

**ФОРМИРОВАНИЕ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ В КУЛЬТУРАХ
КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ПОРОСЯТ
РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

bozhokgaru@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Свойства криоконсервированных первичных культур клеток эндокринных желез неонатальных животных *in vitro* и *in vivo* при трансплантации», № государственной регистрации 0116U003494.

Вступление. Надпочечник состоит из коры и мозгового вещества. В эмбриогенезе клетки коры надпочечников формируются из мезодермы, тогда как клетки мозгового вещества (хромаффинные клетки) являются симпато-адреналовыми производными нервного гребня [17]. Предполагается, что некоторые производные симпато-адреналовой линии (САЛ) ответственны за возникновение нейроblastом, поскольку в большинстве случаев локализация опухоли находится в мозговом веществе надпочечников [12].

Известно, что развитие симпатической иннервации продолжается после рождения ребенка [3,9]. Частота возникновения нейроblastомы у детей первого года жизни в несколько раз выше, чем в последующей жизни [6]. Поскольку производные САЛ играют важную роль в формировании симпатической периферической нервной системы и возникновении нейроblastом, выяснение свойств клеток САЛ в неонатальном периоде является актуальным.

Проблема изучения САЛ обусловлена необходимостью подбора адекватной экспериментальной модели, т.е. выбора вида животного, близкого по нейроэндокринным характеристикам к человеку. Несмотря на удобство содержания, наличие аутбредных/инбредных линий и широкий спектр иммуноцитохимических маркеров, крысы и мыши менее подходят для этой цели, поскольку имеют значительные анатомические и физиологические отличия в надпочечниках [7,11]. Такие виды млекопитающих, как свинья, бык, обезьяна более предпочтительны для изучения надпочечников [2,14], поэтому в качестве модельного объекта нами были выбраны неонатальные поросята.

Цель исследования – изучение морфологических особенностей и пролиферативных свойств культур клеток надпочечников, полученных от поросят на разные сутки неонатального развития.

Объект и методы исследования. Надпочечники получали от поросят первого поколения гибридов пород крупная белая/ландрас и макстер/дюрок. Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одо-

бренными I Национальным конгрессом по биоэтике и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Первичную культуру клеток получали из надпочечников поросят возраста P1, P7, P14 и P30 как описано ранее [1].

Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри ($S = 9,2 \text{ см}^2$) с низкоадгезивной поверхностью. Для получения низкоадгезивной поверхности чашки обрабатывали по методу Hammarback [8]. Для культивирования использовали питательную среду DMEM/F12 с добавлением антибиотиков (200 Ед/мл бензилпенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина), амфотерицина В (5 мкг/мл), 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Посевная концентрация составляла 2,5-5x10⁵ кл/мл. Каждые 4 дня производили замену поровины объема среды.

Как было установлено в нашей предыдущей работе [1], в таких условиях формируются флотирующие мультиклеточные сфероиды (МС). На 14 сутки культивирования МС переносили в 24-луночные планшеты с нормальной адгезивной поверхностью (TPP, Швейцария) и продолжали культивировать.

Микрофотосъемку культур клеток осуществляли с помощью светооптического микроскопа AmScope, модель XYL-403 (Китай) с цифровой камерой. Морфометрический анализ проводили по микрофотографиям с использованием программы AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

Количественные данные экспериментов представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Статистическую достоверность оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение.

Применение технологий клеточного культивирования позволяет получить сведения о скорости пролиферации клеток, их метаболической активности, особенностях развития и дифференцировки. Нами была проведена сравнительная оценка параметров формирования мультиклеточных сфероидов (МС) в культурах, полученных из надпочечников поросят разного возраста.

МС образовывались при культивировании клеток надпочечников поросят всех использованных возрастов (рис. 1).

