

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ

О. С. Сидоренко
Г. А. Божок
С. Б. Билявская
В. Д. Устиченко
Н. Ф. Губина
В. С. Холодный
Е. И. Легач
Т. П. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: sidorenkoolga13@gmail.com

Получено 11.09.2012

Изучали влияние условий культивирования (тип подложки, состав культуральной среды) на пролиферацию и гормональную секрецию клеток надпочечников новорожденных поросят в первичной культуре. При культивировании в средах с 10% -й фетальной телячьей сывороткой наблюдали высокую пролиферативную активность, сопровождающуюся формированием клеточного монослоя и многоклеточных сферических структур (сфероидов). При дальнейшем культивировании или пересеве из сфероидов мигрировали клетки нейроноподобной морфологии. Этот процесс происходил на фоне снижения концентрации кортизола и не зависел от присутствия фактора роста нервов в среде культивирования.

Ключевые слова: первичная культура клеток, надпочечник, новорожденные поросята, факторы роста, сфероиды, кортизол, дифференцировка.

Культуру клеток надпочечников (ККН) используют в качестве объекта исследования в различных отраслях биологии и медицины. Это связано с особенностями эмбрионального происхождения, многообразием клеточного состава и продуктов секреции надпочечных желез. Надпочечник состоит из двух функционально отличающихся эндокринных тканей: наружного коркового вещества, клетки которого секретируют ряд стероидных гормонов, и внутреннего мозгового вещества, или медуллы, секретирующего катехоламины [1]. В процессе эмбрионального развития надпочечник развивается из разных зародышевых листков: клетки коркового вещества имеют мезодермальное, а клетки медуллы — эктодермальное происхождение и являются производными клеток нервного гребня [2, 3]. В процессе органогенеза надпочечника происходит пространственное сближение двух его составляющих, а функциональное созревание клеток различных типов происходит под влиянием сложных паракринных взаимодействий [4, 5]. Этот механизм еще не до конца изучен, поэтому для изучения процессов эмбрио-

и гистогенеза актуальным является использование смешанной ККН.

Клетки надпочечников синтезируют и секретируют кортикостероиды, катехоламины [1], а также ряд веществ, обладающих анальгезирующими свойствами, в частности опиоидные пептиды [6]. В связи с этим ККН может быть использована для трансплантации пациентам, страдающим болезнями Аддисона и хронической надпочечниковой недостаточностью [7–9], Паркинсона [10, 11], а также для облегчения нейропатической боли различного генеза [12, 13].

В последнее время особое внимание уделяется недифференцированным прогениторным клеткам надпочечников. Появляются работы, доказывающие наличие таких клеток в субкапсулярной области [14], коре [15, 16], а также мозговом веществе [17] надпочечников.

Таким образом, ККН является объектом исследования для специалистов различных областей: эмбриологии, эндокринологии, неврологии, биотехнологии и трансплантологии.

Поскольку многие физиологические и биохимические процессы в организме

свиньи и человека протекают сходным образом, можно предположить, что результаты, полученные на культуре клеток свиней, могут служить инструментом для решения ряда задач, с которыми сталкиваются современная клеточная биология и регенеративная медицина.

Целью исследования являлась разработка условий получения и культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят, а также изучение морфофункциональных свойств полученной первичной культуры.

Материалы и методы

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 НАН Украины.

