

●● КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ●● CELL BIOLOGY ●●

УДК: 611.45.085.23"464":57.086.83

Експресія β -III-тубуліна в культурі кліток неонатальних надпочечників: сравнение монослойного и 3D-культивирования
Е.М.Плаксіна, О.С.Сидоренко, Е.И.Легач, И.Ф.Коваленко, Г.А.Божок*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
bozhokgaru@gmail.com*

Исследованы некоторые морфофункциональные особенности культуры клеток надпочечников новорожденных поросят при культивировании на поверхности с разной степенью адгезивности. Показано, что при культивировании на адгезивной поверхности формируется монослой из клеток фибробластоподобной морфологии (монослойное культивирование). При культивировании на низкоадгезивной поверхности клетки собираются в трехмерные сфероиды, которые пребывают в культуре во флотирующем состоянии (3D-культивирование). Прикрепленные сфероиды со временем формируются и в адгезивных условиях на монослое из фибробластоподобных клеток. Как в случае прикрепленных, так и флотирующих сфероидов при переносе их на адгезивную поверхность наблюдается миграция из них клеток двух морфологических типов – фибробластоподобных и нейробластоподобных. Иммуоцитохимическое окрашивание нейробластоподобных клеток, которые выселяются из сфероидов обоих типов, показало экспрессию нейронального маркера β -III-тубулина. Количество фибробластоподобных клеток, мигрирующих из флотирующих сфероидов, перенесенных в адгезивные условия, обратно пропорционально длительности предварительного 3D-культивирования. Данный подход позволяет получить «чистую» культуру нейробластоподобных клеток, не контаминированную фибробластами.

Ключевые слова: культура клеток надпочечников, монослойное культивирование, 3D-культивирование, цитосферы, сфероиды, β -III-тубулин, нейробласты.

Експресія β -III-тубуліну в культурі клітин неонатальних наднирників: порівняння моношарового і 3D-культивування
К.М.Плаксіна, О.С.Сидоренко, Є.І.Легач, І.Ф.Коваленко, Г.А.Божок

Досліджено деякі морфофункціональні особливості культури клітин наднирників новонароджених поросят при культивуванні на поверхні з різним ступенем адгезивності. Показано, що при культивуванні на адгезивній поверхні формується моношар з клітин фібробластоподібної морфології (моношарове культивування). При культивуванні на низкоадгезивній поверхні клітини збираються у тривимірні сфероїди, які перебувають в культурі у флотуючому стані (3D-культивування). Прикріплені сфероїди згодом формуються також в адгезивних умовах на моношарі з фібробластоподібних клітин. Як у випадку прикріплених, так і флотуючих сфероїдів при перенесенні їх на адгезивну поверхню спостерігається міграція з них клітин двох морфологічних типів – фібробластоподібних та нейробластоподібних. Імуоцитохімічне забарвлення нейробластоподібних клітин, які виселяються зі сфероїдів обох типів, показало експресію нейронального маркера β -III-тубуліну. Кількість фібробластоподібних клітин, що мігрують з флотуючих сфероїдів, перенесених в адгезивні умови, обернено пропорційна тривалості попереднього 3D-культивування. Даний підхід дозволяє отримати «чисту» культуру нейробластоподібних клітин, які не контаміновані фібробластами.

Ключові слова: культура клітин наднирників, моношарове культивування, 3D-культивування, цитосфери, сфероїди, β -III-тубулін, нейробласти.

Expression of β -III-tubulin in the neonatal adrenal cell culture: comparison of monolayer and 3D-culture
K.M.Plaksina, O.S.Sidorenko, Y.I.Legach, I.F.Kovalenko, G.A.Bozhok

Some morphofunctional features of newborn piglets adrenal cell cultures obtained on the surfaces with different degrees of adhesiveness have been studied. It has been shown that during cultivation on adhesive surfaces a monolayer of fibroblast-like cells is formed (monolayer culture). When cultivated on a low-adhesive

surface, the cells are assembled into three-dimensional spheroids that are in a floating state (3D culture). On adhesive surfaces, attached spheroids are eventually formed on the monolayer of fibroblast-like cells. When attached or floating spheroids are transferred to an adhesive surface migration of two morphological types of cells is observed – fibroblast-like and neuroblast-like cells. Immunocytochemical staining of neuroblasts, which migrate from both types of spheroids, showed the expression of neuronal marker β -III-tubulin. The number of fibroblast-like cells migrating from floating spheroids that were transferred to adhesive conditions is inversely proportional to the duration of the preliminary 3D culture. This approach allows obtaining a "pure" neuroblasts culture, which is uncontaminated by fibroblasts.

Key words: *adrenal cell culture, monolayer culture, 3D-culture, cytospheres, spheroids, β -III-tubulin, neuroblasts.*

Введение

Монослойное клеточное культивирование является традиционной моделью для исследования поведения клеток тех или иных органов и тканей *in vitro*. При этом возможно получить сведения о скорости пролиферации клеток, их метаболической активности, гормонопродукции, дифференцировке и т.д. Однако для многих клеток организма монослойное культивирование является не совсем адекватной моделью для изучения биохимических и физиологических процессов, поскольку в составе ткани клетки находятся в определенном микроокружении, создающем специфические условия их функционирования.

Учитывая это, в последнее время разрабатываются условия для 3D-культивирования, позволяющие получать многоклеточные сферические образования (Gong et al., 2015). В различных научных источниках авторы называют их по-разному: агрегатами, мультিকлеточными сфероидами или цитосферами (Ivascu, Kubbies, 2006; Сукач, Ляшенко, 2011; Gong et al., 2015; Антоневич и др., 2012). Структура и размер многоклеточных образований зависят от типа клеток, состава питательной среды, адгезивности культуральной поверхности, использования специальных приемов (культивирование в висючей капле, ротационное культивирование, подложки с заданной микроструктурой) (Kinney et al., 2014; Morimoto et al., 2015; Knight, Przyborski, 2015; Ahmed, 2009; Ivascu, Kubbies, 2006; Song et al., 2004; Nyberg et al., 2005).

