом, криоконсервирование фрагментов надпочечников новорожденных поросят со скоростью охлаждения 0,3°/мин позволяет сохранить

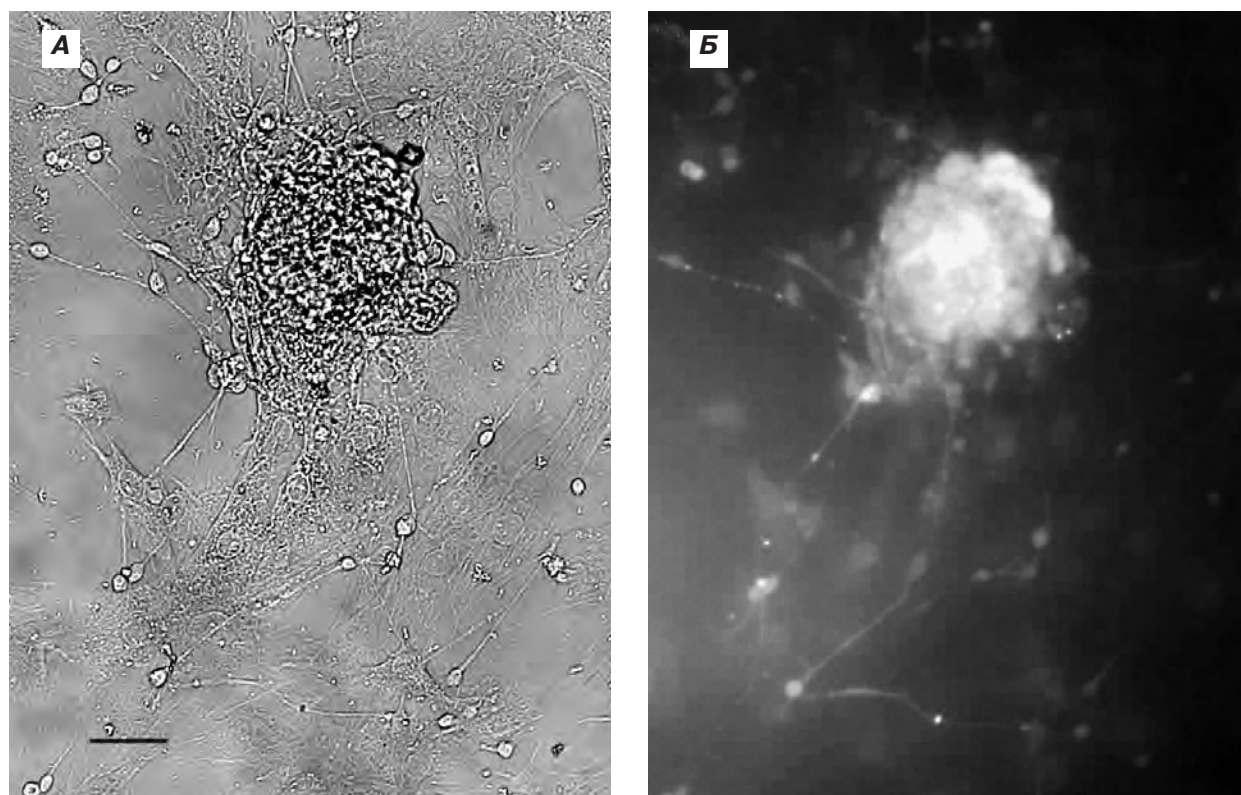


Рис. 2. Миграция β -III-тубулин-положительных нейроноподобных клеток из цитосфер в ККН, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани: А – световая микроскопия; Б – флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 50 мкм.

достаточное количество клеток, способных формировать конфлюэнтный монослой. При этом сохраняется популяция клеток, формирующих цитосферы. Не смотря на то, что в ККН, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани, цитосферы не достигают диаметра, характерного для цитосфер в ККН из нативных фрагментов, в них сохраняется популяция клеток, способных к дифференцировке в нейрональном направлении.

