

Olga S. Sidorenko,
engineer;

Galyna A. Bozhok,
DPh, senior researcher;

Evgeniy I. Legach,
DPh, chief researcher;

Tatyana P. Bondarenko,
DPh, department head;
Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkov

Morphological and Functional Features of Newborn Piglets Adrenal Cells During Culturing

Key words: adrenal cell culture, cytosphere, bromodeoxyuridine, 3- β -hydroxysteroiddehydrogenase, neuronal morphology.

Annotation: The article contains analysis of morphological and functional features of newborn piglets adrenal cells during culturing. It was shown that the newborn piglets adrenal cell culture consists of monolayer of fibroblast-like cells and spherical cell structures (cytospheres). It was demonstrated that the number of 3- β -HSD⁺ cells decreased gradually. The migration of neuron-like cells from the cytospheres after their reseeding was also shown.

На сегодняшний день культуры клеток млекопитающих широко используются для решения как фундаментальных теоретических проблем, так и различных практических задач, особенно в области медицины. Они применяются для получения ферментов, гормонов, моноклональных антител и т.д. в промышленных масштабах. На таких культурах изучаются механизмы и закономерности процессов клеточной пролиферации и дифференцировки, а также перерождения нормальных клеток в опухолевые. Клеточные культуры позволяют изучать чувствительность клеток к физическим и химическим факторам, в т. ч. к лекарствам, а также определять потенциальную мутагенность и канцерогенность этих факторов.

Первичная культура клеток надпочечников является интересным объектом исследования, поскольку состоит из множества типов клеток, имеющих различное эмбриональное происхождение. Известно, что в мозговом веществе надпочечников присутствуют недифференцированные клетки-производные нервного гребня, которые при определенных условиях культивирования способны дифференцироваться в нейроны (1). Кроме того, зрелые хромаффинные клетки могут подвергаться трансдифференцировке в нейрональном направлении (2). В связи с вышесказанным культура клеток надпочечников все чаще применяется для изучения процессов нейрогенеза, а также механизмов клеточной пластичности *in vitro*.

Известно, что при совместном культивировании несколько типов клеток, возможны качественные и количественные изменения популяционного состава исходной суспензии и/или свойств клеток. Поэтому для успешного применения этого биотехнологического подхода необходимо изучить его влияние на свойства изучаемого объекта.

Целью данной работы было изучение морфологических особенностей клеток надпочечников новорожденных поросят при культивировании.

Объект и методы исследования.

Источником биологического материала служили новорожденные поросята первого поколения пород крупная белая и украинская мясная. 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 выделяли, очищая от прилегающей жировой ткани, затем помещали в охлажденную среду DMEM/F12 (РАА Laboratories, Австрия), содержащую антибиотик (40 мкг/мл гентамицина, Здоров'я, Украина), и измельчали на фрагменты размером приблизительно 1 мм³, затем дважды отмывали от крови средой с антибиотиком. В дальнейшем отмытые фрагменты ткани надпочечников использовали для получения клеточной суспензии.

Суспензию клеток из фрагментов ткани получали ферментативным методом. Для дезагрегации клеток использовали ферментный раствор, содержащий 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 каждого этапа дезагрегированные клетки собирали в пробирку с охлажденной фетальной телячьей сывороткой (ФТС, РАА Laboratories, Австрия), а к оставшимся фрагментам ткани добавляли свежий ферментный раствор. Клетки, полученные после трех этапов ферментации, объединяли, а затем отмывали от ферментов путем центрифугирования в среде с 0,2 % бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). Полученную суспензию фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью общепринятого метода окрашивания трипановым синим.

Клетки культивировали в пластиковых флаконах с площадью дна 25 см² (РАА Laboratories, Австрия) на питательной среде DMEM/F12 с добавлением 10 % ФТС, 40 мкг/мл гентамицина, 5 мкг/мл амфотерицина В (Sigma, США) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Посевная концентрация составляла в среднем 0,33±0,16 млн клеток на 1 см² площади. После 1-х суток культивирования флаконы ополаскивали средой с антибиотиком, удаляя при этом неприкрепившиеся и мертвые клетки, и производили замену питательной среды. В дальнейшем среду меняли каждые 3-4 суток.