Одним из способов получения многоклеточных сфероидов является культивирование в культуральной посуде с неадгезивной поверхностью (Carlsson, Yuhas, 1984; Ivascu, Kubbies, 2006; Friedrich et al., 2009). Поскольку в таких условиях клетки не способны прикрепиться к поверхности культивирования, они самоорганизуются в ансамбли, содержащие от одного до нескольких типов клеток.

Установлено, что клетки, культивированные в составе многоклеточных образований, отличаются от клеток монослойных культур по некоторым структурно-функциональным признакам (Ramgolam et al., 2011; Малюгин и др., 2013; Vuyn et al., 2014). Эта закономерность была показана для клеточ-производных нервного гребня, выделенных из роговицы и кожи (Ramgolam et al., 2011; Vuyn et al., 2014). В составе многоклеточных сфероидов такие клетки проявляли свойства более ранних прогениторов по сравнению с клетками, пребывавшими в монослое (Li et al., 2015; Vuyn et al., 2014).

Известно, что мозговое вещество надпочечников формируется в эмбриогенезе из клеток-производных нервного гребня, относящихся к симпато-адреналовой линии (Сосунов, 1999). Было установлено, что в условиях культивирования при использовании бессывороточной среды и ростовых факторов небольшая часть клеток, полученных из эмбриональных и неонатальных надпочечников, проявляет свойства стволовых/прогениторных клеток (Chung et al., 2009; Saxena et al., 2013).

Общепризнано, что микроокружение является очень важным, а в некоторых случаях определяющим фактором самообновления и поддержания пула стволовых клеток (Петренко и др., 2011; Терских, Васильев, 2004; Репин и др., 2002). Возможно, приемы 3D-культивирования, примененные к клеткам, происходящим из нервного гребня, позволят установить новые характеристики, отличные от тех, что были получены ранее при монослойном культивировании. В данной работе была проведена разработка условий культивирования для получения многоклеточных сфероидов из надпочечников новорожденных поросят.

Выбор вида животного диктовался тем, что надпочечники мелких лабораторных грызунов (крыс, мышей) имеют значительные физиологические и биохимические отличия от надпочечников человека (Gong et al., 2015). Организм свиньи, напротив, по многим параметрам сходен с

человеческим, что позволяет использовать этих животных в биомедицинских исследованиях в качестве адекватной модели (Kuzmuk, Schook, 2011).

Цель работы – подбор условий получения мультиклеточных сфероидов из надпочечников новорожденных поросят в культуре, а также сравнительное изучение их некоторых морфологических и фенотипических особенностей в условиях монослойного и объемного (3D) культивирования.

Материалы и методы исследования

Получение суспензии клеток. Для получения суспензии клеток использовали надпочечники поросят 1–2-суточного возраста пород крупная белая и украинская мясная. После извлечения органы помещали в охлажденную среду DMEM/F12 (Biowest, Франция) или 199 (PAA Laboratories, Австрия) с растворенными в ней 200 Ед/мл бензилпенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина (оба «Артеріум», Украина) и 5 мкг/мл амфотерицина В (Biowest), и измельчали на фрагменты размером до 1 мм³. Фрагменты ткани отмывали от крови 2–3 раза средой с антибиотиками и подвергали ферментативной обработке в растворе, приготовленном на среде и содержащем 1 мг/мл коллагеназы тип IA (Sigma, США) и 0,1 мг/мл ДНКазы (Sigma).

Ферментативную обработку проводили в три этапа (30, 10, 10 мин) на водяной бане при температуре 37°C и постоянном встряхивании. Для инактивации ферментов после каждого этапа отделившиеся клетки отбирали в пробирку с охлажденной фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Biowest). Клетки, полученные после трех последовательных этапов, объединяли и отмывали от ферментов в 0,2% растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma) на среде DMEM/F12 путем трехкратного центрифугирования (1 мин при 3000 об/мин и дважды по 3 мин при 1500 об/мин). После отмывки суспензию клеток фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Количество и жизнеспособность клеток в полученной суспензии оценивали по стандартной методике с помощью окрашивания 0,4% раствором трипанового синего, который добавляли к суспензии клеток в соотношении 1:1. В среднем жизнеспособность полученных клеток составляла 85%.

Объемное (3D) культивирование. Клетки культивировали в пластиковых чашках Петри с площадью дна 8,8 см² (НПЛ Гранум, Украина) и низкоадгезивной поверхностью. Для получения низкоадгезивной поверхности чашки обрабатывали по методу Hammarback (Hammarback et al., 1985). Флотирующие цитосферы, полученные в низкоадгезивных условиях, на разные сутки культивирования переносили в 24-луночные планшеты с нормальной адгезивной поверхностью с площадью дна одной лунки 1,864 см² (TPP, Швейцария).

Монослойное культивирование. Клетки культивировали в пластиковых культуральных флаконах с площадью дна 25 см² и нормальной адгезивной поверхностью (SPL Life sciences, Корея).

Объемное и монослойное культивирование проводили с использованием базовой питательной среды 199 или DMEM/F12 с добавлением антибиотиков (200 Ед/мл бензилпенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина), амфотерицина В (5 мкг/мл), 10% ФТС при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Посевная концентрация составляла 2,5–5×10⁵ кл/мл, при этом в чашку Петри вносили 2 мл, а в культуральный флакон 4 мл суспензии. Замену среды осуществляли каждые 3–4 дня. При объемном культивировании производили замену половины объема среды. При монослойном культивировании среду полностью заменяли на свежую.

Окраска гематоксилином и эозином. Клеточный монослой фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma) в течение 30 минут, затем отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH=7,4) и выдерживали по 1 минуте в растворах спирта убывающих концентраций (96%, 80%, 70%). После удаления спирта монослой клеток помещали на 5 минут в гематоксилин. Затем гематоксилин удаляли, клетки промывали проточной водой и помещали на 1 минуту в эозин. После удаления эозина клеточный монослой выдерживали по 1 минуте в растворах спирта возрастающих концентраций (70%, 80%, 96%) и заключали под PBS с глицерином (1:1).

Процент клеточного монослоя оценивали с помощью сканирования дна планшета с окрашенными гематоксилином и эозином клетками на сканере Epson Perfection V10 (Япония).

Подсчеты относительной площади, занимаемой монослоем клеток, проводили с помощью программы AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Германия), выражали в процентах и вычисляли по формуле: $S_{\text{монослоя}} = S_{\text{окрашенного участка}} / S_{\text{лунки}} \times 100$.