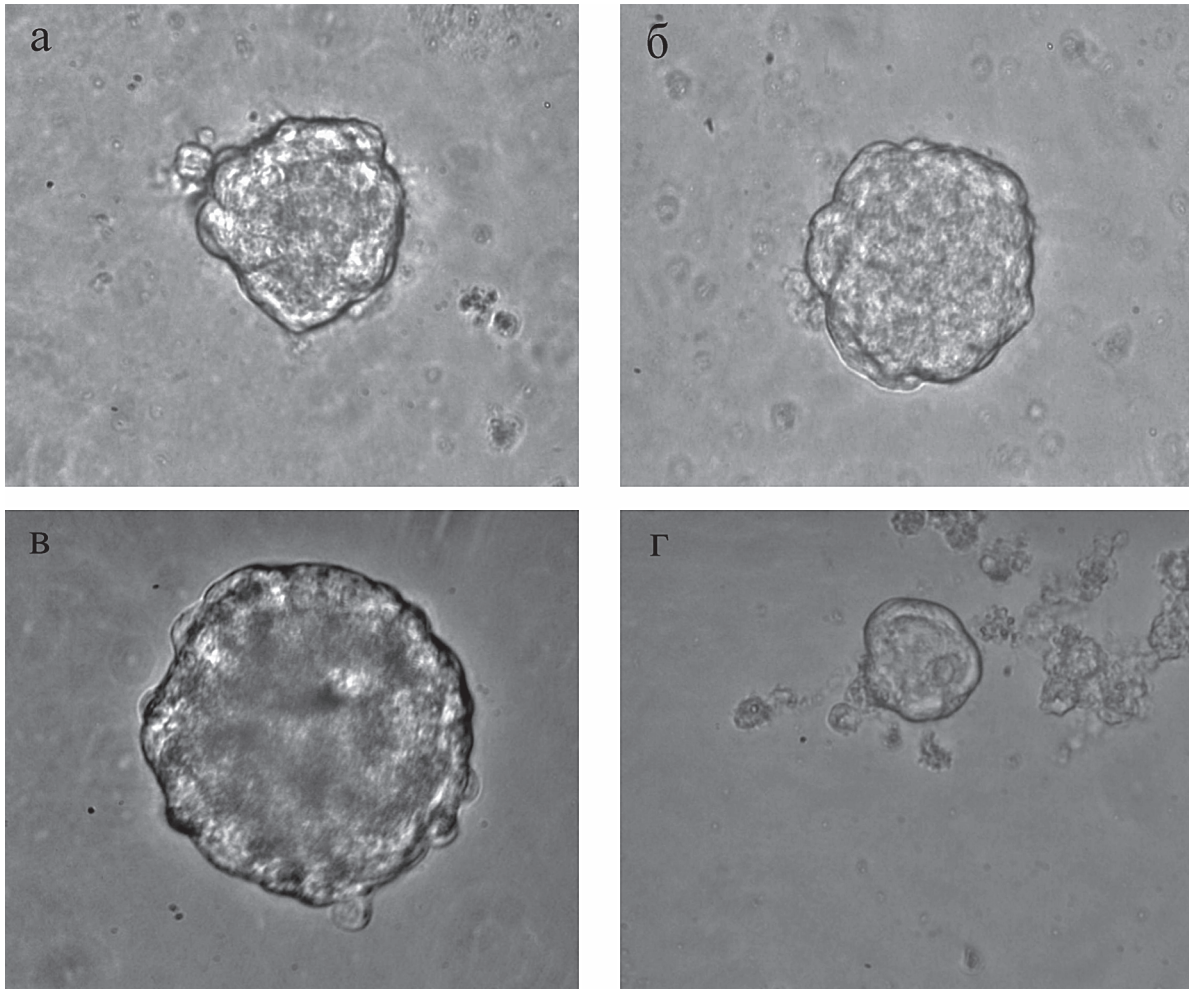


Рис. 1. Морфология МС, формирующихся в культуре надпочечников поросят в условиях объемного культивирования на 21 сутки. Культуры получены из надпочечников поросят разного возраста: А – P1, Б – P7, B – P14, Г – P30. Об.х40, ок.х10.

