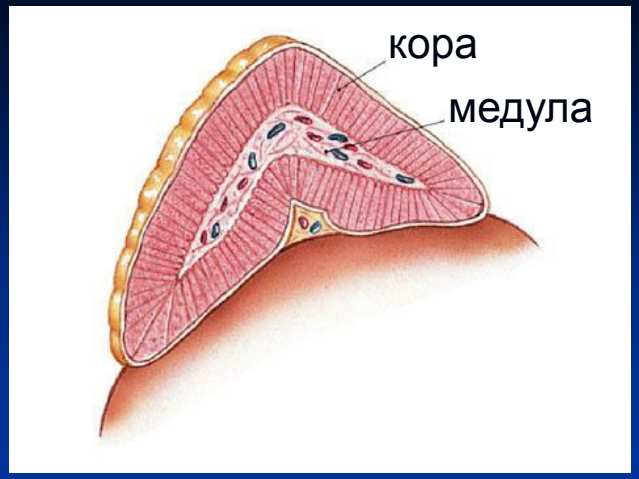
Національна академія наук України
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Дослідження сфероїдогенезу та пластичності клітин наднирників в культурі *in vitro* та розробка способів їх довгострокового зберігання

Робота висувається для участі у конкурсі зі здобуття премії Президента України для молодих вчених у 2021 р.

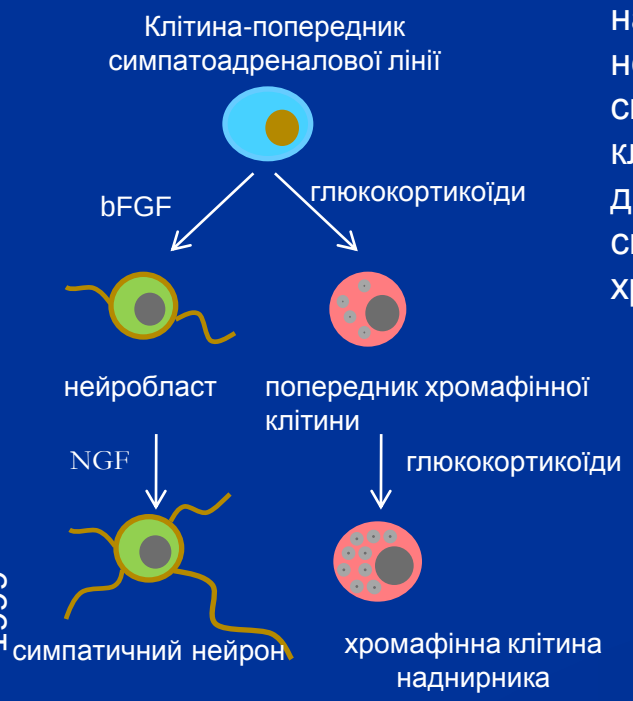
СИДОРЕНКО Ольга Сергіївна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Інституту проблем кріобіології і кріомедицини

Харків - 2021



Наднирник складається з двох функціонально різних ендокринних тканин: зовнішнього коркового шару, клітини якого секретують ряд стероїдних гормонів, і внутрішнього шару - мозкової речовини або медули, яка секретує катехоламіни. В процесі ембріонального розвитку ці тканини розвиваються з різних зародкових листків.

Клітини медули є похідними клітин нервового гребеня, які представляють так звану симпатоадреналову лінію клітин.



Хромафинні клітини мозкової речовини наднирників і симпатичні нейрони є похідними клітин нервового гребеня, вони відносяться до симпатоадреналової лінії і розвиваються із загальної клітини-попередника. Ліворуч наведено спрощену схему дивергентного диференціювання клітини - попередника симпатоадреналової лінії у симпатичний нейрон або хромафінну клітину наднирника.

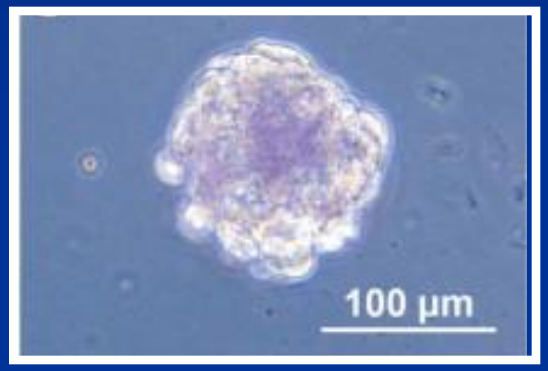
Порушення в роботі певних генів, які контролюють диференціювання клітини-попередника симпатоадреналової лінії, призводить до розвитку нейробластом, тому дослідження властивостей та пластичності клітин наднирників *in vitro* є актуальним для сучасної медицини.

© Сосунов А.А., 1999

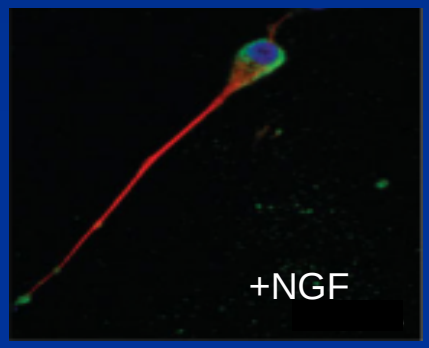
Chung K. F., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla // Stem cells. – 2009. – V.27, N10. – P. 2602 - 2613.