Иммуноцитохимические исследования. Для определения экспрессии β -III-тубулина использовали первичные мышинные антитела к β -III-тубулину (Abcam, Великобритания, 1:200) и вторичные козы анти-мышинные HiLyte Fluor 488-конъюгированные антитела (Abcam, 1:400). Образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на PBS в течение 15 мин. Отмывали PBS 3 раза по 5 минут. Пермеабиллизацию проводили в 0,3% растворе Triton X-100 (Sigma) на PBS в течение 10 минут. Блокировали неспецифическое связывание антител раствором PBS, содержащим 0,1% Triton X-100, 1% БСА, 0,3 М глицин (Reanal, Венгрия) на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами проводили при +4°C на протяжении ночи, затем отмывали 3 раза PBS. Инкубацию со вторичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте, затем отмывали 3 раза PBS. Антитела готовили на растворе PBS, содержащем 0,1% Triton X-100, 1% БСА.

Микроскопия и морфометрический анализ. Микрофотосъемку осуществляли с помощью светооптического микроскопа AmScope, модель XYL-403 (Китай) с цифровой камерой и на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Германия). Морфометрический анализ проводили по микрофотографиям с использованием программы AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

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

Результаты

На рис. 1 представлены микрофотографии, позволяющие охарактеризовать основные этапы формирования цитосфер в течение всего периода культивирования (28 суток).

Заметно, что в начальные сутки пребывания в условиях объемного культивирования клетки, взвешенные в питательной среде, собираются в небольшие агрегаты (рис. 1, А). На 5–6 сутки большинство агрегатов приобретают правильную сферическую форму, их поверхность становится более однородной (рис. 1, Б). Кроме того, в среде наблюдаются флотирующие агрегаты клеток неправильной формы, которые, по-видимому, представляют собой нежизнеспособные клетки и клеточный дебрис. К 11-м суткам цитосферы продолжают увеличиваться в размерах. Практически исчезают неоформленные мелкие агрегаты (рис. 1, В). На 24–28 сутки культивирования цитосферы выглядят плотными образованиями, состоящими из большого количества морфологически однородных клеток с четкой границей (рис. 1, Г). На поверхности цитосфер часто можно было наблюдать появление клеток, имеющих прозрачную цитоплазму и округлую форму.

При монослойном культивировании клетки прикреплялись к поверхности культурального пластика после 1-х суток и формировали монослой из фибробластоподобных клеток к 5–7 суткам (рис. 1, Д). Впоследствии на монослое образовывались прикрепленные цитосферы с выселяющимися нейробластоподобными клетками, флотирующих цитосфер не наблюдалось (рис. 1, Е).

На рис. 2 представлены данные о количестве и размере цитосфер в условиях объемного культивирования на разные сутки. Заметно, что после первых 4 суток достоверно уменьшается количество цитосфер (рис. 2, А) и в это же время увеличивается их диаметр (рис. 2, Б). Это может свидетельствовать о том, что на начальных этапах культивирования формирование цитосфер происходит за счет агрегации клеток. Кроме того, происходит распад агрегатов, состоящих из нежизнеспособных клеток. В дальнейшем размер цитосфер увеличивается незначительно, вероятно, вследствие деления клеток.

При перенесении цитосфер, полученных в течение первых 10 суток в 3-D культуре, на поверхность с нормальной адгезией наблюдалось их прикрепление в течение нескольких часов. После прикрепления из цитосфер выселялись клетки разной морфологии: большие распластанные фибробластоподобные с крупным ядром и ядрышками и мелкие нейробластоподобные с одним или двумя отростками (рис. 3, А).

При дальнейшем культивировании клетки первого типа образовывали монослой (рис. 3, Б). Клетки второго типа расселялись на монослое, их отростки удлинялись и формировали сети (рис. 3, В).