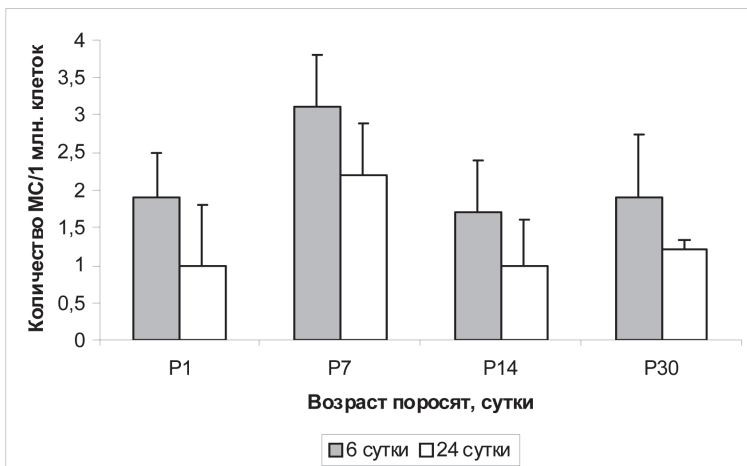


Рис. 2. Количество МС, формирующихся в культурах надпочечников поросят разного возраста на 6 и 24 сутки культивирования.

Количество МС, формирующихся в культуре надпочечников, зависело от возраста животного. На 6 сутки культивирования данный показатель был в пределах 1,7–1,9 на 1 млн. посеянных клеток в культурах клеток надпочечников животных возраста

P1, P14 и P30. Наблюдалась тенденция к увеличению сфероидобразующей способности культур клеток надпочечников поросят возраста P7 до 3,1 МС на 1 млн. посеянных клеток (рис. 2). При дальнейшем культивировании до 24 суток данная тенденция сохранялась.

Диаметр МС, полученных из надпочечников поросят возраста P1 и P7, возрастал к 24 суткам культивирования, причем в первом случае диаметр увеличивался в среднем на 20%, а во втором – на 40% (рис. 3). В культурах, полученных из надпочечников поросят возраста P14 и P30, наблюдалась иная картина: диаметр МС уменьшался к 24 суткам культивирования на 47% (для P14) и 28% (для P30) по сравнению с 6 сутками культивирования. В целом, к 24 суткам культивирования диаметр МС, образовавшихся в культурах надпочечников поросят возраста P14 и P30, был значительно меньше по сравнению с МС, полученными от более молодых животных.

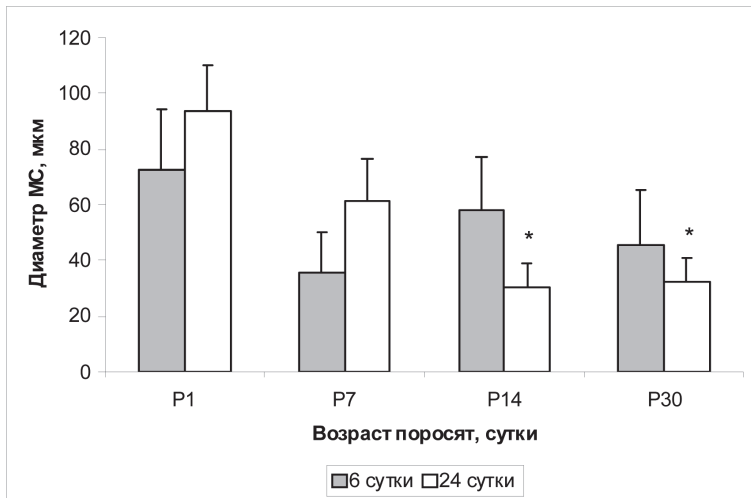


Рис. 3. Диаметр МС из надпочечников поросят разного возраста на 6 и 24 сутки культивирования.

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с P1 соответствующих суток культивирования, $p < 0,05$.