Для идентификации пролиферирующих клеток в культуре клеток надпочечников (ККН) 8-х суток культивирования в культуральную среду добавляли бромдеоксиуридин (BrdU, Sigma, США) в концентрации 10 мМ, а затем исследовали его включение в ДНК пролиферирующих клеток с помощью иммуноцитохимического анализа. Для этого после 6 ч инкубации с BrdU (1) ККН фиксировали в 4% растворе

параформальдегида (30 мин), денатурацию молекул ДНК осуществляли путем обработки фиксированных клеток 2N HCl (30 мин). Затем клетки отмывали боратным буфером, проводили пермеабиллизацию в 1% растворе Triton и блокировали неспецифическое связывание антител путем инкубации в растворе с 5% нормальной лошадиной сыворотки и 0,2 % Triton. Инкубацию с первичными антителами проводили при +4°C в течение 12 часов, со вторичными антителами – при +20°C в течение 30 минут. В качестве первичных антител использовались BrdU (Bu20a) Mouse mAb #5292 (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител использовались Goat polyclonal to Mouse IgG (ab6785, Abcam, Великобритания) в разведении 1:500.

Для исследования клеточной морфологии проводили окрашивание ККН липофильным флуоресцентным красителем DiO (Sigma, США), который широко используется для мечения мембранных структур (3). Для этого в среду культивирования клеток добавляли DiO (5 мкг/мл) и культивировали 1,5 часа, после чего среду с красителем заменяли на обычную культуральную среду.

Активность фермента 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-HSD) в суспензии клеток или в клетках монослоя определяли с помощью гистохимического метода (4). К 50 мкл клеточной суспензии добавляли 200 мкл красящего раствора - среды DMEM/F12, содержащей нитротетразолий синий (0,1 мг/мл, Sigma, США), дегидроэпиандростерон (0,12 мг/мл, Sigma, США) и никотинамидадениндинуклеотид (1 мг/мл, Sigma, США). При исследовании активности 3β-HSD в клетках монослоя производили замену питательной среды красящим раствором описанного состава. Клетки инкубировали в красящем растворе в течение 2 и 24 часов при 37°C.

Для подсчета количества 3β-HSD-позитивных клеток, а также в случае пересева первичную культуру клеток открепляли от поверхности культивирования с использованием смеси растворов трипсина (Sigma, США) и Версена в соотношении 1:1 (конечная концентрация трипсина составляла 0,25%) при 37°C в течение 3 мин. Открепившиеся клетки отмывали от трипсина охлажденной средой с 5% ФТС двукратным центрифугированием.

Микрофотосъемку осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z и светооптического микроскопа AmScope с цифровой камерой.

Морфометрические исследования культуры клеток проводили по микрофотографиям, используя программное обеспечение AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение.

Режим ферментативной обработки, применяемый в данной работе, позволил получить в среднем $4,81 \pm 2,64$ млн жизнеспособных клеток из одного надпочечника. При посевной концентрации $0,33 \pm 0,16$ млн клеток на 1 см^2 большая часть клеток прикреплялась и начинала расплываться в течение первых суток культивирования.

На начальном этапе культивирования в первичной культуре клеток надпочечников (ККН) наблюдались в основном клетки фибробластоподобной морфологии, а также округлые клетки, содержащие включения. На 4-5-е сутки

культивирования конфлюентность достигала 80%, фибробластоподобные клетки располагались более упорядоченно, формируя характерные «потоки». В это же время в культуре наблюдалось формирование многоклеточных образований шаровидной формы, которые мы назвали цитосферами.

Ранее нами было показано, что в ККН новорожденных поросят цитосферы формируются только в среде с 10% ФТС и представляют собой образования, прикрепленные к монослою из фибробластоподобных клеток (4).

На начальном этапе формирования цитосфер их диаметр составлял в среднем 40 ± 14 мкм. При дальнейшем культивировании цитосферы увеличивались в размерах (рис. 1, А), некоторые из них достигали 400 мкм. На 13-е сутки культивирования диаметр цитосфер составлял в среднем 246 ± 70 мкм.