Цікавою властивістю клітин медули є їх здатність формувати клітинні кластери при культивуванні. Клітинні кластери утворюються при культивуванні багатьох видів клітин та в науковій літературі носять загальну назву цитосфер, або сфероїдів. Зокрема, в культурі хромафінних клітин наднирників бика і людини спостерігалося формування сферичних структур, які було названо хромосферами. Було показано, що хромосфери складаються з прогеніторних клітин різного ступеня диференціювання і за певних умов диференціюються в повноцінні нейрони.

Хромосфери



Під дією фактора росту нервів (NGF) клітини хромосфер диференціюються в нейрони



Завдяки здатності певних популяцій клітин наднирників до спонтанного та індукованого диференціювання, а також трансдиференціювання в нейрональному напрямку, культура клітин наднирників широко застосовується для вивчення регуляції процесів нейрогенезу in vitro, а також при трансплантації тваринам з різними модельними патологіями нервової системи.

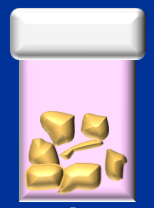
Кріоконсервування є одним із способів довгострокового зберігання біологічного матеріалу, який потрібен при тривалій роботі з тканинами і клітинами в лабораторних умовах. Якщо розглядати наднирник як джерело прогеніторних клітин-похідних симпатоадреналової лінії, необхідним є дослідження властивостей цих клітин, зокрема здатність до диференціювання, в тому числі після кріоконсервування.

Мета роботи полягала в дослідженні морфофункціональних властивостей клітин наднирників новонароджених поросят в культурі *in vitro*, а також їх змін після кріоконсервування залежно від вихідного стану біоматеріалу (кріоконсервування первинних культур клітин або свіжовиділених фрагментів тканини).

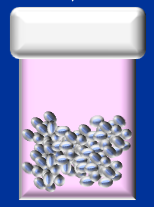
Загальна схема експеримента

1 етап

Отримання первинної культури клітин (ПКК) зі свіжовиділених фрагментів тканини



свіжовиділені фрагменти тканини наднирників

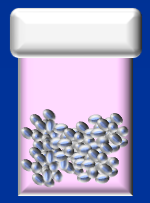


дезінтеграція тканини ферментативним методом і отримання клітинної суспензії

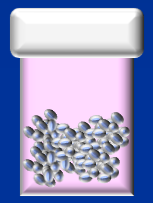
культивування в умовах *in vitro*

2 етап

Кріоконсервування ПКК і рекультивування після відігріву

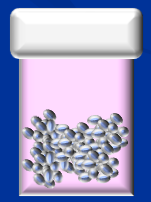


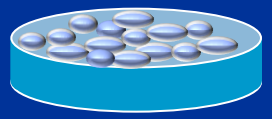
-196°C



Клітини первинної культури знімали з підложки та кріоконсервували. Після зберігання в умовах рідкого азоту відігрівали та рекультивували.

+40°C





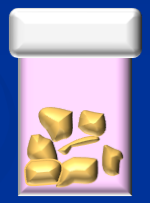
рекультивування в умовах *in vitro*

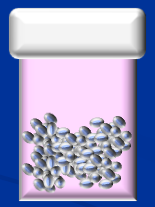
3 етап

Отримання ПКК з кріоконсервованих фрагментів тканини

-196°C

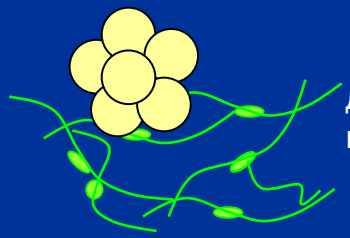
+40°C





дезінтеграція тканини ферментативним методом і отримання клітинної суспензії

культивування в умовах *in vitro*



дослідження сфероїдогенезу та пластичності клітин (появи клітин нейрональної морфології) проводилися в культурах, які отримували на кожному з етапів роботи

Стислий огляд матеріалів і методів дослідження

Джерелом біологічного матеріалу служили новонароджені поросята. Всі маніпуляції з тваринами проводились згідно з методичними рекомендаціями «Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, які проводяться на тваринах», матеріалами IV Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (ETS 123 (1986), «Спільними етичними принципами експериментів на тваринах», схваленими Першим національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р., м. Київ, Україна) і дозволом Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Клітинну суспензію отримували ферментативним методом з нативних (свіжовиділених), а також з кріоконсервованих фрагментів тканини з використанням колагенази I типу та дезоксірібонуклеази. Клітини культивували на поживних середовищах 199 або DMEM/F12 з додаванням10% фетальної телячої сироватки (ФТС), антибіотиків при 37 °С в атмосфері з 5% CO_2.

Для кріоконсервування фрагментів наднирників використовували поживне середовище DMEM/F12, до якого додавали диметилсульфоксид (ДМСО) у кінцевій концентрації 10% в якості кріопротектора. Фрагменти кріоконсервували зі швидкостями охолодження 0,3; 1; 5; 40 град/хв на програмному заморожувачі "Cryoson" (Німеччина) та > 100 град/хв.

Для кріоконсервування ПКК використовували клітинний моношар 3-7 діб культивування. У роботі застосовували кілька варіантів кріозахисних середовищ: середовище 199 з 5; 7,5; 10 і 15% ДМСО, а також середовище 199 з 5; 7,5; 10 і 15% ДМСО у поєднанні з 10 або 25% ФТС. Зразки ПКК заморожували зі швидкістю охолодження 1 град/хв до -70°С на програмному заморожувачі "Cryoson" (Німеччина) з наступним зануренням у рідкий азот.

Відтаювання заморожених фрагментів і ПКК проводили на водяній бані при температурі +40°С до зникнення твердої фази. Потім зразки відмивали від ДМСО середовищем 199.