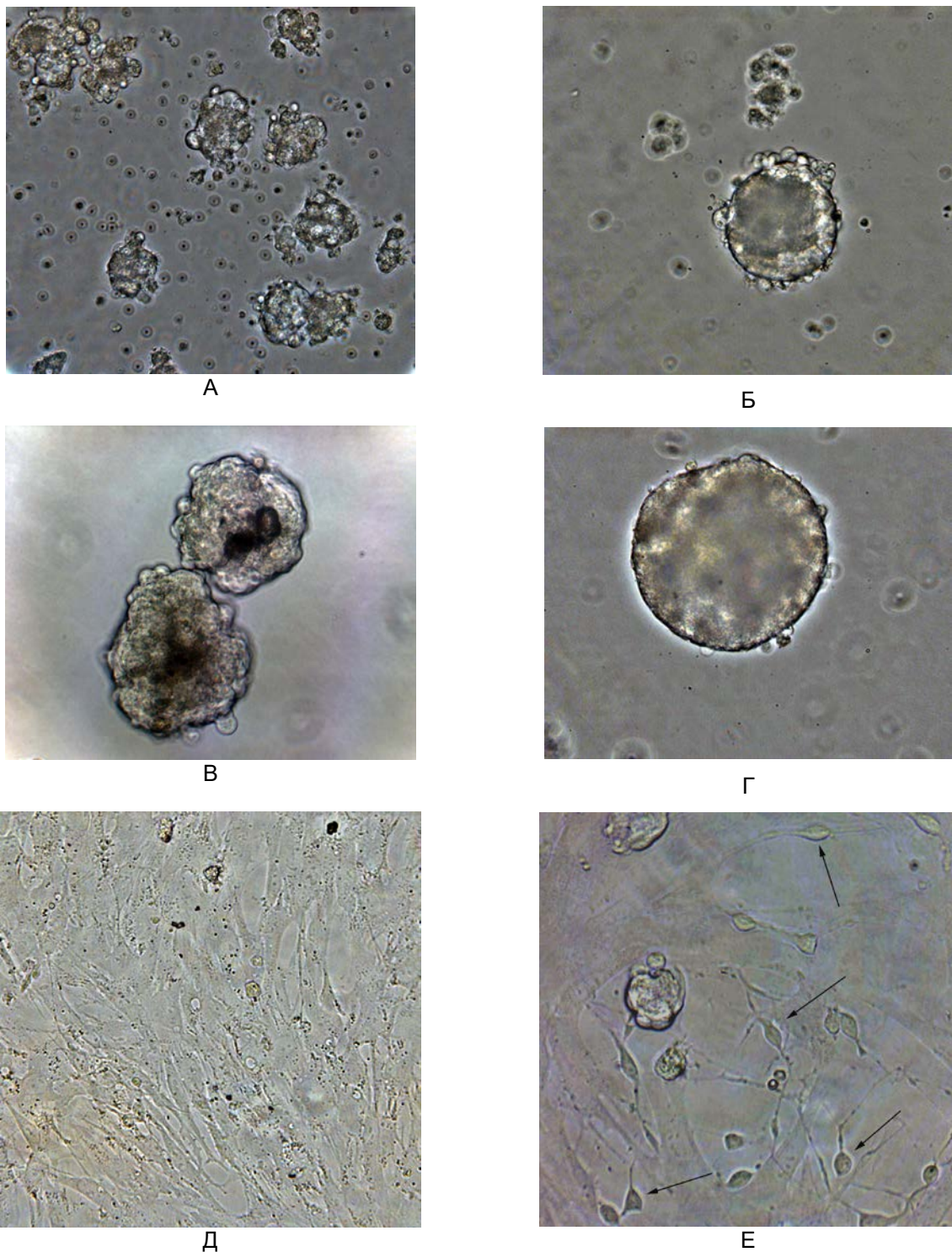
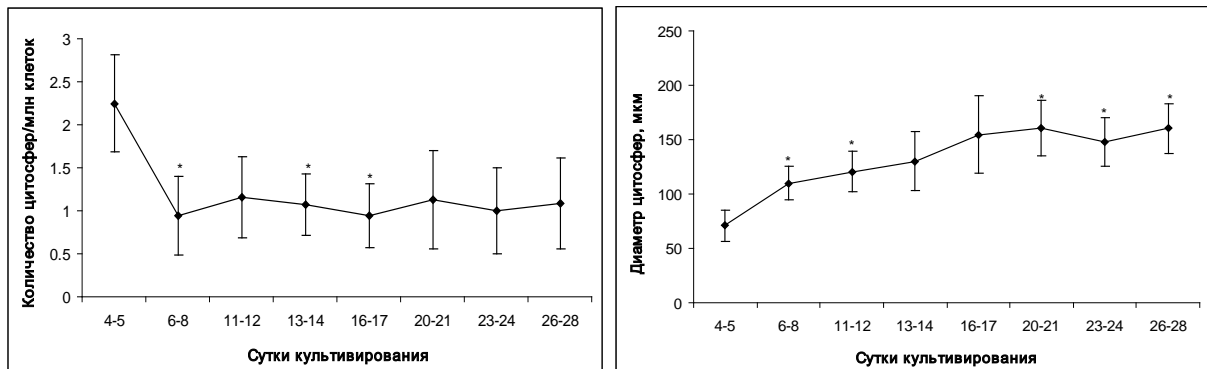


Рис. 1. Морфологія культури клітин надпочечників новонароджених поросят при об'ємному (А, Б, В, Г) і монослойном (Д, Е) культивуванні: А – 2 сутки, Б – 6 сутки, В – 11 сутки, Г – 26 сутки, Д – 5 сутки, Е – 8 сутки. Стрелки вказують на клітини з нейробластоподобної морфологією. Увеличення: А, Б, В, Г – об'єктив 20х, окуляр 10х; Д, Е – об'єктив 40х, окуляр 10х



А Б

Рис. 2. Количество (А) и диаметр (Б) цитосфер на разные сутки в условиях объемного культивирования

* различия достоверны по сравнению с 4–5 сутками ($p < 0,05$).