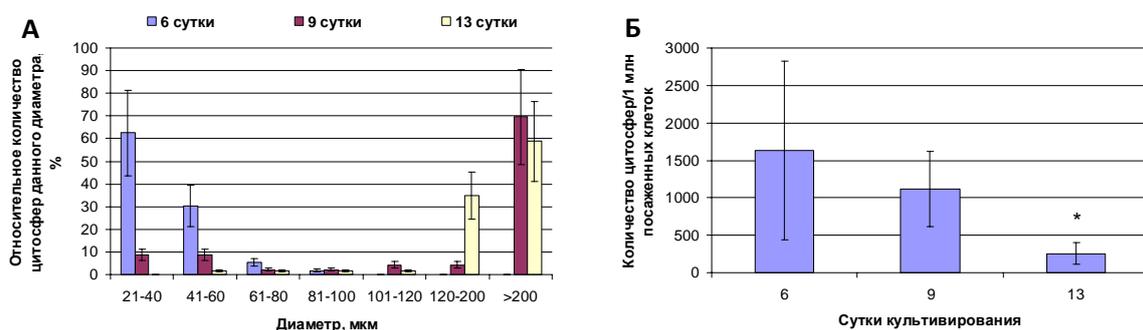


Рис.1. А - количество цитосфер различного диаметра в ККН на разные сутки культивирования, Б – общее количество цитосфер в ККН на разные сутки культивирования.

Одним из способов изучения клеточной пролиферации, является применение бромдеоксиуридина (BrdU). BrdU, являясь аналогом нуклеозида тимидина, встраивается в ДНК делящейся клетки, после чего его идентифицируют с помощью специфических антител (5).

Для идентификации пролиферирующих клеток в составе цитосфер на 8-е сутки культивирования в культуральную среду добавляли BrdU и культивировали в течение 6 часов. После этого культуру клеток фиксировали и проводили иммуноцитохимическое мечение BrdU, включенного в ДНК пролиферирующих клеток. Данные флуоресцентной микроскопии показали, что в составе цитосфер присутствует незначительное количество пролиферирующих клеток, что подтверждается соответствующей флуоресценцией (рис. 2).

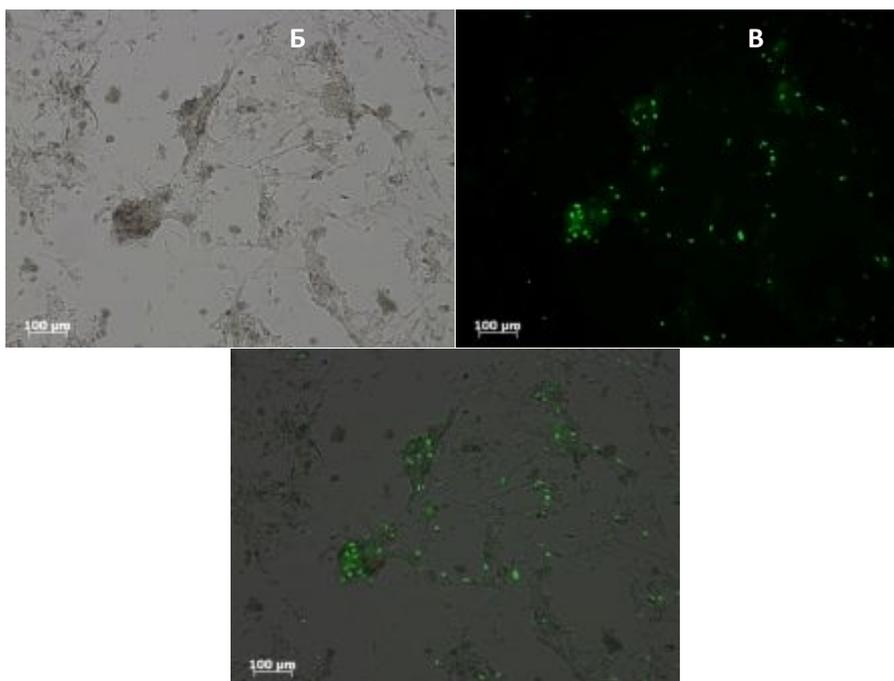


Рис. 2. Иммуноцитохимическое мечение BrdU в ККН. Клетки зафиксированы на 8-е сутки культивирования: А - световая микроскопия, Б – флуоресцентная микроскопия, В – совмещенная фотография.