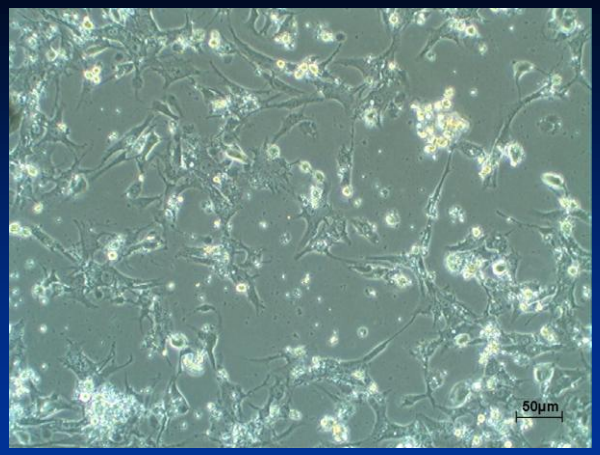
Збереження клітин в суспензії після кріоконсервування ПКК розраховували як кількість клітин в суспензії після відтаювання по відношенню до кількості клітин до заморожування. Життєздатність визначали у відсотках як відношення кількості непрокрашених трипановим синім клітин до їх загальної кількості.

Для визначення проліферативної активності в ПКК до живильного середовища додавали 10 μM бромодеоксіуридину (BrdU) і проводили інкубацію в звичайних умовах протягом 6 годин. Включення молекул BrdU в ДНК проліферуючих клітин визначали імуноцитохімічним методом.

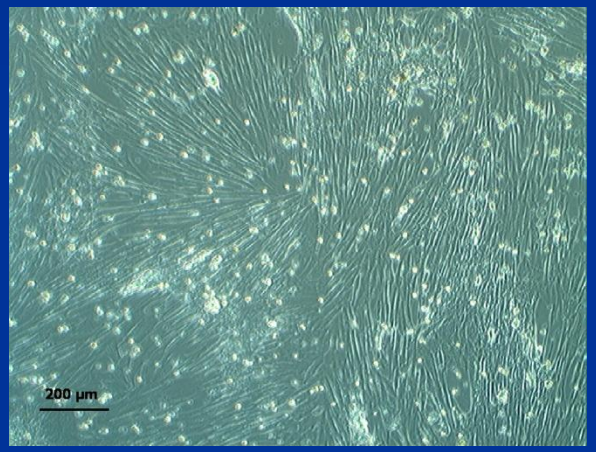
Також імуноцитохімічним методом визначали експресію нейрального маркера β-III-тубуліну та маркера хромафінних адреномедулярних клітин хромограніну А.

Мікрофотозйомку здійснювали за допомогою конфокального лазерного мікроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z і світлооптичного мікроскопа Meiji Techno с цифровою камерою.
Статистичну достовірність оцінювали за допомогою непараметричного критерію Уілкоксона і однофакторного дисперсійного аналізу, використовували програмне забезпечення Excel. Достовірними вважали відмінності при $p<0,05$.

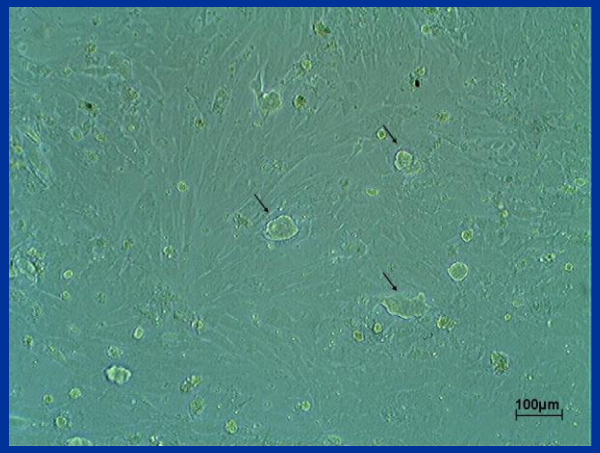
Морфологія первинної культури клітин (ПКК) надниркових залоз новонароджених поросят, отриманих зі свіжовиділених фрагментів тканини.



Після прикріплення і розпластування клітин первинна культура була представлена в основному мультиполярними клітинами фібробластоподібної морфології, орієнтованими хаотично. Крім того, в культурі спостерігалися поодинокі округлі клітини, що містили включення і були віднесені нами за морфологічними ознаками до гормонопродукуючих.



На більш пізніх термінах культивування спостерігалося формування впорядкованої структури розташування фібробластоподібних клітин, при цьому вони щільно прилягали одна до одної, ставали більш витягнутими і набували біполярної форми, утворюючи характерні потоки.



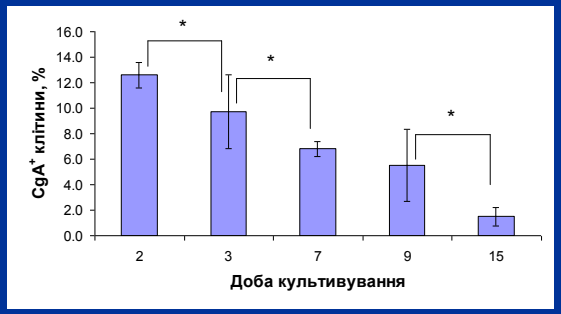
Після досягнення приблизно 80% конфлюентності (на 3-5-ту добу культивування) на моношарі формувалися сфероїди, що складалися з декількох клітин (на рисунку позначено стрілками).

