

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Реферат наукової роботи,
яка подається для участі у конкурсі зі здобуття
премії Президента України для молодих вчених у 2021 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ СФЕРОЇДОГЕНЕЗУ ТА ПЛАСТИЧНОСТІ КЛІТИН
НАДНИРНИКІВ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ТА РОЗРОБКА СПОСОБІВ ЇХ
ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ**

Сидоренко Ольга Сергіївна – кандидат біологічних наук, старший науковий
співробітник Інституту проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України

Актуальність дослідження.

Відомо, що надниркові залози відрізняються різноманіттям клітинного складу і, як наслідок, великою кількістю секреторних продуктів. Особливості розвитку наднирників в ембріогенезі спричиняють наявність в них клітин як мезодермального, так і ектодермального походження. Останні є похідними нервового гребеня і зберігають здатність до диференціювання та трансдиференціювання в нейрональному напрямку. Саме тому культура клітин наднирників широко використовується в якості об'єкта дослідження в різних галузях біології та медицини. Широке застосування клітин наднирників в експериментальних та клінічних дослідженнях обумовлює необхідність довгострокового зберігання біологічного матеріалу.

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

Наукова новизна роботи полягає в тому, що вперше було проведено порівняльні дослідження впливу умов ферментативного отримання, а також культивування (складу культурального середовища) на морфологічні особливості первинної культури клітин (ПКК) наднирників новонароджених поросят. Описано умови, за яких в ПКК наднирників з'являються сфероїди та нейроноподібні клітини.

В представленій роботі вперше в порівняльному аспекті проведено дослідження морфологічних особливостей клітин наднирників до та після кріоконсервування, а також їх поведінки при подальшому рекультивуванні. В роботі також вивчалася можливість отримання культури клітин з кріоконсервованих фрагментів тканини. На думку автора такий підхід до довгострокового зберігання біологічного матеріалу наднирників є більш зручним, ніж кріоконсервування культури клітин, оскільки дозволяє одразу заготовити велику кількість замороженої тканини, а в подальшому отримувати стільки клітин

і в той час, скільки і коли необхідно в кожному окремому випадку. Таким чином, вперше були отримані дані щодо чутливості тканини наднирників до кріоконсервування в середовищі з 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) з використанням різних швидкостей охолодження (0,3; 1; 5; 40 і >100 град/хв) і подальшої ферментативної обробки.

Практичне значення отриманих результатів.

Використання в експериментальних роботах клітин новонароджених поросят обумовлено, головним чином, схожістю багатьох фізіологічних і біохімічних параметрів організму свині і людини, що передбачає ймовірну схожість поведінки клітин обох видів *in vitro* (Lunney J.K., 2007). В роботі були підібрані умови, необхідні для культивування клітин наднирників новонароджених поросят у вигляді моношару. Показано, що без додаткової стимуляції в ПКК наднирників поступово зменшується кількість клітин, які експресують ключовий фермент синтезу глюкокортикоїдів - 3 β -гідроксистероїддегідрогеназу. Також встановлено, що в ПКК наднирників адреномедулярні клітини утворюють сфероїди (цитосфери), з яких в подальшому мігрують нейроноподібні β -III-тубулін позитивні клітини.

Результати кріоконсервування біологічного матеріалу, описані в даній роботі, свідчать про те, що для його довгострокового зберігання може бути обраний будь-який підхід: кріоконсервування первинної культури клітин або кріоконсервування фрагментів наднирників новонароджених поросят, залежно від плану експерименту і можливостей дослідника. Ці результати є унікальними, оскільки вперше демонструють можливість отримання сфероїдів та нейроноподібних клітин з кріоконсервованого матеріалу наднирників. Також вперше показано, що кріоконсервування в описаних умовах може бути інструментом для збагачення первинної культури сфероїдами.

Отримані результати та їх обговорення.