Увеличение диаметра цитосфер может быть связано не только с пролиферацией клеток, формирующих цитосферу, но и с «захватом» клеток близлежащего монослоя. Подтверждением этого предположения может служить тот факт, что на более поздних сроках культивирования (более 13 суток) наблюдается разрежение участков монослоя вокруг цитосфер (рис. 3, А). Кроме того, на поздних сроках культивирования наблюдалось слияние нескольких цитосфер с формированием одной многоклеточной структуры крупного размера (рис. 3, Б). В результате данного процесса слияния в культуре наряду с увеличением размера цитосфер снижается их количество (рис. 1, Б). При дальнейшем наблюдении за такими крупными цитосферами было установлено, что они подвержены спонтанному откреплению от подложки.

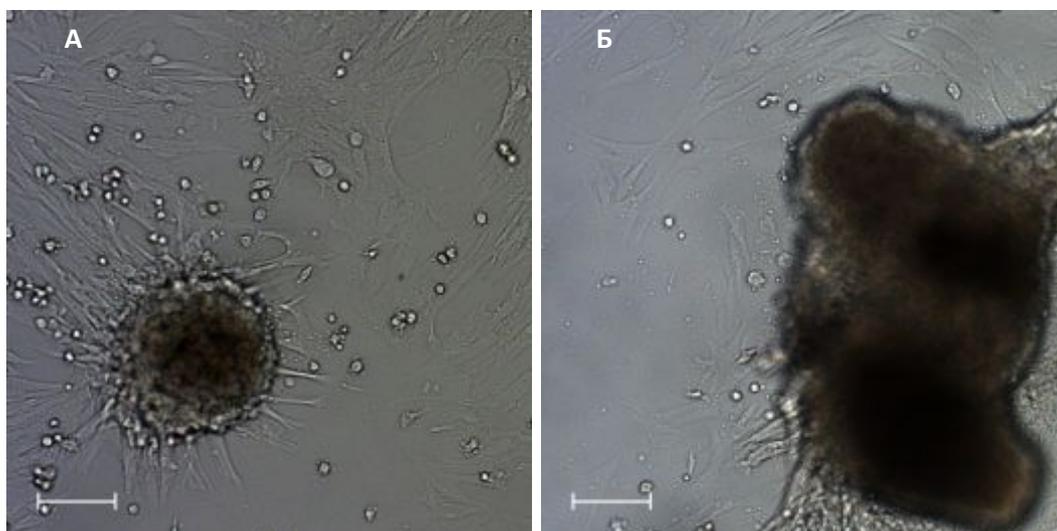


Рис. 3. ККН, 13-е сутки культивирования, световая микроскопия (прижизненное наблюдение). А - разрезание монослоя вокруг цитосферы, Б – слияние нескольких цитосфер. Масштабная линейка соответствует 100 мкм.

После открепления цитосфер от подложки и последующего пересева в культуральную среду аналогичного состава они снова прикреплялись к поверхности культивирования, после чего наблюдалась миграция из них клеток, морфологически отличающихся от крупных распластанных фибробластоподобных клеток, представленных в культуре до пересева. Так, выселяющиеся из цитосфер клетки были меньшего размера, характеризовались мелким ядром и компактной цитоплазмой. С помощью окрашивания ККН флуоресцентным красителем DiO мы смогли выделить клетки нескольких морфологических типов: округлые без отростков, клетки с конусом роста, клетки с униполярным отростком, а также клетки с двумя биполярными отростками (рис. 4).

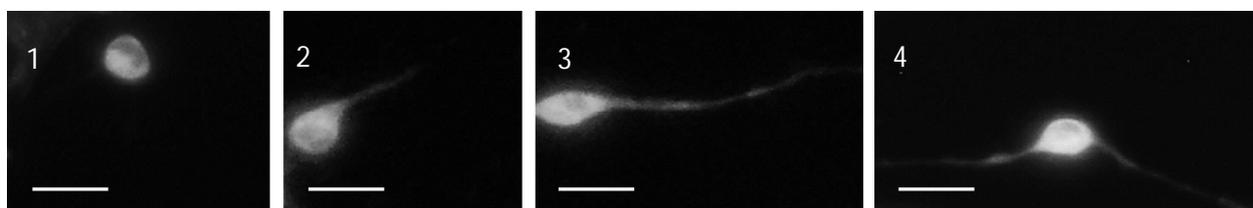


Рис. 4. Клетки, мигрирующие из цитосфер: 1 – округлая клетка без отростков, 2 – клетка с конусом роста, 3 – клетка с униполярным отростком, 4 – клетка с двумя биполярными отростками. Окрашивание DiO. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