При подальшому культивуванні сфероїди збільшувалися у розмірах та ущільнювалися

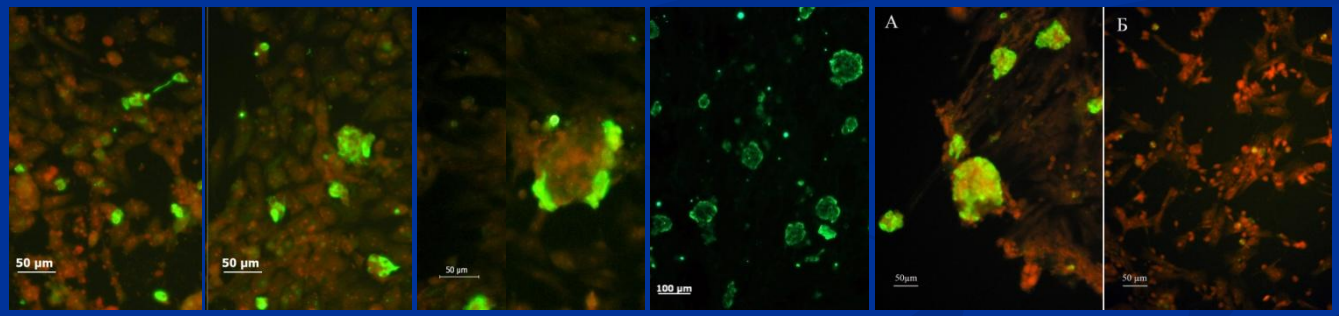
Сфероїд на 5 добу культивування

Сфероїд на 14 добу культивування

Ми досліджували ймовірний шлях утворення та росту сфероїдів, з'ясовуючи внесок процесів агрегації та проліферації клітин, зокрема хромафінних. Хромогранін А (CgA) - це кислий білок з сімейства гранінів, який у великій кількості міститься в (нейро) ендокринних клітинах, в тому числі і в хромафінних клітинах медули. У зв'язку з цим імуноцитохімічний аналіз із застосуванням антитіл до CgA дозволяє виявити хромафінні клітини в культурі і з'ясувати їх локалізацію як в моношарі, так і в сфероїдах. Ми досліджували експресію CgA в клітинах моношару і сфероїдів на 2,3,7,9 і 15-ту добу культивування.



Частка поодиноких CgA⁺ клітин серед всіх клітин моношару з часом знижувалася від 12,6 ± 1% до 1,5 ± 0,7%. Це пов'язано з тим, що дані клітини мали тенденцію групуватися, формуючи сфероїди.



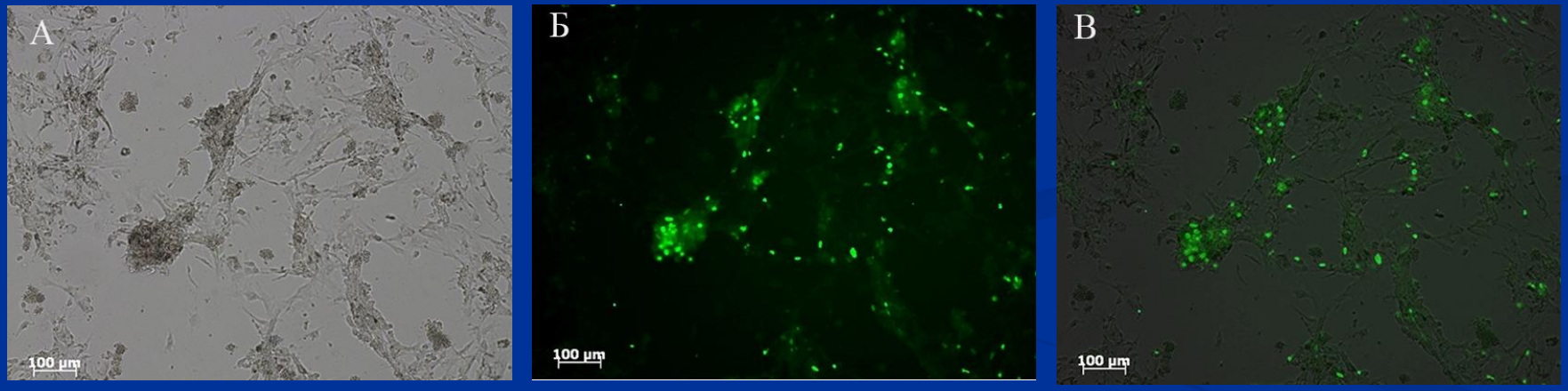
2 доба 3 доба 7 доба 9 доба 15 доба: А-сфероїди, Б-моношар

Імуноцитохімічне забарвлення CgA (зелене свічення) в ПКК наднирників в різні терміни культивування; ядра пофарбовані пропідій йодидом (червоне свічення). Спочатку адреномедулярні хромафінні клітини знаходяться в первинній культурі розрізнено, однак при подальшому культивуванні вони збираються групами, формуючи спочатку невеликі кластери, а потім і сфероїди.

Ми припустили, що збільшення сфероїдів може бути обумовлене не тільки процесом агрегації клітин моношару, але і проліферативною активністю клітин в їх складі.

Одним із способів вивчення клітинної проліферації є застосування бромодеоксіуридину (BrdU). BrdU є аналогом нуклеозиду тимідину, який вбудовується в ДНК клітини, що ділиться, після чого його ідентифікують за допомогою специфічних антитіл.