Великий обсяг виконаних робіт обумовлений наявністю багатьох задач відповідно до поставленої мети. На першому етапі роботи було досліджено первинні культури клітин наднирників, отримані зі свіжовиділеної тканини:

вивчалися морфологія окремих груп клітин та моношару в цілому, рівень функціональної активності клітин кори, проліферативні процеси тощо. Після цього ми здійснили спробу кріоконсервування біологічного матеріалу наднирників з метою його довгострокового зберігання в умовах кріобанку. Відповідно, на другому і третьому етапах ми досліджували зміни деяких з вищезазначених показників після кріоконсервування клітин первинної культури або цілих фрагментів тканини.

Морфофункціональні особливості культури клітин надниркових залоз новонароджених поросят, отриманих з нативних фрагментів тканини.

Досліджуючи потребу ПКК наднирників у вмісті сироватки, ми встановили, що найкращі показники формування моношару спостерігалися при культивуванні в середовищах з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (ФТС). У цьому випадку після 1-ї доби культивування до поверхні прикріплялося $71,7 \pm 5,7\%$ посаджених клітин, більша частина з них розпластувалися. Після досягнення 80% конфлуентності (на 3-5-ту добу) на моношарі формувалися сфероподібні структури, що склалися з декількох клітин – сфероїди або цитосфери (рис.1, А), які при подальшому культивуванні збільшувалися в розмірі. Для формування сфероїдів виявилось необхідним присутність 10% ФТС. У середовищі без ФТС навіть у разі додавання EGF і bFGF сфероїди не формувалися.

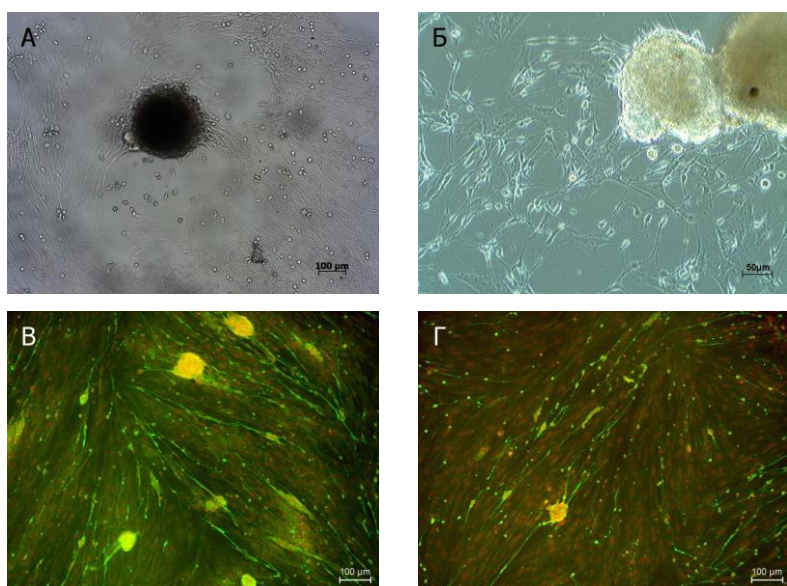


Рис.1. Сфероїди в ПКК наднирників, 14-та доба культивування (А) і виселення нейроноподібних клітин зі сфероїда, 5-та доба після пересіву (Б). Імуноцитохімічне забарвлення β -III-тубуліну (зелена флуоресценція) при культивуванні сфероїдів в середовищі без NGF (В) і при додаванні NGF (Г). Ядра забарвлені пропідій йодідом (червона флуоресценція).

З літературних даних відомо, що медулярні клітини наднирників при культивуванні мають тенденцію групуватися в кластери по декілька клітин. Для ідентифікації розподілу хромафінних адреномедулярних клітин в ПКК наднирників ми проводили імуноцитохімічне забарвлення специфічного маркера цієї клітинної популяції - хромограніну А (CgA). Було встановлено, що відносна кількість CgA-позитивних (CgA⁺) клітин серед клітин моношару поступово знижується (рис. 2).