Для получения клеток надпочечников использовали новорожденных поросят первого поколения пород крупная белая и украинская мясная (20 штук). Поросят забивали гильотированием. Надпочечные железы после выделения помещали в охлажденную среду (199 или DMEM/F12, Sigma, США; PAA Laboratories, Австрия), содержащую антибиотик (40 мкг/мл гентамицина, «Здоров'я», Украина) и измельчали на фрагменты размером около 1 мм³, затем дважды отмывали от крови средой с антибиотиком. Клетки дезагрегировали энзиматическим методом, используя коллагеназу 1-го типа (Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл и дезоксирибонуклеазу (Sigma) в концентрации 0,1 мг/мл. Энзимы растворяли в среде 199 или DMEM/F12. Энзиматическую обработку проводили в три этапа (30, 10, 10 мин) на водяной бане при 37 °С и постоянном встряхивании. После каждого этапа дезагрегированные клетки собирали в пробирку с охлажденной фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Sigma, США) для инактивации энзимов. К оставшимся фрагментам ткани добавляли свежий энзиматический раствор. После энзиматической обработки полученные клетки отмывали путем центрифугирования в среде с 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma). Затем клетки фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм для удаления клеточного дебриса. Жизнеспособность полученных клеток, оцениваемая с помощью окрашивания трипановым синим [18], составляла 80–90%.

Клетки культивировали на питательных средах 199 или DMEM/F12 с добавлением 5 или 10% ФТС, 40 мкг/мл гентамицина, 5 мкг/мл амфотерицина В (Sigma) при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂. В некоторых случаях в питательную среду вносили ростовые факторы: фактор роста нервов (NGF, Sigma) в концентрации 100 нг/мл, основной фактор роста фибробластов (bFGF, Sigma) в концентрации 10 нг/мл, эпидермальный фактор роста (EGF, Sigma) в концентрации 20 нг/мл.

Культивирование проводили в пластиковых флаконах (PAA Laboratories, Австрия; Sarstedt, США) и 12-луночных планшетах (Sarstedt). Кроме того, в качестве подложек использовали покровные стекла, помещенные в лунки планшета, а также пластиковые чашки Петри диаметром 30 мм, покрытые коллагеном. Для приготовления коллагеновой подложки использовали раствор коллагена 1-го типа (Sigma) в конечной концентрации 1 мг/мл. 1 мг коллагена растворяли в 250 мкл 0,1 Н уксусной кислоты и доводили до 1 мл средой с 0,2% БСА. Полученным раствором покрывали дно пластиковых чашек Петри и высушивали на воздухе в стерильных условиях.

После первых суток культивирования ККН ополаскивали средой с антибиотиком, удаляя при этом неприкрепившиеся и мертвые клетки, и производили замену питательной среды. В дальнейшем среду меняли каждые трое–четыре суток.

Уровень кортизола в среде культивирования определяли методом радиоиммунологического анализа с помощью набора РИА-Кортизол (Беларусь).

Для подсчета количества клеток различной морфологии клетки фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида (Sigma, США) и окрашивали ядра флуоресцентным красителем пропидия йодидом (Propidium iodide, Sigma).

Микрофотосъемку осуществляли с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z и светооптического микроскопа Meiji Techno с цифровой камерой.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Важными условиями, определяющими результат культивирования клеток животных, являются свойства поверхности культивирования и состав культуральной среды. Прикрепление и распластывание клеток,

необходимые для формирования монослоя, определяются характером взаимодействия молекул на поверхности клеточной мембраны с поверхностью культуральной подложки. Иногда для прикрепления клеток требуется также присутствие элементов внеклеточного матрикса — коллагена, фибронектина и т. д. Сыворотка является источником целого ряда биологически активных веществ (гормонов, цитокинов), необходимых для пролиферации клеток в культуре, поэтому в большинстве случаев ее вводят в культуральную среду в разных количествах, в зависимости от типа клеток. Для стимуляции дифференцировки стволовых/прогениторных клеток используют различные факторы роста.

В процессе подбора оптимальных условий культивирования клетки надпочечников новорожденных поросят выращивали на различных поверхностях — стекле, пластике, коллагене, а также изучали влияние некоторых добавок к среде культивирования (ФТС, NGF, bFGF, EGF). При этом особое внимание обращали на такие параметры клеточной культуры, как формирование клеточного монослоя и сферических клеточных образований (сфероидов), присутствие клеток различной морфологии (фибробластоподобные, клетки, содержащие включения, нейроноподобные) и время достижения 80–90% -й конфлюэнтности. В нашем эксперименте не было обнаружено различий в прикреплении клеток и росте культуры в зависимости от вида используемой подложки. Поэтому в дальнейшем проводили культивирование

в пластиковых флаконах. В таблице представлены данные о влиянии сред культивирования различного состава на исследуемые параметры ККН при культивировании на пластиковой подложке.