Очевидно, что клетки, мигрирующие из цитосфер в ККН новорожденных поросят, имеют нейрональную морфологию. Процессы нейрональной дифференцировки в культуре хромаффинных клеток надпочечников в последнее время активно изучаются (1, 6-7). Однако для подтверждения нейрональной природы клеток, наблюдаемых в наших экспериментах, необходимы дальнейшие иммуноцитохимические и электрофизиологические исследования. На данном этапе работы мы называем данные клетки нейроноподобными.

При дальнейшем культивировании отростки нейроноподобных клеток удлинялись, формируя сети (рис. 5).

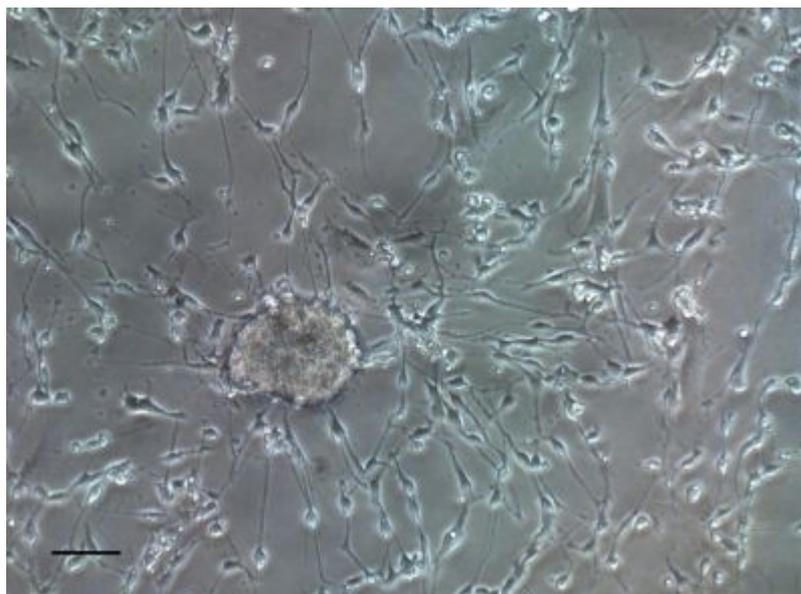


Рис. 5. Формирование сетей из отростков нейроноподобных клеток, мигрирующих из цитосферы в ККН, 19-е сутки культивирования. Масштабный отрезок равен 60 мкм.

Из литературных данных известно, что клетки нейроноподобной морфологии появляются в культуре клеток мозгового вещества надпочечников в результате трансдифференцировки (2) хромаффинных клеток либо дифференцировки прогениторных клеток (1). В обоих случаях для проявления нейронального фенотипа необходима культуральная среда, не содержащая глюкокортикоидных гормонов. Синтетический аналог глюкокортикоидов - дексаметазон, введенный в культуральную среду, не только препятствует нейрональной дифференцировке, но и вызывает обратный эффект - дедифференцировку сформировавшихся нейронов (8).

В данной работе мы использовали общую суспензию клеток, полученных из надпочечников, поэтому культура была гетерогенна по клеточному составу и содержала адренокортикальные гормонопродуцирующие клетки. Для оценки количества клеток, продуцирующих кортикостероиды в ККН, мы исследовали активность 3β -HSD – ключевого фермента синтеза кортикостероидов - в клетках в различные сроки культивирования. Перед посевом количество 3β -HSD-позитивных (3β -HSD⁺) клеток в общей суспензии составляло $48,4 \pm 3,3\%$ (рис. 6, 0 сутки). В дальнейшем количество 3β -HSD⁺ клеток постепенно снижалось (рис. 6), а к 5-м суткам культивирования 3β -HSD⁺ клетки не обнаруживались.