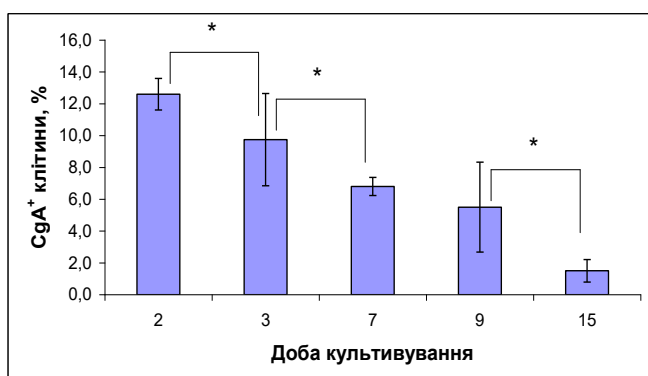


Рис.2. Відносна кількість CgA⁺ клітин серед клітин моношару в ПКК наднирників. Примітка: * - відмінності статистично достовірні, $p < 0,05$.

Так, на 2-гу добу культивування в ПКК наднирників частка CgA⁺ клітин серед клітин моношару становила $12,6 \pm 1,0\%$, а на 15-ту добу – лише $1,5 \pm 0,7\%$. В той же час в ПКК наднирників вже на 3-тю добу спостерігалися невеликі групи CgA⁺ клітин. В подальшому CgA⁺ клітини зосереджувалися переважно в сфероїдах, а поодинокі CgA⁺ клітини зрідка зустрічалися серед клітин моношару.

Оскільки протягом культивування розмір сфероїдів збільшувався, ми припустили, що це може бути пов'язане з процесами клітинної проліферації всередині сфероїдів. Для перевірки цього припущення ми провели культивування з додаванням BrdU – аналогом нуклеозиду тимідину, який здатен до вбудови в молекулу ДНК проліферуючої клітини. Нами було встановлено, що в моношарі, а також в сфероїдах присутні проліферуючі клітини.

Для визначення функціональної активності стероїдпродукуючих клітин кори в ПКК наднирників ми досліджували активність 3β -HSD в клітинах, а також концентрацію кортизолу в культуральному середовищі в різні терміни культивування. Відносна кількість 3β -HSD-позитивних клітин (3β -HSD⁺) в

загальній суспензії клітин, отриманих з наднирників, становила $48,4 \pm 3,3\%$ (рис.3). Надалі кількість $3\beta\text{-HSD}^+$ клітин поступово знижувалася і до 18-ї доби культивування становила $1,8 \pm 1,0\%$.

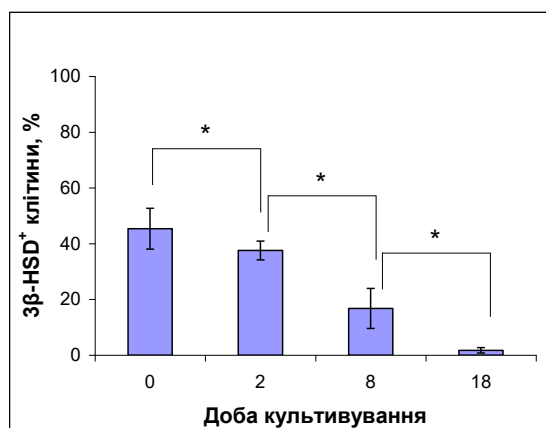


Рис.3. Відносна кількість $3\beta\text{-HSD}^+$ клітин у вихідній суспензії (0-ва доба), а також в культурі в різні терміни культивування. Примітка. * - відмінності статистично достовірні, $p < 0,05$.