В экспериментах при культивировании в средах 199 или DMEM/F12 разницы в описанных параметрах не наблюдали, т. е. обе питательные среды могут быть использованы для культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят.

Наилучшие показатели формирования монослоя были при культивировании в средах с добавлением 10% ФТС (таблица). В этом случае после первых суток культивирования большая часть клеток прикреплялась к поверхности и распластывалась. На данном этапе культивирования первичная ККН представлена в основном клетками фибробластоподобной морфологии (рис. 1, а). Кроме того, в первичной ККН наблюдали одиночные округлые клетки, содержащие включения и отнесенные нами по морфологическим признакам к гормонопродуцирующим.

После достижения 80% конфлюэнтности (3–5-е сут) на монослое формировались сферические образования (сфероиды), состоящие из нескольких клеток (рис. 1, б). При дальнейшем культивировании эти структуры увеличивались в размерах, достигая 300 мкм в диаметре, и уплотнялись (рис. 1, в). Вероятно, это связано с тем, что клетки в составе сфероидов синтезировали элементы внеклеточного матрикса, создавая необходимое микроокружение. Пока остается неясным, являются ли подобные структуры

Влияние состава среды на исследуемые параметры первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят при культивировании на пластиковой подложке

Состав среды культивирования	Наличие в культуре		Типы клеток*			Конфлюэнтность, сут
	монослоя	сфероидов	Ф	К _{вкл}	Н	
199	0	0	неразличимы [#]			Нет
199+EGF+bFGF	0	0	неазличимы [#]			Нет
199+5% ФТС	+	0	+	0	0	Нет
199+5% ФТС+EGF+bFGF	0	0	неразличимы [#]			Нет
199+10% ФТС	+	+	+	+	+	3–5
DMEM/F12	0	0	неразличимы [#]			Нет
DMEM/F12+EGF+bFGF	0	0	неразличимы [#]			Нет
DMEM/F12+5% ФТС+EGF	0	0	неразличимы [#]			Нет
DMEM/F12+10% ФТС	+	+	+	+	+	3–5

Примечания. * — Наличие клеток различной морфологии: Ф — фибробластоподобные; К_{вкл} — клетки, содержащие включения; Н — нейроноподобные.

[#] — При данных условиях в культуре наблюдали мелкие округлые нераспластаные клетки, поэтому идентифицировать их по морфологическим признакам оказалось невозможным.

+; 0 — Наличие или отсутствие исследуемого параметра в культуре.