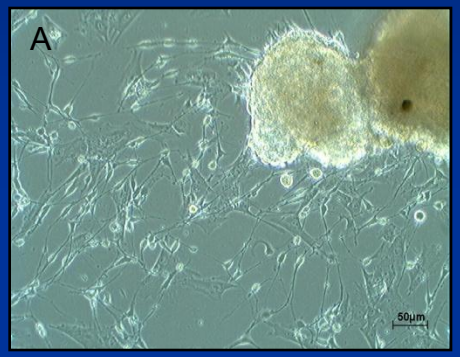
Для ідентифікації проліферуючих клітин в ПКК наднирників на 8-му добу культивування в культуральне середовище додавали BrdU і культивували протягом 6 годин. Після цього культуру клітин фіксували і проводили імуноцитохімічне мічення BrdU, включеного в ДНК проліферуючих клітин. Дані флуоресцентної мікроскопії показали, що як в моношарі, так і в сфероїдах присутні проліферуючі клітини, що підтверджується відповідною флуоресценцією .



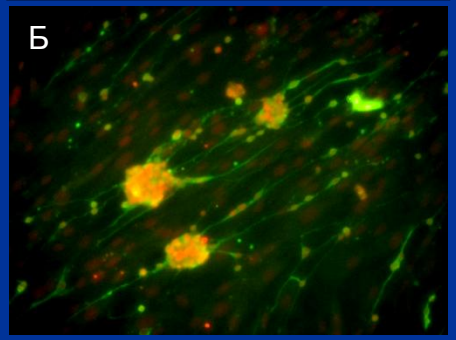
Імуноцитохімічне мічення BrdU (зелене свічення) в ПКК наднирників. Клітини зафіксовані на 8-му добу культивування: А - світлова мікроскопія, Б - флуоресцентна мікроскопія, В - поєднана фотографія.

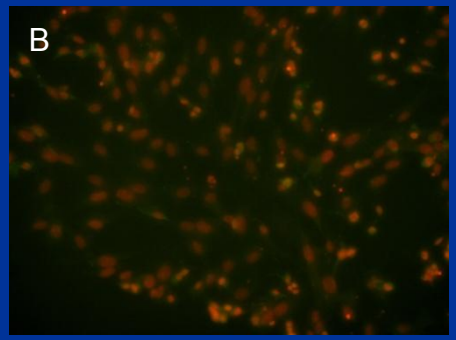
Таким чином, нами було встановлено, що в ПКК наднирників новонароджених поросят адреномедулярні хромафінні клітини, які експресують хромогранін А, групуються, формуючи сфероїди. При подальшому культивуванні спостерігається збільшення розміру сфероїдів внаслідок проліферації клітин у їх складі.

Як уже було сказано вище, хромафінні клітини мозкової речовини наднирників і симпатичні нейрони є похідними клітин нервового гребеня і розвиваються із спільної клітини-попередника. Для стимуляції нейронального диференціювання прогеніторних клітин нервового гребеня застосовується NGF. У зв'язку з нашим припущенням про наявність в ПКК наднирників прогеніторних клітин, які входять до складу сфероїдів, а також враховуючи, що NGF є індуктором нейронального диференціювання, ми провели серію експериментів, в яких сфероїди відкріпляли механічно і пересівали. При цьому частину сфероїдів культивували в стандартному поживному середовищі, а частину - в середовищі з додаванням NGF.



Після пересіву сфероїди прикріплялися до підложки, після чого спостерігалася міграція з них клітин двох морфологічних типів: фібробластоподібних, а також порівняно невеликих нейроноподібних клітин з відростками, що формували мережі (А). При цьому міграція нейроноподібних клітин зі сфероїдів спостерігалася у всіх експериментах, незалежно від додавання NGF в середовище культивування. Також ми не виявили будь-якого впливу додавання NGF до культурального середовища на кількість або ступінь розгалуженості утворюваних відростків, або час їх появи.





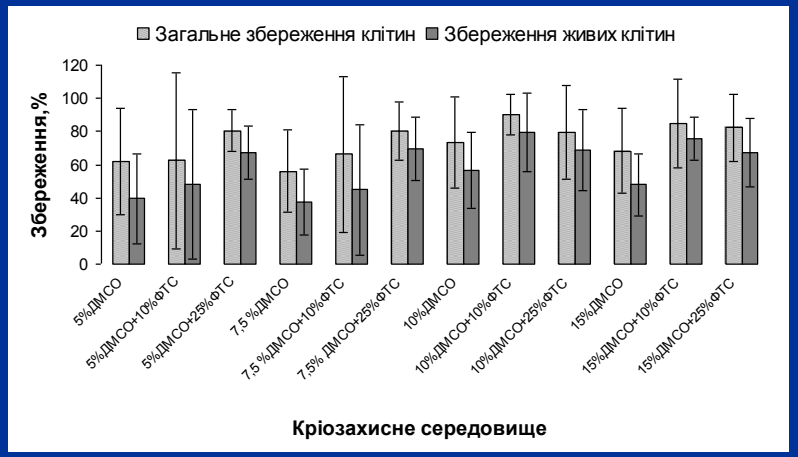
Для визначення наявності процесів диференціювання в нейрональному напрямку ми застосовували моноклональні антитіла до маркера нейронів β-III-тубуліну (зелене свічення). Його експресія спостерігалась у нейроноподібних клітинах, які мігрували зі сфероїдів (Б), і не спостерігалась в клітинах моношару (В). Ядра пофарбовані пропідій йодидом (червоне свічення).