Ми припустили, що сфероїди, які ми спостерігали в ПКК наднирників новонароджених поросят, можуть містити прогеніторні клітини (Chung K.F. et al, 2009; Santana M.M. et al, 2012). Для перевірки можливості нейронального диференціювання клітин у складі сфероїдів ми провели серію експериментів, в яких сфероїди відкріпляли і пересівали в середовище аналогічного складу, або в середовище з додаванням NGF. Після пересіву сфероїди прикріплялися до підложки, після чого спостерігалася міграція з них клітин двох морфологічних типів: фібробластоподібних, а також нейроноподібних клітин з відростками, що формували мережі (рис.1,Б). На стадії міграції клітин зі сфероїдів ми проводили імуноцитохімічне забарвлення $\beta\text{-III-тубуліну}$ і S-100 як маркерів нейронів і гліальних клітин, відповідно. Виселення зі сфероїдів $\beta\text{-III-тубулін}$ позитивних нейроноподібних клітин спостерігалася у всіх експериментах, незалежно від додавання NGF в середовище культивування (рис.1,В,Г). Імуноцитохімічне забарвлення маркера астроцитів S-100 не дало позитивного результату. Відомо, що NGF-індуковане диференціювання адреномедулярних прогеніторних клітин в нейрональному напрямку можливе лише за відсутності глюкокортикоїдів в середовищі культивування (Doupe AJ et al, 1985). На початковому етапі культивування концентрація кортизолу поступово зростала, сягаючи максимальних значень до 6-7-ї доби ($30,3 \pm 7,3$ нмоль / л), а потім знижувалася

(рис.4).. Після трьох тижнів культивування вміст кортизолу в середовищі становив не більше 14% від максимальних значень, які спостерігалися на 6-7-му добу культивування, і дорівнював 4,2 нмоль/л.

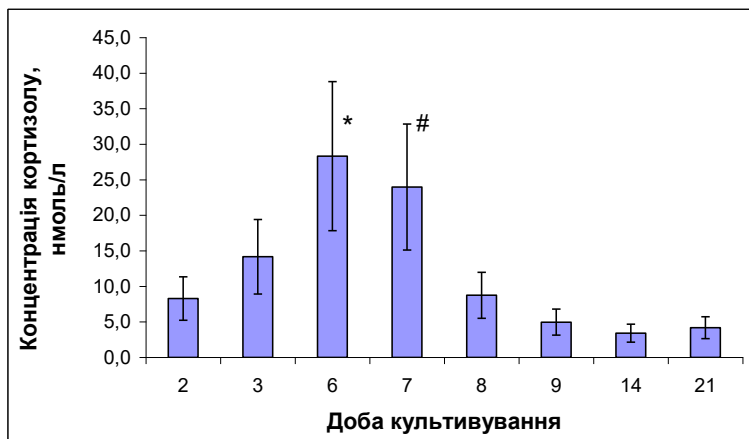
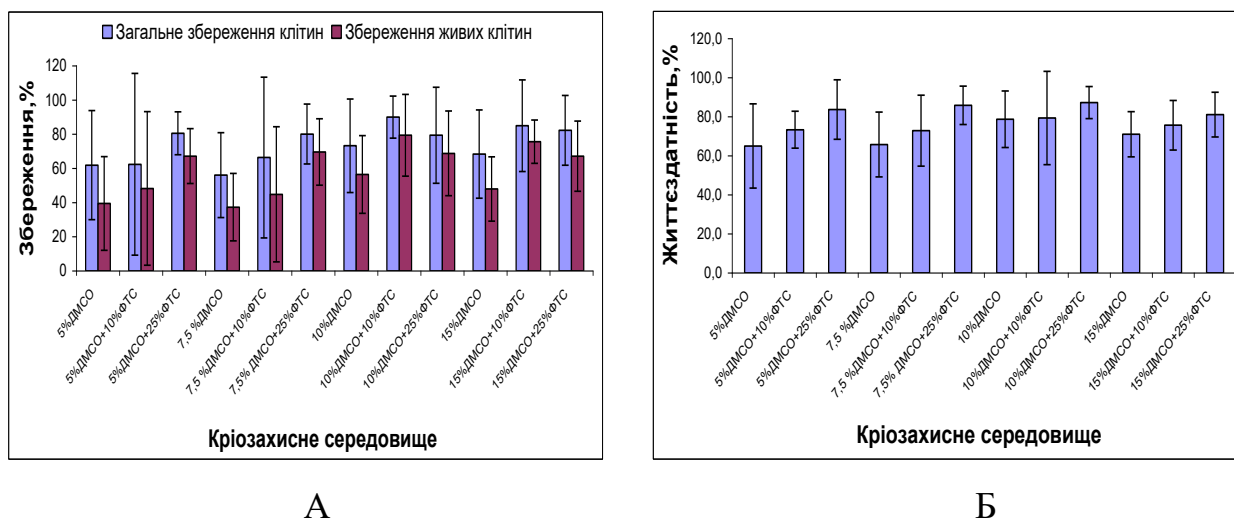