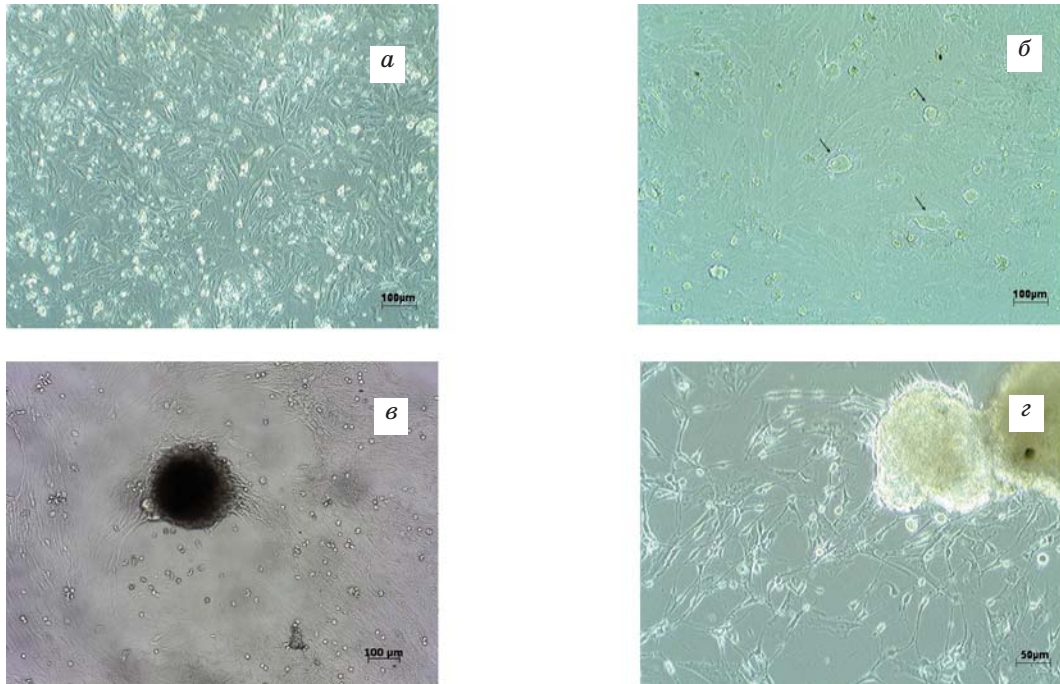


Рис. 1. Культура клеток надпочечников новорожденных поросят:

- a* — фибробластоподобные клетки, 1-е сут (масштабная линейка соответствует 100 мкм);
- б* — мелкие сфероиды из нескольких клеток (обозначены стрелками), 5-е сут (масштабная линейка соответствует 100 мкм);
- в* — разрезание монослоя и формирование крупных сфероидов, 14-е сут (масштабная линейка соответствует 100 мкм);
- г* — сфероиды на 5-е сут после пересева, выделение клеток нейроноподобной морфологии (масштабная линейка соответствует 50 мкм)

результатом агрегации клеток монослоя или они формируются вследствие пролиферативной активности одной клетки. Следует отметить, что в области прикрепления сфероидов на более поздних сроках культивирования наблюдалась неравномерность монослоя с участками его разрежения либо уплотнения.

Сфероиды открепляли механически пипетированием и пересевали, используя питательную среду аналогичного состава. После пересева сфероиды прикреплялись к подложке, после чего происходило выселение из них клеток двух морфологических типов: фибробластоподобных, а также сравнительно небольших нейроноподобных клеток с отростками, формирующими сеть (рис. 1, 2). В некоторых случаях могло быть спонтанное открепление крупных сфероидов от подложки. Выселение нейроноподобных клеток наблюдалось также из сфероидов, которые не подвергались пересеву. Поскольку на ранних этапах культивирования клеток нейроноподобной морфологии в первичной культуре не было, можно предположить, что они могут являться результатом дифференцировки прогениторных клеток.

Для оценки количественного соотношения клеток двух морфологических типов мы окрашивали ядра флуоресцентным красителем пропидия йодидом. При этом ядра нейроноподобных клеток визуализировались как мелкие структуры, обладающие более сильной флуоресценцией, в то время как распластанные ядра клеток фибробластоподобной морфологии были более крупными и светились слабее (рис. 2).

Доля нейроноподобных клеток, наблюдаемых в культуре после пересева сфероидов, составляла $30,8 \pm 13,7\%$ от общего количества клеток. Среди всех клеток нейроноподобной морфологии наблюдались клетки, имеющие один, два или более отростков, формирующих сети.