Как было показано ранее в работе Vozhok G.A. с соавт. [4], при переносе в стандартную культуральную посуду с адгезивной поверхностью МС при-

крепляются в течение нескольких часов, после чего наблюдается выселение из них нейробластоподобных клеток (НБК).

Мультиклеточные сфероиды, образовавшиеся на 14 сутки культивирования из надпочечников животных разного возраста, переносили на адгезивную поверхность. В культурах клеток, полученных из надпочечников поросят P1, МС быстро прикреплялись, из них выселялись НБК, которые к 7 суткам культивирования формировали сетеподобные разрастания, состоящие из клеток и их отростков (**рис. 4, А**).

Подобная картина наблюдалась в культурах МС, полученных от поросят возраста P7 и P14 (**рис. 4, Б, В**), хотя плотность заселения поверхности была меньше, чем в предыдущем случае. В культуре, которая была получена из надпочечников поросят возраста P30, присутствовали клетки округлой формы и клеточный детрит, но не было обнаружено НБК (**рис. 4, Г**).

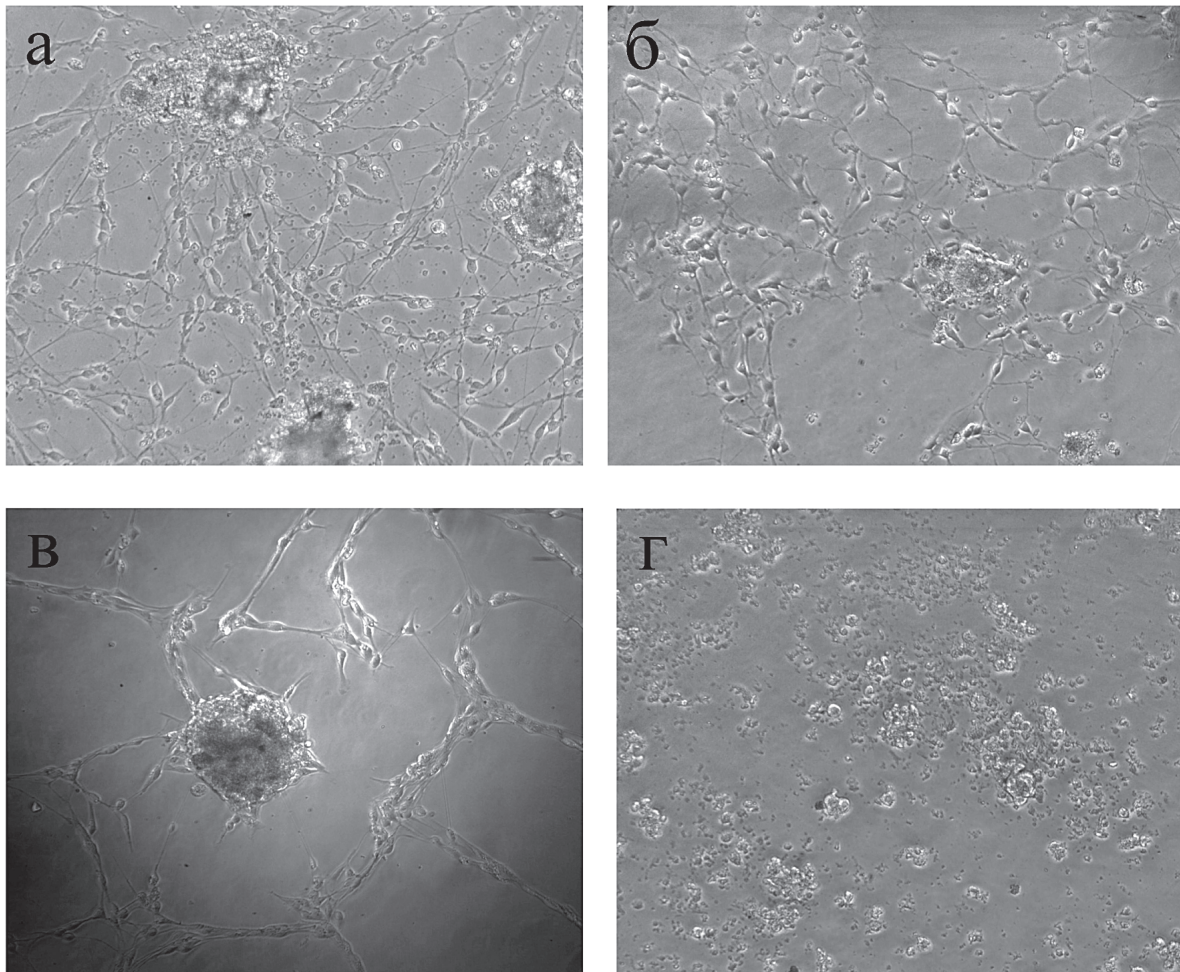


Рис. 4. Выселение НБК из МС, сформировавшихся в культурах надпочечников поросят разного возраста. Оценку выселения НБК из прикрепившихся МС проводили на 7 сутки культивирования на адгезивной поверхности. Культуры получены из МС поросят разного возраста: А – P1, Б – P7, В – P14, Г – P30. Об.х20, ок.х20.

Ранее, в работах некоторых авторов были получены МС из надпочечников разных видов животных и человека. Образование как адгезивных, так и флотирующих МС из эмбриональных надпочечников человека было отмечено в работе Zhou H. et al. [19]. Прикрепленные колонии нейроноподобных клеток, продуцирующих длинные отростки, были обнаружены в культуре надпочечников плодов человека [10]. В недавних работах [5, 15, 16] из надпочечников человека, взрослого быка и неонатальных мышей были выделены и охарактеризованы симпато-адреналовые прогениторы, организующиеся в МС и способные к нейральной дифференцировке.