Рис.4. Зміна концентрації кортизолу в середовищі культивування клітин наднирників новонароджених поросят. Примітки: * - відмінності достовірні відносно 3-ї доби, # - відмінності достовірні відносно 8-ї доби, $p < 0,05$.

Таким чином, поява клітин з нейроноподібною морфологією в ПКК наднирників не залежала від присутності NGF в середовищі, але спостерігалася на тлі зниженої концентрації кортизолу.

Вивчення можливості отримання культури клітин наднирників новонароджених поросят з кріоконсервованого матеріалу. В експериментах з кріоконсервування ПКК наднирників були використані концентрації ДМСО від 5 до 15%. У паралельній серії експериментів до кріозахисного середовища з аналогічними концентраціями ДМСО додавали 10 або 25% ФТС. Збереження клітин, кріоконсервованих в описаних середовищах, коливалася від $62,4 \pm 17,1\%$ до $89,0 \pm 17,6\%$ (рис.5,А). Найбільші показники життєздатності виявлялися в зразках, кріоконсервованих в середовищі з 5; 7,5; 10, 15% ДМСО у поєднанні з 25% ФТС (рис.5,Б). У цих пробах життєздатність становила від $87,1 \pm 8,4\%$ до $91,0 \pm 6,2\%$. При додаванні до кріозахисного середовища ФТС спостерігалася тенденція до збільшення життєздатності клітин із збільшенням концентрації ФТС (рис.5,Б).



А

Б

Рис.5. Залежність збереження (А) і життєздатності (Б) клітин наднирників новонароджених поросят від концентрації ДМСО і ФТС в середовищі після кріоконсервування.

У всіх зразках кріоконсервованих ПКК наднирників вже на 2-гу добу культивування були виявлені сфероїди, а при подальшому культивуванні спостерігалась міграція нейроноподібних клітин зі сфероїдів.

На наступному етапі роботи ми досліджували можливість отримання ПКК з фрагментів тканини, кріоконсервованих під захистом 10% ДМСО з різними швидкостями охолодження. Нами були обрані швидкості охолодження 0,3; 1; 5; 40 і 100 град/хв. При культивуванні клітин, отриманих з кріоконсервованих фрагментів, заморожених зі швидкостями охолодження 1 град/хв, 5 град/хв, 40 град/хв і 100 град/хв до 3-ї доби спостерігались поодинокі живі клітини, які плавали у середовищі, а також прикріпилися, але не розпластувалися. При культивуванні клітин, отриманих з фрагментів, заморожених зі швидкістю охолодження 0,3 град/хв, через 1-ну добу культивування 82,6% посаджених клітин прикріпилися до підложки. Надалі ці клітини поведилися в культурі так само, як клітини, отримані з нативних фрагментів тканини. Спостерігалось розпластування клітин, формування конфлуентного моношару і сфероїдів. Зовнішній вигляд сфероїдів, тенденція до збільшення в розмірі відповідали даним характеристикам в культурі клітин, отриманих з нативних фрагментів тканини надниркових залоз. Проте, було відмічено, що частота формування сфероїдів до 15-ї доби становила 1461 ± 199 сфероїдів на 1 млн посаджених клітин (в ПКК,