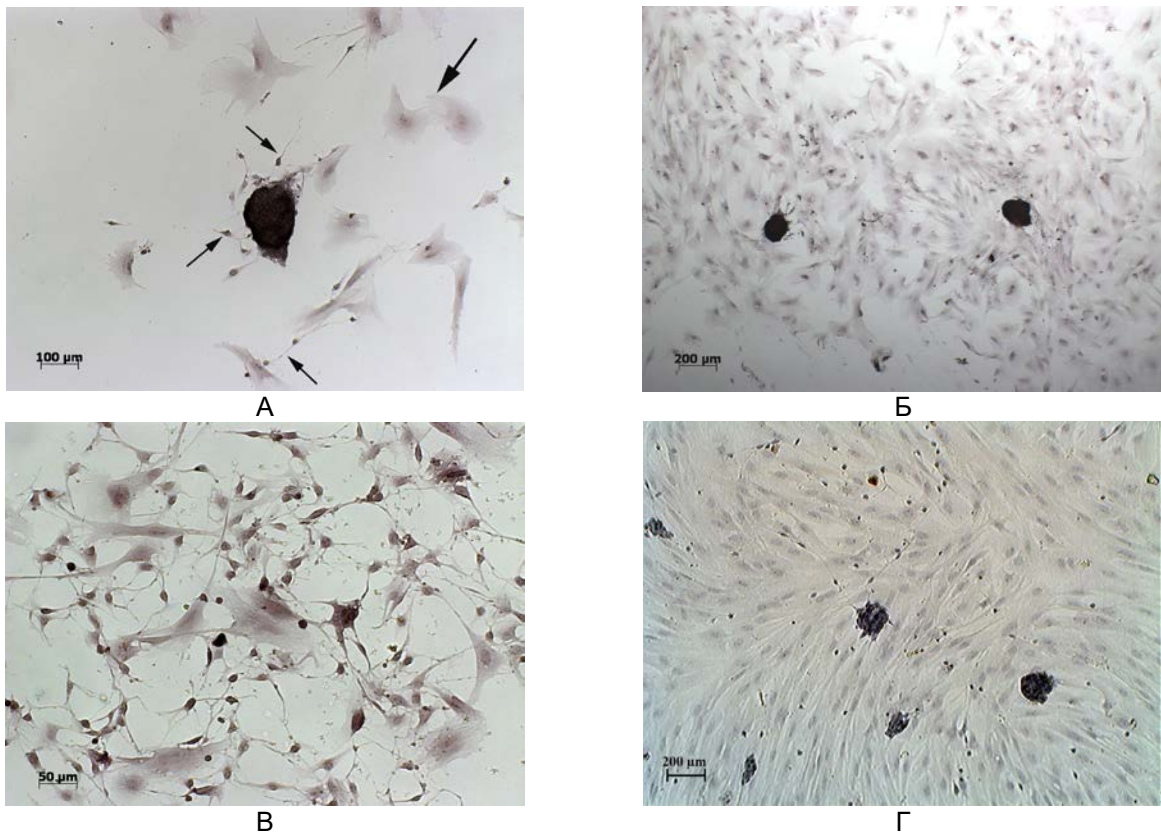


Рис. 3. Формирование монослоя и выделение нейробластоподобных клеток из цитосфер. А – прикрепление цитосфер, полученных в 3D-культуре, после переноса в стандартные (адгезивные) условия на 10 сутки. Наблюдается выселение 2 типов клеток: фибробластоподобных (крупная стрелка) и нейробластоподобных (маленькая стрелка). Б – образование монослоя из выселившихся клеток на 7 сутки после переноса цитосфер в стандартные условия, В – формирование сетей клетками неробластоподобной морфологии на 11 сутки после переноса цитосфер в стандартные условия, Г – монослой и прикрепленные цитосферы с выселяющимися клетками неробластоподобной морфологии, полученные в стандартных условиях культивирования. Окраска: гематоксилин и эозин.

В цілому, після перенесення цитосфер, отриманих в 3D-культурі, на адгезивну поверхню морфологічна картина нагадувала ту, яка спостерігалася при монослойном культивуванні: прикріплені цитосфери з виселяючимися клітками нейрональної морфології, розташовані на монослой из фибробластоподобних кліток (рис. 3, Г).

Отриманий результат міг означати, що при розміщенні суспензії кліток надпочечників в об'ємні умови культивування в агрегати збираються по меншій мірі 2 типи кліток, які мають здатність до прикріплення і активного ділення в складі монослой. Оскільки надпочечник, з якого отримували суспензію кліток, має з'єднанийтканню капсулу, наявність фибробластів в культурі кліток цілком пояснимо.

Відомо, що фибробласти мають високу здатність до проліферації при створенні сприятливих умов, тому для очищення первинних культур кліток від даної контамінуючої популяції використовують різні підходи: неадгезивні культуральні поверхні (Dalby et al., 2003), введення в поживну середу спеціальних добавок, які перешкоджають фибробластному росту (Wei et al., 2009; Kaewkhaw et al., 2012; Pilling, Gomer, 2012), культивування на спеціальних кондиціонованих середах (Park et al., 2012; Wang et al., 2008), зниження концентрації сироватки (Kulkarni, McCulloch, 1994), імуномагнітну адсорбцію і сепарацію кліток (Chen et al., 1993; Kisselbach et al., 2009; Agle et al., 2015; Sincennes et al., 2017), обробку культури хелаторами і ферментами (Jin et al., 2008; Niapour et al., 2010).

Ми передположили, що тривале перебування кліток в умовах відсутності адгезії при об'ємному культивуванні повинно сприяти зменшенню популяції фибробластоподобних кліток, тому в результаті можливо отримати чисту культуру нейробластоподобних кліток. Для перевірки даного передположення цитосфери перенесли з низкоадгезивних в стандартні умови на різні терміни культивування (4, 7, 11, 14, 17, 21, 24, 28 днів). Культивувати продовжували до того, поки фибробластоподобні клітки не формували монослой (в середньому до 10 днів).

З даних, представлених на рис. 4, випливає, що конфлюентного монослой не було досягнуто ні в одній з проб. Площа формуючого фибробластоподобними клітками монослой зменшувалася при збільшенні терміну попереднього об'ємного культивування цитосфер. При перенесенні цитосфер на 4 дні цей показник склав 51 ± 5 %, на 7 днів 42 ± 6 %, на 11 днів $1,3 \pm 0,5$ %. При перенесенні цитосфер в стандартні умови культивування на 14, 17, 21, 24 і 28 днів в культурі практично не спостерігалось фибробластоподобних кліток.

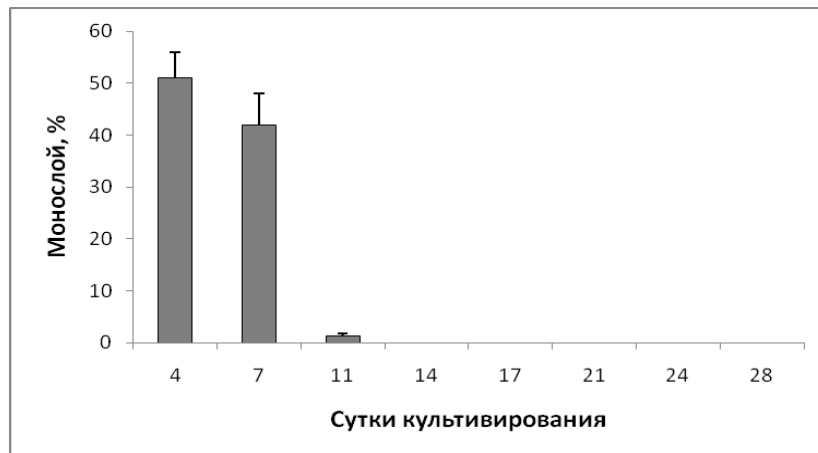


Рис. 4. Відносна площа монослой, формуючого фибробластоподобними клітками, на різні терміни перенесення цитосфер з об'ємного культивування в стандартні умови

Клітки симпатично-адrenalової лінії походять з нервного гребня. В період ембріонального розвитку клітки-предшественники мігрують з нього на рівні 18–24 сомитів і диференціюються в нейрони симпатических гангліїв і хромаффіноцити надпочечників (Lumb, Schwarz, 2015). Появлення в отриманій нами культурі кліток нейробластоподобної морфології

могло свидетельствовать о том, что в ней сохраняются симпато-адреналовые прогениторы, способные дифференцироваться в нейрональном направлении.