В наших предыдущих исследованиях мы наблюдали образование прикрепленных либо флотирующих МС из надпочечников новорожденных поросят (1-3 сутки после рождения), которые были способны к продуцированию НБК, экспрессирующих маркер нейробластов β -III-тубулин [1, 4].

В представленном исследовании нами был получен ответ на вопрос, зависит ли феномен образования МС от возраста животного, из надпочечников которого получают культуру клеток. Оказалось, что с увеличением сроков постнатального периода количество сформированных МС значительно не изменяется, однако при долгосрочном культивировании уменьшается их диаметр. Более того, у МС, полученных из надпочечников поросят возраста P30, теряется способность к выселению НБК.

Наши результаты созвучны тем, которые были получены Saxena S. и соавт. [16] на культурах кле-

ток из надпочечников мышей 3, 15 и 30 суток после рождения. Они установили, что МС формируются только из 3-дневных надпочечников, но не 15- или 30-дневных. Это, по мнению авторов, свидетельствует о редкой популяции прогениторных клеток, которые присутствуют в надпочечниках в течение короткого постнатального периода.

В эмбриогенезе при формировании мозгового вещества надпочечников производные САЛ мигрируют из нервного гребня в область зачатка коры и впоследствии дифференцируются в хромоаффинные клетки [13, 18]. Ранее считалось, что процесс миграции прогениторных клеток САЛ завершается до рождения, однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что он захватывает и ранний неонатальный период.

Выводы. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что в первые 2 недели неонатального развития в надпочечниках поросят присутствуют симпато-адреналовые прогениторные клетки, способные в определенных условиях дифференцироваться в нейробластоподобные клетки.

Перспективы дальнейших исследований. Изучение симпато-адреналовых прогениторов, существующих в неонатальный период в надпочечниках, актуально для понимания процессов формирования зональности коры надпочечников и выяснения условий, при которых возможен сбой нормальной миграции/дифференцировки данной клеточной популяции и стимуляции вместо этого опухолевого роста в виде нейробластомы.