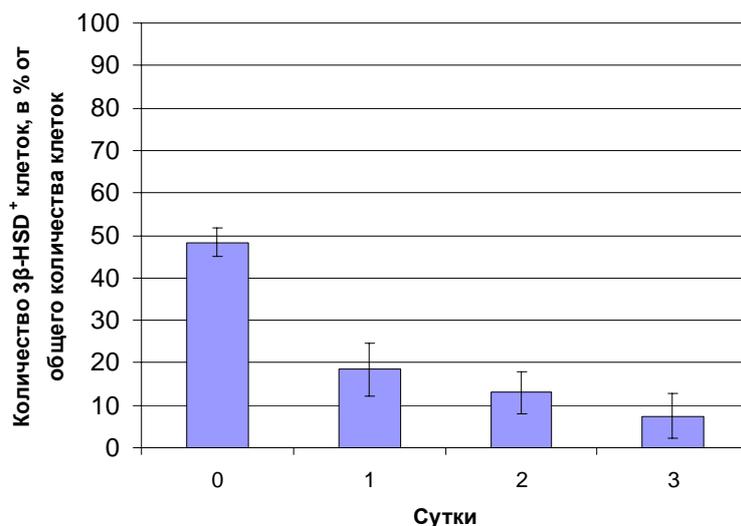


Рис. 6. Относительное количество 3β-HSD⁺ клеток среди всех клеток в исходной суспензии (0 сутки), а также в культуре на разные сроки культивирования.

Вероятно, снижение активности фермента 3β-HSD является следствием отсутствия естественной гипофизарной стимуляции.

Известно, что *in vivo* основным стимулятором синтеза стероидных гормонов клетками коры надпочечников является адренокортикотропный гормон (АКТГ) гипофиза. Вероятно, его отсутствие или недостаточное количество в среде культивирования может приводить к снижению гормонопродукции клетками коры надпочечников.

Так, например, в культуре адренокортикальных клеток мышей наблюдается быстрое снижение экспрессии *Cyp11b1*, ответственного за синтез 11 - бета - гидроксилазы – одного из ферментов синтеза глюкокортикоидов. Введение в среду АКТГ способствовало увеличению экспрессии *Cyp11b1*, а его отмена – повторному снижению (9).

Следует отметить, что снижение количества 3β-HSD⁺ клеток в ККН, наблюдаемое в наших исследованиях, свидетельствует не об элиминации стероидпродуцирующих клеток из культуры, а о снижении их функциональной активности. Методика, используемая нами для определения активности фермента 3β-HSD, предусматривает инкубацию клеток в среде, содержащей дегидроэпиандростерон в качестве субстрата для фермента 3β-HSD, в течение 90-120 минут. В некоторых экспериментах мы инкубировали суспензию клеток в присутствии дегидроэпиандростерона в течение 24 часов. При этом количество 3β-HSD⁺ клеток значительно увеличивалось. Так, при инкубации клеток 2-суточной ККН с дегидроэпиандростероном в течение 120 минут количество 3β-HSD⁺ клеток составляло 13±5 %, а при инкубации в течение 24 часов увеличивалось до 29,7±5,3 % (рис. 7).

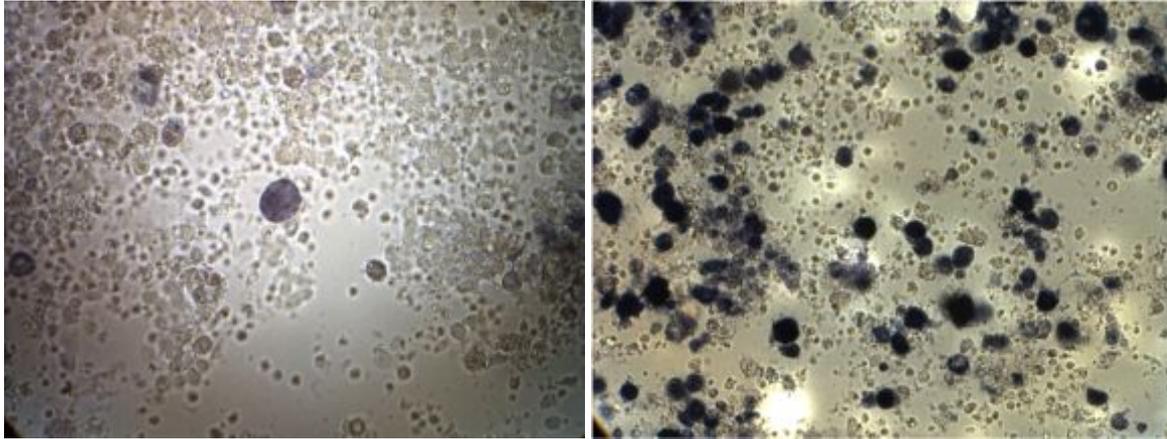


Рис. 7. Окрашивание 3β -HSD в ККН на 2 суток культивирования. А – инкубация с дегидроэпиандростероном в течение 120 мин, Б – те же клетки после 24 ч инкубации с дегидроэпиандростероном. 3β -HSD⁺ клетки окрашены в фиолетовый цвет.