Выводы.

1. Установлено, что криоконсервирование фрагментов надпочечников новорожденных поросят под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 0,3°/мин позволяет сохранить популяции клеток, формирующих при культивировании монослой и цитосферы.

2. Показано, что используемый режим криоконсервирования оказывает селективный эффект,

который проявляется в увеличении количества цитосфер при культивировании.

3. При данном режиме криоконсервирования сохраняется способность клеток к спонтанной дифференцировке в клетки нейрональной морфологии, экспрессирующие β -III-тубулин.

Перспективы дальнейших исследований.

Для понимания природы и, как следствие, возможностей цитосфер, формирующихся в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят, необходимо их тщательное исследование на предмет экспрессии маркеров разных стадий клеточной дифференцировки, а также принадлежности к той или иной области надпочечника. В свою очередь решение данной задачи, возможно, позволит проводить дифференцировку в других направлениях, что значительно расширит перспективы использования ККН новорожденных поросят в экспериментальных и клинических исследованиях.

Литература

1. Сидоренко О. С. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят / О. С. Сидоренко, Г. А. Божок, Е. И. Легач, Т. М. Гурина // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 58-67.
2. Сидоренко О. С. Морфофункциональные характеристики культуры клеток надпочечников новорожденных поросят / О. С. Сидоренко, Г. А. Божок, С. Б. Билявская [и др.] // Биотехнология. – 2012. – Т. 5, № 5. – С. 72-81.
3. Сукач А. Н. Образование сферических колоний как свойство стволовых клеток / А. Н. Сукач, Э. Н. Иванов // Цитология. – 2007. – Т. 49, №11. – С. 916-922.
4. Сукач А. Н. In vitro формирование агрегатов фетальными нервными клетками человека: потенциал их использования в регенеративной медицине / А. Н. Сукач // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, №1. – С. 118-121.
5. Chung K. F. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla / K. F. Chung, F. Sicard, V. Vukicevic [et al.] // Stem cells. – 2009. – Vol. 27, №10. – P. 2602 – 2613.
6. Chung K. F. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation and differentiation of chromaffin progenitor cells / K. F. Chung, N. Qin, A. Androutsellis-Theotokis, S. R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein // Mol. Cell Endocrinol. – 2011. – Vol. 336, №1-2. – P. 141-148.
7. Lunney J. K. Advances in swine biomedical model genomics / J. K. Lunney // Int. J. Biol. Sci. – 2007. – Vol. 3, №3. – P. 179-184.
8. Santana M. M. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla / M. M. Santana, K. F. Chung, V. Vukicevic [et al.] // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – Vol. 1, № 11. – P. 783-791.
9. Svendsen C. N. Neurons from stem cells: preventing an identity crisis / C. N. Svendsen, A. Bhattacharyya, Y. T. Tai // Nat. Rev. Neurosci. – 2001. – Vol. 2, №11. – P. 831-834.
10. Yasuhara T. Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application / T. Yasuhara, I. Date. // Cell Transplant. – 2007. – Vol. 16, №2. – P. 125-132.
11. Zhou H. Cell therapy of pain: Characterization of human fetal chromaffin cells at early adrenal medulla development / H. Zhou, J. Aziza, J. C. Sol [et al.] // Exp. Neurol. – 2006. – Vol. 198, № 2. – P. 370-381.

УДК 611.451.085.23:615.014.41

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ТКАНИ

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

Резюме. Изучены культуры клеток надпочечников (ККН) новорожденных поросят, полученных из фрагментов ткани, криоконсервированных под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 0,3°/мин. В динамике развития такой ККН отмечаются этапы, характерные для культур, полученных из свежесыведенных фрагментов ткани: наблюдается формирование фибробластоподобного монослоя, затем формирование цитосфер на монослое и миграция из них клеток нейроноподобной морфологии. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было показано, что нейроноподобные клетки экспрессируют β – III – тубулин. Используемый режим криоконсервирования оказывает селективный эффект, который проявляется в увеличении количества цитосфер при культивировании.