Литература

1. Ushakova YM, Sidorenko OS, Legach YI, Kovalenko IF, Bozhok GA. Ekspressiya β -III-tubulina v kul'ture kletok neonatal'nykh nadpocheknikov: sravnenie monoslojnogo i 3D-kul'tivirovaniya. Visnyk Kharkiv'skogo nacional'nogo universitetu imeni V.N. Karazina. Ser.: "Biologiya". 2017;28:76-86. [in Russian].
2. Abbott DH, Bird IM. Nonhuman primates as models for human adrenal androgen production: function and dysfunction. Rev Endocr Metab Disord. 2009 Mar;10(1):33-42. DOI: 10.1007/s11154-008-9099-8.
3. Borden P, Houtz J, Leach SD, Kuruvilla R. Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. Cell Rep. 2013 Jul 25;4(2):287-301. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.06.019.
4. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, Gurina TM, Sukach AN, Kholodnyy VS, et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. Cryobiology. 2016 Oct;73(2):152-61. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2016.08.006.
5. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, Hermann A, Storch A, Huttner WB, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. Stem Cells. 2009 Oct;27(10):2602-13. DOI: 10.1002/stem.180.
6. Gao RN, Levy IG, Woods WG, Coombs BA, Gaudette LA, Hill GB. Incidence and mortality of neuroblastoma in Canada compared with other childhood cancers. Cancer Causes Control. 1997 Sep;8(5):745-54.
7. Gong S, Miao YL, Jiao GZ, Sun MJ, Li H, Lin J, et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. PLoS One. 2015 Feb 20;10(2):e0117503. DOI: 10.1371/journal.pone.0117503. eCollection 2015.
8. Hammarback JA, Palm SL, Furcht LT, Letourneau PC. Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorbed laminin. J Neurosci Res. 1985;13(1-2):213-20.
9. Hasan W. Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. Organogenesis. 2013 Jul-Sep;9(3):176-93. DOI: 10.4161/org.24892.
10. Hervonen A, Hervonen H, Rechart L. Axonal growth from the primitive sympathetic elements of human fetal adrenal medulla. Experientia. 1972 Feb 15;28(2):178-9.
11. Inomata A, Sasano H. Practical approaches for evaluating adrenal toxicity in nonclinical safety assessment. J Toxicol Pathol. 2015 Jul;28(3):125-32. DOI: 10.1293/tox.2015-0025.
12. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. N Engl J Med. 2010 Jun 10;362(23):2202-11. DOI: 10.1056/NEJMra0804577.
13. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. Endocr Rev. 1997 Jun;18(3):378-403.
14. Rothschild MF, Ruvinsky A, editors. The Genetics of the pig. 2nd ed. Wallingford: CAB International; 2011. Chapter 17, Pigs as a model for biomedical sciences; p. 426-44.
15. Santana MM, Chung KF, Vukicevic V, Rosmaninho-Salgado J, Kanczkowski W, Cortez V, et al. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. Stem Cells Transl Med. 2012 Nov;1(11):783-91. DOI: 10.5966/sctm.2012-0022.

16. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, Stadel D, Braubach P, Debatin KM, et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS One*. 2013 May 10;8(5):e64454. DOI: 10.1371/journal.pone.0064454.
17. Unsicker K, Huber K, Schober A, Kalchauer C. Resolved and open issues in chromaffin cell development. *Mech Dev*. 2013 Jun-Aug;130(6-8):324-9. DOI: 10.1016/j.mod.2012.11.004.
18. Yamamoto M, Yanai R, Arishima K. Study of migration of neural crest cells to adrenal medulla by three-dimensional reconstruction. *J Vet Med Sci*. 2004 Jun;66(6):635-41.
19. Zhou H, Aziza J, Sol JC, Courtade-Saïdi M, Chatelin S, Evra C, et al. Cell therapy of pain: characterization of human fetal chromaffin cells at early adrenal medulla development. *Exp Neurol*. 2006 Apr;198(2):370-81.