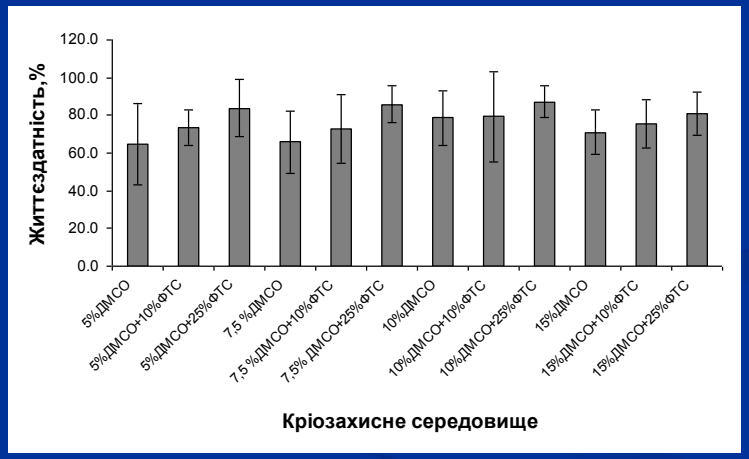
Таким чином, в ПКК наднирників новонароджених поросят у складі сфероїдів присутні клітини, можливо прогеніторні, які диференціюються в нейрональному напрямку. Поява нейроноподібних клітин в культурі спостерігалася при культивуванні в середовищі без використання будь-яких специфічних факторів росту.

2 етап – кріоконсервування клітин первинної культури

Застосування первинних культур клітин в різних експериментальних моделях вимагає розробки методів їх тривалого зберігання, одним із яких є кріоконсервування. Протоколи кріоконсервування кожного окремого типу клітин ссавців мають свої особливості, проте в більшості випадків для них характерне використання повільних швидкостей охолодження. В якості кріопротектора найбільш широко застосовується диметилсульфоксид (ДМСО).

В експериментах з кріоконсервування ПКК наднирників ми застосовували швидкість охолодження 1 град / хв як найбільш часто використовувану для заморожування клітинних культур, а також кріозахисне середовище з концентраціями ДМСО від 5 до 15%. У паралельній серії експериментів до кріозахисного середовища з аналогічними концентраціями ДМСО додавали 10% або 25% ФТС в якості додаткового компонента. Після кріоконсервування визначали збереженість і життєздатність клітин , результати відображено на діаграмах .



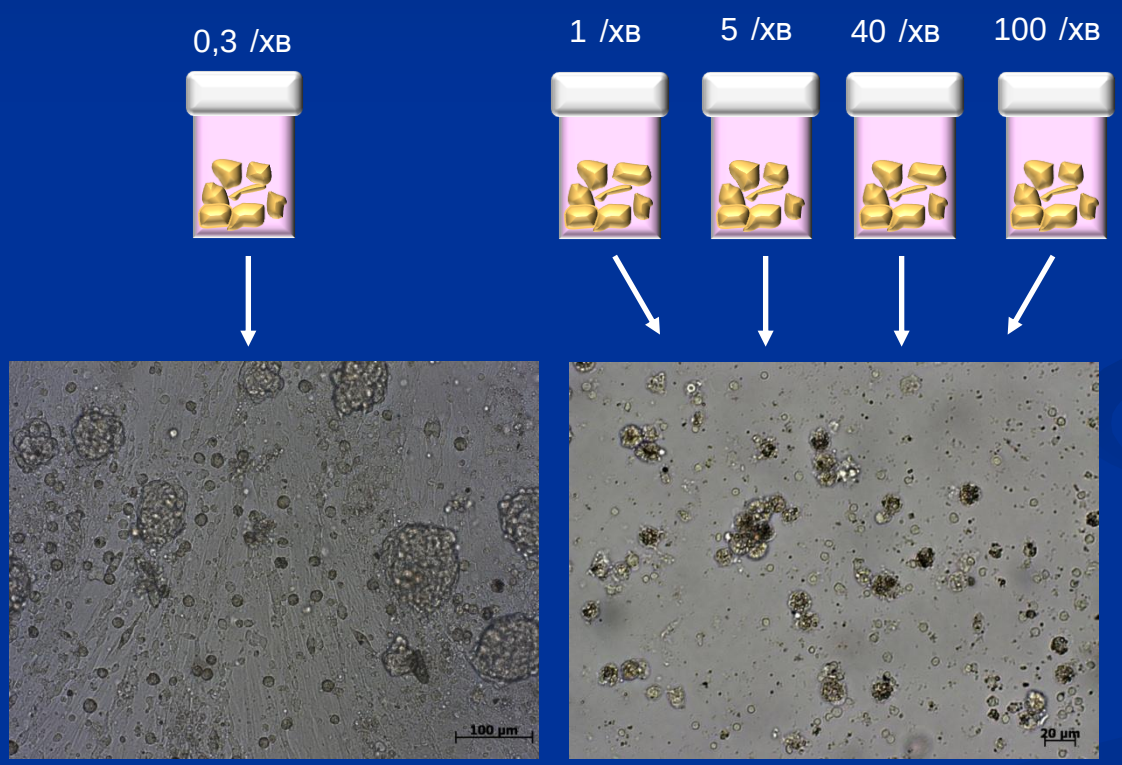


Збереження клітин, кріоконсервованих в описаних середовищах, коливалося від 62,4 ± 17,1% до 89,0 ± 17,6%. Будь-якої закономірності концентраційно-залежного впливу ДМСО на збереження або життєздатність кріоконсервованих клітин виявлено не було. При додаванні до кріозахисного середовища ФТС спостерігалася тенденція до збільшення життєздатності клітин із збільшенням концентрації ФТС.

У всіх зразках кріоконсервованих ПКК зберігався високий рівень адгезивної здатності клітин, на 2-гу добу рекультивування були виявлені сфероїди. Оскільки для кріоконсервування використовувалися ПКК 3-7-ї доби, які на той час вже містили сфероїди, наявність сфероїдів в культурі на 2-гу добу після висіву кріоконсервованих клітин свідчить про їх збереження при кріоконсервуванні в описаних умовах. Також спостерігалась наявність в культурі β-III-тубулін – позитивних клітин.