отриманої з нативних фрагментів - 404 ± 160). Вочевидь, кріоконсервування фрагментів тканини наднирників новонароджених поросят під захистом 10% ДМСО зі швидкістю охолодження 0,3 град/хв сприяє в більшій мірі збереженню клітин, що формують сфероїди, порівняно з клітинами інших популяцій. Однак сфероїди в ПКК, отриманих з кріоконсервованих фрагментів тканини, були набагато дрібніші в діаметрі, ніж сфероїди в ПКК, отриманих з нативних фрагментів тканини. На рис. 6 представлені дані щодо розподілу сфероїдів різного діаметру в культурах, отриманих з нативних і кріоконсервованих зі швидкістю охолодження 0,3 град/хв фрагментів наднирників. При відкріпленні і пересіві сфероїдів спостерігалася NGF - незалежна міграція β -III-тубулін позитивних клітин нейрональної морфології із сфероїдів.

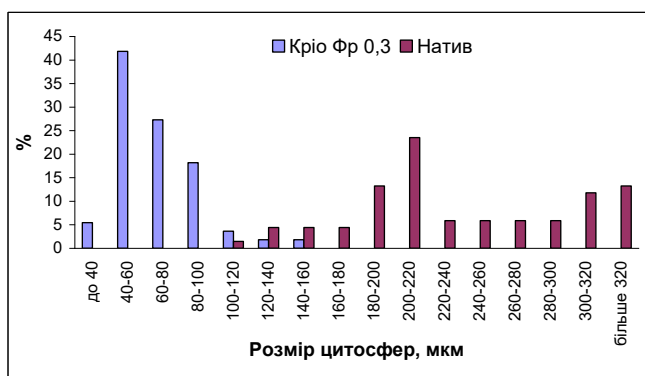


Рис. 6. Розподіл сфероїдів різного діаметру в ПКК, отриманих з кріоконсервованих зі швидкістю охолодження 0,3 град/хв (кріо Фр 0,3) і нативних фрагментів тканини.

Таким чином, кріоконсервування клітин первинної культури, а також фрагментів тканини наднирників новонароджених поросят (зі швидкістю охолодження 0,3 град/хв) дозволяє зберегти достатню кількість клітин, здатних прикріплюватися і розпластуватися на поверхні культивування, а також формувати конфлуентний моношар. При цьому зберігається популяція клітин, що формують сферичні структури – сфероїди, і клітин нейрональної морфології.

Узагальнення та висновки.

1. При культивуванні нативних клітин наднирників новонароджених поросят спостерігається формування моношару, сфероїдів, а також з'являються β -III-тубулін-позитивні нейроноподібні клітини. Кількість адренкортикальних клітин, які експресують 3β -HSD, поступово знижується. Концентрація

кортизолу в середовищі знижується після 6-ї доби культивування. При цьому β -III-тубулін-позитивні нейроноподібні клітини з'являються в культурі в умовах зниження концентрації кортизолу.

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 субкультивування клітин наднирників спостерігається формування моношару, сфероїдів, з'являються клітини нейроноподібної морфології, а також зберігається здатність до синтезу і секреції кортизолу.
3. В культурах клітин, отриманих ферментативним методом з фрагментів наднирників новонароджених поросят, 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.

Матеріали представленої роботи викладено у 28 публікаціях. Серед них 13 наукових статей, зокрема 5 статей у англomовних журналах з імпакт-фактором, а також один патент на корисну модель. Загальна кількість посилань на публікації автора – 22 (згідно Google Scholar) та 5 (згідно Scopus), h-індекс становить 3 (згідно Google Scholar) та 2 (згідно Scopus).

К.б.н., с.н.с.

відділу кріоендокринології

ІПКіК НАН України

Сидоренко О.С.