Ключевые слова: культура клеток надпочечников, криоконсервирование, цитосферы, нейрональная дифференцировка, β – III – тубулин.

УДК 611. 451. 085. 23:615. 014. 41

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРИ КЛІТИН НАДНИРНИКІВ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ, ОТРИМАНОЇ З КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ТКАНИНИ

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

Резюме. Вивчено культури клітин наднирників (ККН) новонароджених поросят, отриманих з фрагментів тканини, кріоконсервованих під захистом 10 % ДМСО зі швидкістю охолодження 0,3°/хв. У динаміці розвитку такої ККН відзначаються етапи, характерні для культур, отриманих зі свіжовиділених фрагментів тканини: спостерігається формування фібробластоподібного моношару, потім формування цитосфер на моношарі та міграція з них клітин нейроноподібної морфології. За допомогою імуноцитохімічного аналізу було показано, що нейроноподібні клітини експресують β – III – тубулін. Режим кріоконсервування, що застосовувався, надає селективний ефект, який проявляється у збільшенні кількості цитосфер при культивуванні.

Ключові слова: культура клітин наднирників, кріоконсервування, цитосфери, нейрональна диференціація, β – III – тубулін.

UDC 611. 451. 085. 23:615. 014. 41

Characteristics of Newborn Piglets Adrenal Cell Culture Obtained from Cryopreserved Tissue Fragments

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

Abstract. Adrenal cell culture (ACC) is widely used for the study of neuronal differentiation as well as transdifferentiation. Cryopreservation as a method of long-term storage of biological material influences on the structural and functional features of the frozen samples, and can significantly affect the behavior and properties of cells during their subsequent cultivation.

Thus, we have previously shown that cryopreservation of newborn piglets adrenal tissue fragments with a cooling rate higher than 1°/min can not maintain adhesion properties of the cells. As a result, these cells do not form a monolayer and cytospheres in the culture that is typical for cells derived from unfrozen (native) tissue fragments.

In this paper the fragments were frozen with a cooling rate of 0,3°/min to -70°C, followed by plunging into the liquid nitrogen. The cryoprotective medium based in medium DMEM/F12 with 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO). After thawing and washing fragments the cell suspension was obtained by enzymatic method using collagenase and deoxyribonuclease, and cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10 % fetal calf serum.

The dynamic of ACC obtained from cryopreserved tissue fragments is similar to that of ACC obtained from freshly isolated tissue fragments: there is the formation of a fibroblast-like monolayer, followed by the formation of cytospheres on the monolayer and the migration of cells with neuron-like morphology. It should be noted that the increase of cytosphere number were observed in ACC derived from cryopreserved tissue fragments (1461 ± 199 cytospheres per 1 million cells vs. 404 ± 160 cytospheres per 1 million cells in ACC obtained from freshly isolated tissue fragments) as well as a proportional reduction of the average cytosphere diameter ($66 \pm 24 \mu\text{m}$ vs. $240 \pm 69 \mu\text{m}$ in ACC obtained from freshly isolated tissue fragments).

Despite the reduction of cytosphere diameter in ACCs derived from cryopreserved tissue fragments, they retained cell population capable of neuronal differentiation. The immunocytochemical assay has demonstrated that neuron-like cells migrating from the cytosphere express neurospecific β – III-tubulin.

Thus cryopreservation of newborn piglets adrenal tissue fragments with cooling rate of 0,3°/min in the medium with 10 % DMSO allows to preserve cells capable of forming confluent monolayer, cytospheres as well as cells capable of neuronal differentiation. Such regime of cryopreservation has a selective effect that consist in increasing of cytosphere number under cultivation.

Key words: adrenal cell culture, cryopreservation, cytosphere, neuronal differentiation, β – III- tubulin.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.

Стаття надійшла 24. 10. 2013 р.