Возможно, что при длительной инкубации дегидроэпиандростерон выступает не только в качестве субстрата для 3β -HSD, но и как активатор синтеза данного фермента в клетках. Подобный активирующий эффект дегидроэпиандростерона описан в литературе. Так, при интраперитонеальном введении дегидроэпиандростерона самцам крыс наблюдалось увеличение экспрессии мРНК ряда ключевых ферментов стероидогенеза, в том числе и 3β -HSD (10).

Таким образом, в ККН новорожденных поросят наблюдаются морфологические и функциональные изменения клеточного состава. В течение первых 4-5-ти суток культивирования формируется монослой из клеток преимущественно фибробластоподобной морфологии, затем образуются многоклеточные структуры - цитосферы, а на более поздних сроках культивирования появляются нейроноподобные клетки. Данные морфологические изменения происходят на фоне угасания функциональной активности стероидпродуцирующих клеток, что подтверждается отсутствием в них фермента 3β -HSD и косвенно свидетельствует о снижении концентрации стероидных гормонов в среде культивирования.

Reference:

1. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem cells* 2009;27(10):2602-2613. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.180> PubMed PMID: 19609938. doi: 10.1002/stem.180. [[Google Scholar](#)]
2. Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity.. *J Neurosci* 1985;5(8):2119-2142. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=4020432> PubMed PMID: 4020432. [[Google Scholar](#)]
3. O'Brien JA, Lummis SCR. Diolistic labeling of neuronal cultures and intact tissue using a hand-held gene gun.. *Nat Protoc* 2006;1(3):1517-1521. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/17406443> PubMed PMID: 17406443. doi: 10.1038/nprot.2006.258. [[Google Scholar](#)]

4. Wiebe JP. Steroidogenesis in rat leydig cells: changes in activity of 5-ane and 5-ene 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases during sexual maturation.. *Endocrinology* 1976;98(2):505-513. PubMed PMID: 129324. doi: 10.1210/endo-98-2-505. [[Google Scholar](#)]
5. Sidorenko OS, Bozhok GA, Bilyavskaya SB. et al. Morphofunctional characteristics of newborn piglets adrenal cells culture. *Biotechnology* 2012;5(5):72-81. [[Google Scholar](#)]
6. Ehrhart-Bornstein M, Vukicevic V, Chung KF. et al. Chromaffin Progenitor Cells from the Adrenal Medulla. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30(8):1417-1423. Available from: <http://www.scholaruniverse.com/ncbi-linkout?id=21080061> PubMed PMID: 21080061. doi: 10.1007/s10571-010-9571-3. [[Google Scholar](#)]
7. Santana MM, Chung KF, Vukicevic V. et al. Isolation, Characterization and Differentiation of Progenitor Cells from Human Adult Adrenal Medulla. *Stem Cells Transl Med* 2012;1(11):783-791. Available from: <http://stemcellstm.alphamedpress.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23197690> PubMed PMID: 23197690. doi: 10.5966/sctm.2012-0022. [[Google Scholar](#)]
8. Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(7):3498-3502. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/28526> PubMed PMID: 28526. [[Google Scholar](#)]
9. Chu Y, Wu BM, McCabe ER, Dunn JCY. Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells.. *J Pediatr Surg* 2006;41(12):2008-2012. Available from: <http://www.scholaruniverse.com/ncbi-linkout?id=17161193> PubMed PMID: 17161193. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2006.08.027. [[Google Scholar](#)]
10. Song L, Tang X, Kong Y. et al. The expression of serum steroid sex hormones and steroidogenic enzymes following intraperitoneal administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) in male rats. *Steroids* 2010;75(3):213-218. Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+57-88-5> PubMed PMID: 19961867. doi: 10.1016/j.steroids.2009.11.007. [[Google Scholar](#)]