Специфический маркер нейробластов β -III-тубулин был использован нами для идентификации нейробластоподобных клеток (Svendson et al., 2001). Проведение сравнительного иммуноцитохимического анализа позволило определить экспрессию маркера нейробластов β -III-тубулина в обоих типах культур – объемной и монослойной. Для иммуноцитохимического окрашивания использовали культуры, которые получали при переносе цитосфер из 3D в стандартные условия на 14 сутки.

В обоих типах культур наблюдалось специфическое мечение β -III-тубулином цитосфер и выселяющихся из них нейробластоподобных клеток (рис. 5). Фибробластоподобные клетки монослоя не окрашивались. Характер окрашивания и его интенсивность не изменялись в зависимости от условий культивирования.

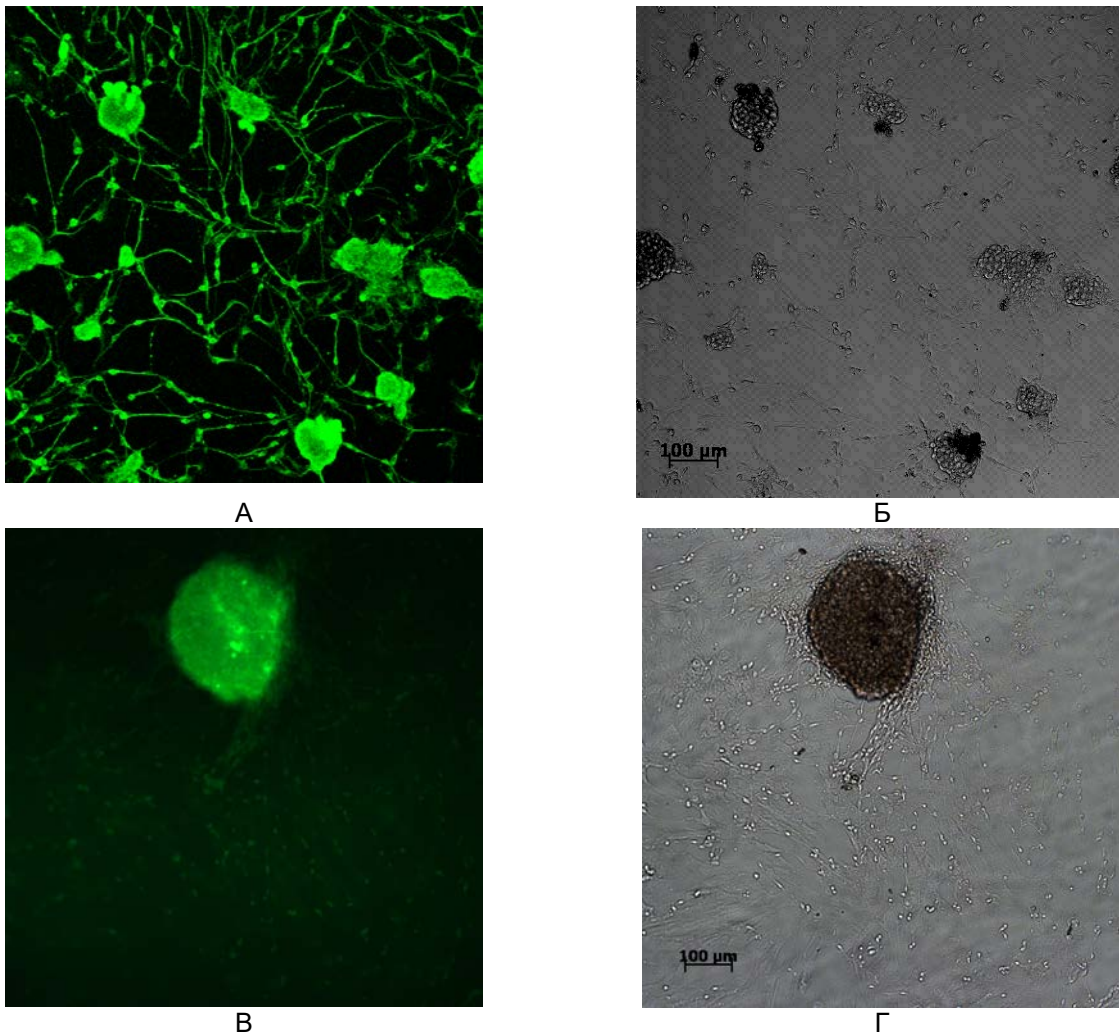


Рис. 5. Репрезентативные изображения, полученные при иммуноцитохимическом окрашивании цитосфер, полученных при объемном (А, Б) и монослойном (В, Г) культивировании. Представлены изображения в режиме флуоресценции (А, В) и проходящем свете (Б, Г). Зеленая флуоресценция означает позитивное окрашивание, которое наблюдалось в обеих культурах в цитосферах и нейробластоподобных клетках

Обсуждение

На данный момент не существует достаточного количества исследований, касающихся культивирования клеток надпочечников неонатальных поросят. Vizzardelli с соавт. разработали автоматизированный метод выделения клеток из таких надпочечников (Vizzardelli et al., 2001), однако не проводили детального изучения их пролиферативных и дифференцировочных свойств при культивировании.

В условиях культивирования многие виды стволовых/прогениторных клеток образуют флотирующие или прикрепленные сферические колонии (Pastrana et al., 2011). Сферические колонии разных типов были получены в культурах клеток эмбриональных, неонатальных и взрослых надпочечников человека, быка, крысы и мыши (Hervonen et al., 1972; Bes, Sagen, 2002; Zhou et al., 2006; Chung et al., 2009; Santana et al., 2012; Saxena et al., 2013).

При этом способность дифференцироваться в нейрональном направлении была установлена в культурах клеток, полученных из фетальных и взрослых надпочечников человека (Bes, Sagen, 2002; Santana et al., 2012). Подобная дифференцировка в культуре, полученной из надпочечников взрослого быка, происходила в присутствии фактора роста нервов NGF (Chung et al., 2009). При культивировании неонатальных надпочечников мыши для нейрональной дифференцировки были необходимы добавки в виде ретиноевой и аскорбиновой кислот (Saxena et al., 2013).