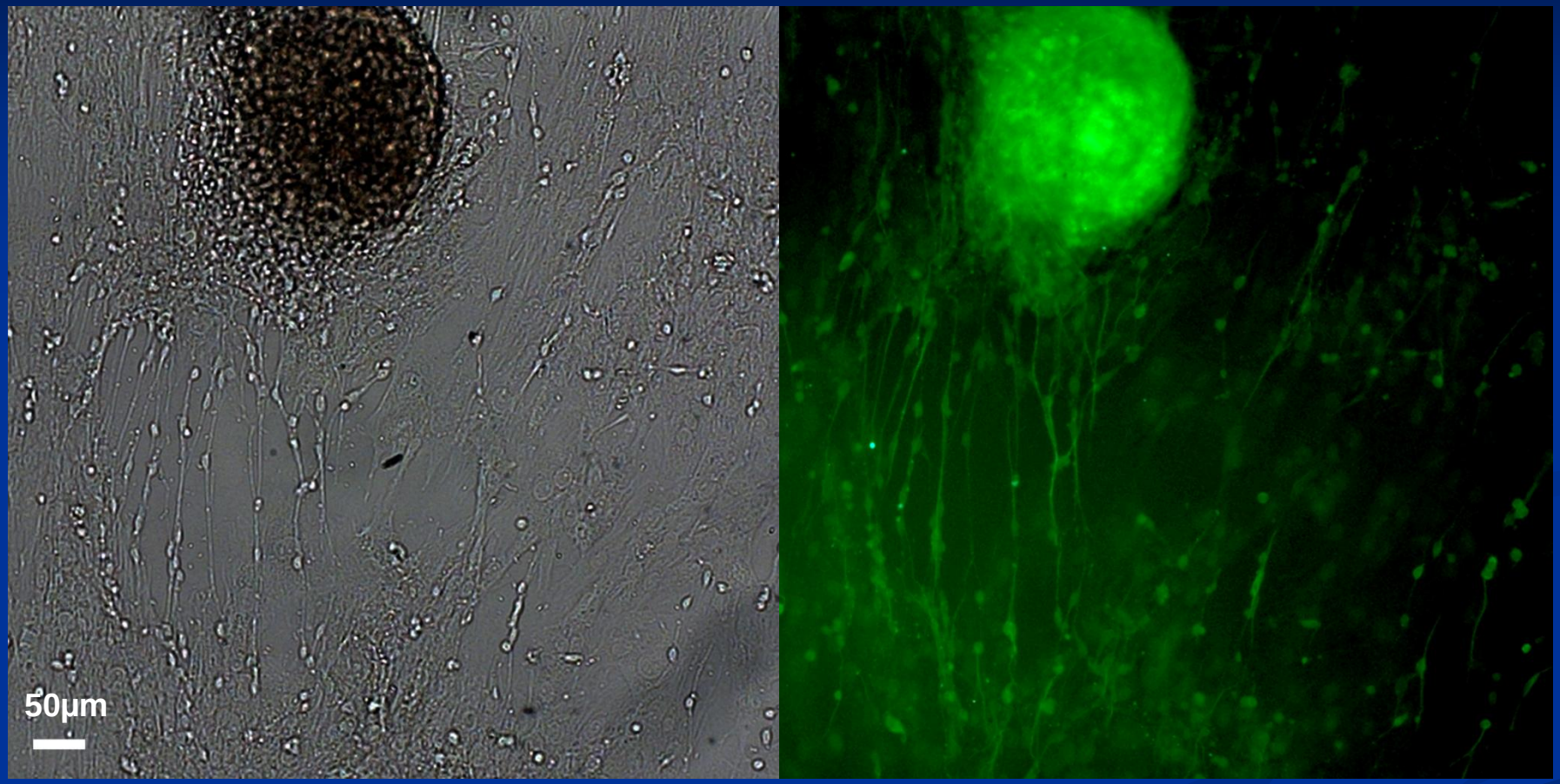
3 етап – отримання первинної культури клітин з кріоконсервованих фрагментів тканини

Кріоконсервування фрагментів тканини набагато більш швидкий і економічно вигідний підхід в порівнянні з кріоконсервуванням первинної культури. Теоретично фрагменти надниркових залоз можуть бути заморожені на стадії заготівлі біологічного матеріалу, а первинна культура може бути отримана з кріоконсервованих фрагментів в будь-який час за потребою. Для перевірки даного припущення нами було проведено серію заморожувань фрагментів тканини з різними швидкостями охолодження в кріозахисному середовищі з 10% ДМСО. Було обрано швидкості охолодження 0,3; 1; 5; 40 і 100 град/хв. Кріоконсервування фрагментів надниркових залоз з використанням всіх перерахованих швидкостей охолодження дозволило отримати достатню кількість життєздатних клітин після відтаювання зразків.



Проте, кріоконсервування фрагментів зі швидкостями охолодження 1, 5, 40 або 100 град / хв виключає можливість клітинної проліферації та отримання моношарової клітинної культури. При використанні швидкісті охолодження 0,3 град / хв через 1 добу культивування 82,6% посаджених клітин прикріплялися до підложки. Надалі ці клітини поводилися в культурі так само, як клітини, отримані з нативних фрагментів тканини. Спостерігалося розпластування клітин і формування конфлюентного моношару та сфероїдів.