ФОРМУВАННЯ МУЛЬТИКЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ В КУЛЬТУРАХ КЛІТИН НАДНИРНИКІВ ПОРОСЯТ РІЗНОГО ВІКУ

Ушакова К. М., Сидоренко О. С., Бабійчук Г. О., Бондаренко Т. П., Божок Г. А.

Резюме. У даній роботі представлена порівняльна характеристика властивостей мультиклітинних сфероїдів, отриманих в культурах клітин надниркових залоз поросят різного віку (P1, P7, P14 і P30). Результати дослідження дозволяють зробити висновок про те, що в перші 2 тижні неонатального розвитку в надниркових залозах поросят присутні симпато-адреналові прогеніторні клітини, здатні в певних умовах диференціюватися в нейробластоподібні клітини.

Ключові слова: надниркові залози, симпато-адреналові прогеніторні клітини, культивування, нейробластоподібні клітини, нейробластома.

ФОРМИРОВАНИЕ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ПОРОСЯТ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Ушакова Е. М., Сидоренко О. С., Бабийчук Г. А., Бондаренко Т. П., Божок Г. А.

Резюме. В данной работе представлена сравнительная характеристика свойств мультиклеточных сфероидов, полученных в культурах клеток надпочечников поросят разного возраста (P1, P7, P14 и P30). Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что в первые 2 недели неонатального развития в надпочечниках поросят присутствуют симпато-адреналовые прогениторные клетки, способные в определенных условиях дифференцироваться в нейробластоподобные клетки.

Ключевые слова: надпочечники, симпато-адреналовые прогениторные клетки, культивирование, нейробластоподобные клетки, нейробластома.

FORMATION OF MULTI-CELLULAR SPHEROIDS IN DIFFERENT AGE PORCINE ADRENAL CELL CULTURE

Ushakova Y. M., Sidorenko O. S., Babiiuchuk G. A., Bondarenko T. P., Bozhok G. A.

Abstract. Goal. Study the morphological features and proliferative properties of adrenal cell cultures obtained from piglets on different days of neonatal development (P1, P7, P14 and P30).

Methods. In this paper, a comparative assessment of the formation parameters of multicellular spheroids (MS) in cultures derived from the adrenal glands of P1, P7, P14 and P30 pigs was carried out. The adrenal primary cell culture was obtained by an enzymatic method. The cells were cultured in plastic Petri dishes with a low-adhesive surface. In such conditions floating multicellular spheroids are formed. On the 14th day of culture, the MS was transferred to 24-well plates with a normal adhesive surface and continued to be cultured.

Results. The number of MS formed under low-adhesive conditions depended on the age of the animal. On the 6th day of cultivation this indicator was in the range 1.7-1.9 MS per 1 million seeded cells in the adrenal cell cultures of animals P1, P14 and P30. There was a tendency to increase spheroid-forming ability of adrenal cell cultures of P7 piglets (3.1 MS per 1 million seeded cells). With further cultivation for up to 24 days this tendency persisted. Regarding the size of the MS, by the 24 day of culture, the diameter of the MS in adrenal cell cultures of piglets P14 and P30 was significantly less than that obtained from younger animals. Multicellular spheroids formed by the 14th day of cultivation were transferred to the adhesive surface. In cell cultures obtained from the adrenal glands of P1 pigs MS were quickly attached and neuroblast-like cell migration was observed. By 7 day of cultivation they formed a net consisting of cells and their processes. A similar picture was observed in MS cultures obtained from P7 and P14 piglets, although the area of net-like outgrowth was less than in the previous case. The round-shaped cells and cellular detritus, but no neuroblast-like cells were found in a culture that was obtained from the adrenal glands of P30 piglets.

Conclusions. The results of the study allow us to conclude that sympathoadrenal progenitor cells, capable of differentiating into neuroblast-like cells under certain conditions, are present in the adrenal glands of piglets during the first 2 weeks of neonatal development.

Key words: adrenal gland, sympathoadrenal progenitor cells, cultivation, neuroblas-like cells, neuroblastoma.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 27.01.2018 року