Проведенное нами исследование, как и предыдущие наши работы (Bozhok et al., 2016; Сидоренко и др., 2013) согласуются с работами упомянутых авторов. Из надпочечников неонатальных поросят могут быть получены мультиклеточные сфероиды, обладающие способностью дифференцироваться в клетки с нейробластоподобной морфологией и экспрессией нейронального маркера β -III-тубулина. Для этого не требуется дополнительных добавок ростовых факторов. В представленной работе установлено, что это свойство культура клеток сохраняет и в условиях монослойного, и объемного культивирования.

Кроме того, одним из важных результатов нашего исследования можно считать то, что при 3D-культивировании существует возможность получения культуры, «очищенной» от фибробластоподобных клеток. Это позволит в будущем использовать чистые культуры нейробластоподобных клеток для исследований в области электрофизиологии, изучения поведения симпатических нейронов, их регенеративных способностей, влияния ростовых факторов и микроокружения.

Отдельный вопрос состоит в том, каким образом формируются цитосферы. Полученные данные указывают на то, что на первых этапах клетки, флотирующие в среде, собираются в агрегаты, после чего возможен рост и пролиферация определенного типа/типов клеток в составе цитосфер. Подобный процесс формирования цитосфер был описан для клеток, полученных из головного мозга новорожденных крыс (Сукач, Ляшенко, 2011). Возможность пролиферации клеток в составе цитосфер была показана в нашей предыдущей работе с использованием маркера BrdU (Sidorenko et al., 2014).

Вывод

При объемном (3D) культивировании клеток надпочечников неонатальных поросят формируются мультиклеточные сфероиды. При переносе в стандартные условия они имеют свойство прикрепляться к подложке и дифференцироваться в нейробласты, экспрессирующие β -III-тубулин. Для процесса нейрональной дифференцировки не требуется дополнительных добавок в виде ростовых факторов. Если перенос осуществляется на 14 сутки и позже, тогда возможно получить культуру нейробластов без контаминирующей популяции фибробластов.

Список литературы

- Антоневич Н.Г., Квачева З.Б., Чекан В.Л. и др. Стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки человека: условия выделения и накопления в культуре, морфофункциональная и фенотипическая характеристика // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. – 2012. – Вып.28. – С. 27–36. /Antonevich N.G., Kvacheva Z.B., Chekan V.L. i dr. Stvolovyye i progenitornyye kletki obonyatel'noy vystilki cheloveka: usloviya vydeleniya i nakopleniya v kul'ture, morfofunktsional'naya i fenotipicheskaya kharakteristika // Kletochnyye kul'tury. Informatsionnyy byulleten'. – 2012. – Vyp.28. – S. 27–36./
- Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Сабурова И.Н. и др. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока // Офтальмохирургия. – 2013. – Вып.4. – С. 89–97. /Malyugin B.E.,

- Borzenok S.A., Saburina I.N. i dr. Razrabotka bioinzhenernoy konstruksii iskusstvennoy rogovitsy na osnove plenochного matriksa iz spidroina i kul'tivirovannykh kletok limbal'noy zony glaznogo yabloka // *Oftal'mokhirurgiya*. – 2013. – Vyp.4. – S. 89–97./
- Петренко А.Ю., Хуннов Ю.А., Иванов Э.Н. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения: монография. – Л.: Пресс-экспресс, 2011. – 368с./Petrenko A.Yu., Khunov Yu.A., Ivanov E.N. Stvolovyye kletki. Svoystva i perspektivy klinicheskogo primeneniya: monografiya. – L.: Press-ekspres, 2011. – 368s./
- Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. – М.: Реметэкс, 2002. – 176с. /Repin V.S., Rzhaninova A.A., Shamenkov D.A. Embrional'nyye stvolovyye kletki: fundamental'naya biologiya i meditsina. – M.: Remeteks, 2002. – 176s./
- Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И., Бондаренко Т.П. Формирование цитосфер и нейрональная дифференцировка в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. – 2013. – Т.23, №4. – С. 359–362. /Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach Ye.I., Bondarenko T.P. Formirovaniye tsitosfer i neyronal'naya differentsirovka v kul'ture kletok nadpochechnikov novorozhdennykh porosyat // *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny*. – 2013. – Т.23, №4. – С. 359–362./
- Сосунов А.А. Нервный гребень и его нейральные производные // *Соросовский образовательный журнал: Биология*. – 1999. – №5. – С. 14–21. /Sosunov A.A. Nervnyy greben' i ego neyr'al'nyye proizvodnyye // *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal: Biologiya*. – 1999. – №5. – С. 14–21./
- Сукач А.Н., Ляшенко Т.Д. Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования // *Проблемы криобиологии*. – 2011. – Т.21, №4. – С. 395–405. /Sukach A.N., Lyashenko T.D. Rol' formirovaniya agregatov v protsesse vyzhivaniya izolirovannykh nervnykh kletok novorozhdennykh krysov posle kriokonservirovaniya // *Problemy kriobiologii*. – 2011. – Т.21, №4. – С. 395–405./
- Терских В., Васильев А. Стволовые клетки (обзор) // *Эстетическая медицина*. – 2004. – Т.3, №4. – С. 324–335. /Terskih V., Vasil'yev A. Stvolovyye kletki (obzor) // *Esteticheskaya meditsina*. – 2004. – Т.3, №4. – С. 324–335./
- Agley C.C., Rowlerson A.M., Velloso C.P. et al. Isolation and quantitative immunocytochemical characterization of primary myogenic cells and fibroblasts from human skeletal muscle // *J. Vis. Exp.* – 2015. – Vol.95. – e52049.
- Ahmed S. The culture of neural stem cells // *J. Cell Biochem.* – 2009. – Vol.106, no 1. – P. 1–6.
- Bes J.C., Sagen J. Dissociated human embryonic and fetal adrenal glands in neural stem cell culture system: open fate for neuronal, nonneuronal, and chromaffin lineages? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol.971. – P. 563–572.
- Bozhok G.A., Sidorenko O.S., Plaksina E.M. et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands // *Cryobiology*. – 2016. – Vol.73, no 2. – P. 152–161.
- Byun Y.S., Tibrewal S., Kim E. et al. Keratocytes derived from spheroid culture of corneal stromal cells resemble tissue resident keratocytes // *PLoS One*. – 2014. – Vol.9, no 11. – e112781.
- Carlsson J., Yuhas J.M. Liquid-overlay culture of cellular spheroids // *Recent Results Cancer Res.* – 1984. – Vol.95. – P. 1–23.
- Chen L.L., Mann E., Greenberg B. et al. Removal of fibroblasts from primary cultures of squamous cell carcinoma of the head and neck // *Journal of Tissue Culture Methods*. – 1993. – Vol.15, no 1. – P. 1–9.
- Chung K., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla // *Stem cells*. – 2009. – Vol.27, no 10. – P. 2602–2613.
- Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H.J. et al. Nonadhesive nanotopography: fibroblast response to poly(n-butyl methacrylate)-poly(styrene) demixed surface features // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2003. – Vol.67, no 3. – P. 1025–1032.
- Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach // *Nat. Protoc.* – 2009. – Vol.4, no 3. – P. 309–324.
- Gong S., Miao Y.L., Jiao G.Z. et al. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice // *PLoS One*. – 2015. – Vol.10, no 2. – e0117503.
- Gong X., Lin C., Cheng J. et al. Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing // *PLoS One*. – 2015. – Vol.10, no 6. – e0130348.
- Hammarback J.A., Palm S.L., Furcht L.T., Letourneau P.C. Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorbed laminin // *Journal of Neuroscience Research*. – 1985. – Vol.13, no 1–2. – P. 213–220.
- Hervonen A., Hervonen H., Rechart L. Axonal growth from the primitive sympathetic elements of human fetal adrenal medulla // *Experientia*. – 1972. – Vol.28, no 2. – P. 178–179.
- Ivascu A., Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis // *J. Biomol. Screen.* – 2006. – Vol.11, no 8. – P. 922–932.
- Jin Y.Q., Liu W., Hong T.H., Cao Y. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment // *J. Neurosci. Methods*. – 2008. – Vol.170, no 1. – P. 140–148.
- Kaewkhaw R., Scutt A.M., Haycock J.W. Integrated culture and purification of rat Schwann cells from freshly isolated adult tissue // *Nat. Protoc.* – 2012. – Vol.7, no 11. – P. 1996–2004.