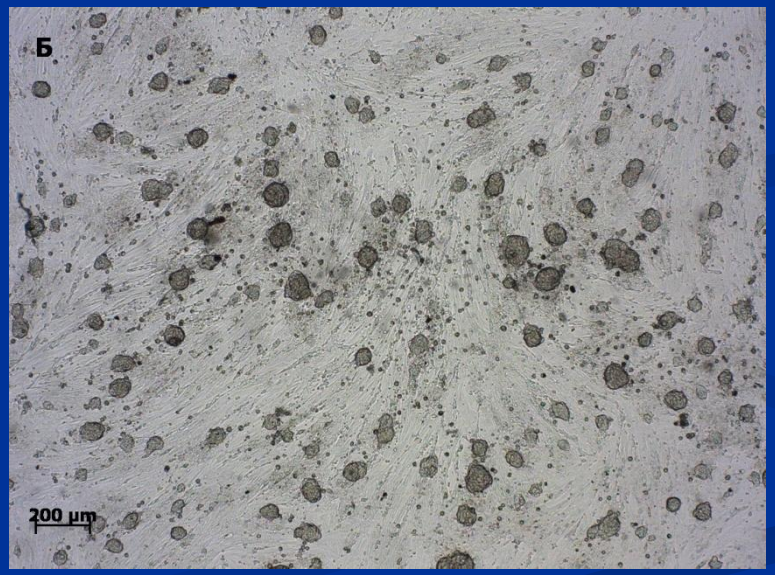
Імуноцитохімічне забарвлення β-III-тубуліну в ПКК, отриманих з фрагментів тканини, які були кріоконсервовані зі швидкістю охолодження 0,3 /хв



Таким чином, кріоконсервування фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят зі швидкістю охолодження 0,3 град / хв дозволяє зберегти достатню кількість клітин, здатних прикріплятися і розпластуватися на поверхні культивування, а також формувати конфлюентний моношар. При цьому зберігається популяція клітин, які формують сфероїди і експресують β-III-тубулін.

Відмінності сфероїдів, отриманих з нативної та кріоконсервованої тканини

При культивуванні клітин, отриманих з кріоконсервованої тканини, частота формування сфероїдів до 15-ї доби становила 1461 ± 199 сфероїдів на 1 млн посаджених клітин (у контролі - 404 ± 160, контролем служили ПКК зі свіжовиділених фрагментів тканини). Очевидно, що кріоконсервування фрагментів тканини наднирників новонароджених поросят під захистом 10% ДМСО зі швидкістю охолодження 0,3 град / хв сприяє більш високому збереженню клітин, що формують сфероїди, порівняно з клітинами інших популяцій. Однак сфероїди, що формуються в ПКК, отриманих з кріоконсервованих фрагментів тканини, були набагато дрібніші в діаметрі, ніж сфероїди в ПКК, отриманих зі свіжовиділених фрагментів тканини . Так, сфероїди в ПКК, отриманих з кріоконсервованих фрагментів, до 13-ї доби культивування досягали в середньому 66 ± 24 мкм в діаметрі, максимальний діаметр сфероїдів в такій культурі становив 146 мкм. До тієї ж доби культивування в ПКК, отриманих зі свіжовиділених фрагментів тканини, середній діаметр сфероїдів становив 240 ± 69 мкм, а максимальний - 413 мкм.



Сфероїди в ПКК наднирників новонароджених поросят, отриманих зі свіжовиділених (А) і кріоконсервованих зі швидкістю охолодження 0,3 град / хв (Б) фрагментів тканини (13-та доба культивування).

Таким чином, дані, наведені в презентації, відображають основні результати роботи, яку було поділено на три групи експериментів, і дозволяють зробити наступні висновки.

1.При культивуванні нативних клітин наднирників новонароджених поросят у середовищах з додаванням 10% фетальної телячої сироватки спостерігається формування моношару, сферичних клітинних структур (сфероїдів), а також з′являються β-III-тубулін-позитивні нейроноподібні клітини. Сфероїди формуються внаслідок агрегації хромафінних клітин, а подальше їх збільшення обумовлене процесами проліферації клітин. При цьому β-III-тубулін-позитивні нейроноподібні клітини з′являються в культурі без додавання факторів росту.

2. Кріоконсервування первинної культури клітин наднирників новонароджених поросят у кріозахисних середовищах, що містять 5; 7,5; 10 і 15% ДМСО без сироватки або з додаванням 10 і 25% сироватки зі швидкістю охолодження 1 град/хв дозволяє зберегти значну кількість життєздатних клітин. Після відтаювання і рекультивування клітин також зберігаються основні морфологічні ознаки - спостерігається формування моношару, сфероїдів, з′являються клітини нейроноподібної морфології.

3.В культурах клітин, отриманих ферментативним методом з фрагментів наднирників , кріоконсервованих в середовищі з 10% ДМСО зі швидкістю охолодження 1, 5, 40 і 100 град/хв, не спостерігається формування моношару протягом 24-х діб культивування. В культурі клітин, отриманих з фрагментів наднирників, кріоконсервованих в середовищі з 10% ДМСО зі швидкістю охолодження 0,3 град/хв, спостерігається формування моношару, сфероїдів, а також з′являються β-III-тубулін-позитивні клітини нейрональної морфології.

Для довгострокового зберігання матеріалу наднирників можна обрати обидва підходи – кріоконсервування як первинної культури клітин, так і фрагментів тканини. В другому випадку швидкість охолодження має буди досить повільною (0,3 град/хв), оскільки використання швидкостей більш ніж 1 град/хв призводить до втрати клітинами багатьох властивостей і не дозволяє отримати ані моношарову культуру, ані сфероїди.