- Kinney M.A., Hookway T.A., Wang Y., McDevitt T.C. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics // *Ann. Biomed. Eng.* – 2014. – Vol.42, no 2. – P. 352–367.
- Kisselbach L., Merges M., Bossie A., Boyd A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures // *Cytotechnology.* – 2009. – Vol.59, no 1. – P. 31–44.
- Knight E., Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro // *J. Anat.* – 2015. – Vol.227, no 6. – P. 746–756.
- Kulkarni G.V., McCulloch C.A. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts // *Journal of Cell Science.* – 1994. – Vol.107. – P. 1169–1179.
- Kuzmuk K., Schook L. Pigs as a model for biomedical sciences // *The Genetics of the pig*, second ed. / Eds. M.F.Rothschild, A.Ruvinsky. – CAB International, 2011. – P. 426–444.
- Li H., Dai Y., Shu J. et al. Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells // *Tissue Cell.* – 2015. – Vol.47, no 1. – P. 39–48.
- Lumb R., Schwarz Q. Sympathoadrenal neural crest cells: the known, unknown and forgotten? // *Dev. Growth Differ.* – 2015. – Vol.57, no 2. – P. 146–157.
- Morimoto Y., Hsiao A.Y., Takeuchi S. Point-, line-, and plane-shaped cellular constructs for 3D tissue assembly // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2015. – Vol.95. – P. 29–39.
- Niapour A., Karamali F., Karbalaie K. et al. Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells // *Biotechnol. Lett.* – 2010. – Vol.32, no 6. – P. 781–786.
- Nyberg S.L., Hardin J., Amiot B. et al. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver // *Liver Transpl.* – 2005. – Vol.11, no 8. – P. 901–910.
- Park A.M., Hayakawa S., Honda E. et al. Conditioned media from lung cancer cell line A549 and PC9 inactivate pulmonary fibroblasts by regulating protein phosphorylation // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol.518, no 2. – P. 133–141.
- Pastrana E., Silva-Vargas V., Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2011. – Vol.8, no 5. – P. 486–498.
- Pilling D., Gomer R.H. Differentiation of circulating monocytes into fibroblast-like cells // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol.904. – P. 191–206.
- Ramgolam K., Lauriol J., Lalou C. et al. Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6, no 4. – e18784.
- Santana M., Chung K., Vukicevic V. et al. Isolation, characterization, and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla // *Stem Cells Transl. Med.* – 2012. – Vol.1. – P. 783–791.
- Saxena Sh., Wahl J., Huber-Lang M.S. et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8, no 5. – e64454.
- Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I., Bondarenko T.P. Morphological and functional features of newborn piglets adrenal cells during culturing // *Eastern European Scientific Journal.* – 2014. – No 2. – P. 11–19.
- Sincennes M.C., Wang Y.X., Rudnicki M.A. Primary mouse myoblast purification using magnetic cell separation // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol.1556. – P. 41–50.
- Song H., David O., Clejan S. et al. Spatial composition of prostate cancer spheroids in mixed and static cultures // *Tissue Eng.* – 2004. – Vol.10, no 7–8. – P. 1266–1276.
- Svendsen C.N., Bhattacharyya A., Tai Y.T. Neurons from stem cells: preventing an identity crisis // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – Vol.2, no 11. – P. 831–834.
- Vizzardelli C., Potter E., Berney T. et al. Automated method for isolation of adrenal medullary chromaffin cells from neonatal porcine glands // *Cell. Transpl.* – 2001. – Vol.10, no 8. – P. 689–696.
- Wang Q.R., Wang B.H., Huang Y.H. et al. Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells // *J. Cell Biochem.* – 2008. – Vol.103, no 1. – P. 21–29.
- Wei Y., Zhou J., Zheng Z. et al. An improved method for isolating Schwann cells from postnatal rat sciatic nerves // *Cell Tissue Res.* – 2009. – Vol.337, no 3. – P. 361–369.
- Zhou H., Aziza J., Sol J. et al. Cell therapy of pain: characterization of human fetal chromaffin cells at early adrenal medulla development // *Exp. Neurol.* – 2006. – Vol.198, no 2. – P. 370–381.

Представлено: Н.С.Кавок / Presented by: N.S.Kavok
Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky
Подано до редакції / Received: 07.04.2017