Известно, что тканеспецифические стволовые/прогениторные клетки присутствуют во многих органах. В результате дифференцировки они обеспечивают обновление клеточного состава органа или ткани в течение жизни организма. При культивировании клеток в условиях, препятствующих их прикреплению, дифференцированные клетки гибнут, в то время как многие недифференцированные прогениторные клетки формируют

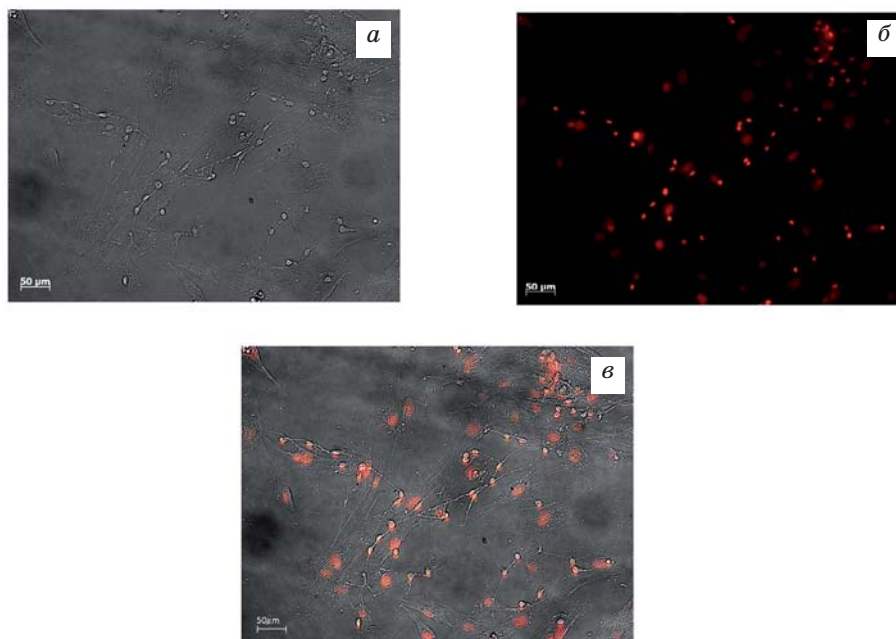


Рис. 2. Культура клеток надпочечников новорожденных поросят: нейроноподобные и фибробластоподобные клетки на 5-е сут после пересева сфероидов (масштабная линейка соответствует 50 мкм);

- a* — фотография в проходящем свете;
б — флуоресцентная микроскопия (ядра окрашены пропидия йодидом);
в — совмещенная фотография

так называемые сферы — клеточные скопления шарообразной формы. Это свойство используется для выделения недифференцированных клеток из общей клеточной массы. Таким образом ранее были получены недифференцированные клетки нервной системы [19, 20], щитовидной железы [21], роговицы [22], молочной железы [23].

Анализируя данные литературы, можно выделить некоторые условия, необходимые для формирования сферических колоний клеток, которые в дальнейшем дифференцируются в нейрональном направлении [17, 19, 24–29]. Во-первых — культивирование в бессывороточной среде для удаления дифференцированных клеток из общей суспензии и предотвращения преждевременной дифференцировки прогениторных клеток. Во-вторых — добавление в среду ростовых факторов EGF и bFGF для стимуляции пролиферативной активности прогениторных клеток.

В связи с этим в ряде экспериментов клетки культивировали в бессывороточной среде с добавлением EGF и bFGF, а также без них. При этом клетки прикреплялись к поверхности культивирования, но не распластывались и не формировали монослой (таблица). В среде 199 с низким содержанием ФТС (5%) к 4-м сут формировались отдельные небольшие участки монослоя,

однако уже к 7-м сут наблюдалась его деградация. При культивировании в бессывороточной среде часть клеток погибала, остальные оставались округлыми в течение 24 сут культивирования независимо от наличия в среде EGF и bFGF. Хотя в литературе есть сведения об успешном культивировании адренкортикальных клеток мышей в бессывороточной среде [30], результаты наших экспериментов показывают, что ФТС является необходимым компонентом питательной среды для ККН новорожденных поросят и не может быть заменена ростовыми факторами EGF и bFGF. Вероятно, на пролиферацию клеток и формирование монослоя в первичной ККН новорожденных поросят помимо EGF и bFGF влияют и другие ростовые факторы, содержащиеся в сыворотке, поэтому для поддержания пролиферативной активности клеток в данной культуре необходимо введение в питательную среду достаточного количества ФТС (10%).

Хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников и симпатические нейроны являются производными клеток нервного гребня, относятся к симпатoadrenalовой линии и развиваются из общей клетки-предшественника [31]. Было показано, что в медулле надпочечников сохраняется популяция прогениторных клеток, которые

могут быть дифференцированы в нейрональном направлении путем добавления NGF в среду культивирования [32, 33].

В наших экспериментах после появления в культуре сферических структур часть из них культивировали в среде с добавлением NGF, остальные — в среде без NGF (ФТС вносили в среду в обоих случаях). При этом миграцию нейроноподобных клеток из сфероидов наблюдали во всех экспериментах, независимо от добавления NGF в среду культивирования. Аналогичные результаты были получены на эксплантах мозгового вещества надпочечников крысы: при культивировании в среде без добавления NGF на клетках формировались нейрональные отростки [34]. Возможно, появление нейроноподобных клеток обусловлено влиянием NGF, который может продуцироваться клетками мозгового вещества надпочечников [35].

Ранее было показано, что NGF-индуцированная дифференцировка адреномедуллярных прогениторных клеток в нейрональном направлении возможна лишь при отсутствии глюкокортикоидов в среде культивирования [32, 33, 36]. Синтетический аналог глюкокортикоидных гормонов — дексаметазон, введенный в культуральную среду, способствовал не только развитию хромоаффинных клеток, но и исчезновению уже дифференцированных нейронов из культуры [33]. Опираясь на эти данные, можно предположить, что появление нейроноподобных клеток в культуре на поздних сроках культивирования может быть связано со снижением или прекращением синтеза стероидных гормонов клетками коры надпочечников.

Мы оценивали содержание одного из стероидных гормонов — кортизола — в культуральной среде в различные сроки культивирования (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что на начальном этапе культивирования секреция кортизола постепенно возрастает, достигая максимальных значений к 6–7-м сут (30,3±7,3 нмоль/л), а затем снижается. После 3 нед культивирования содержание кортизола в среде составляло не более 14% от максимальных значений, наблюдаемых на 6–7-е сут культивирования, и составляло 4,2 нмоль/л. Увеличение содержания кортизола к 6–7-м сут, вероятно, связано с возрастающим количеством гормонопродуцирующих клеток. Это, в свою очередь, может быть обусловлено дифференцировкой прогениторных адренокортикальных клеток, ответственных за обновление клеточного состава коры надпочечников в течение жизни организма [14–16].

Таким образом, формирование сферических структур в первичной ККН наблюдается одновременно с увеличением уровня гормональной секреции, а выселение нейроноподобных клеток из сфероидов происходит на фоне снижения концентрации кортизола в среде культивирования.

Морфологические особенности клеток надпочечников, а также их функциональную активность изучали как в монокультурах, так и при совместном культивировании клеток коры и медуллы. Установлено, что первичная культура адренокортикальных клеток различных видов животных и человека гетерогенна по своему клеточному составу и представлена в основном распластанными фибробластоподобными [37–39] и эпителиальными клетками с липидными включениями [38]. Также она может содержать небольшое количество фибробластов, макрофагов, лимфоцитов и эндотелиальных клеток [37]. При культивировании в средах 199 и DMEM с добавлением 10% ФТС клетки коры хорошо пролиферируют, формируя конфлюэнтный монослой. Скорость пролиферации зависит от стадии онтогенеза организма. Так, было показано, что адренокортикальные клетки взрослых крыс формируют монослой на 5–7-е сут, а 17–20-дневных — на 3–4-е сут. При этом клетки молодых животных быстрее прикреплялись и распластывались [38]. Кроме того, скорость формирования монослоя зависит и от вида организма. Так, клетки фетальной коры человека достигают конфлюэнтности на 7–10-е сут [39], а клетки коры взрослого быка — на 3–4-е [37].

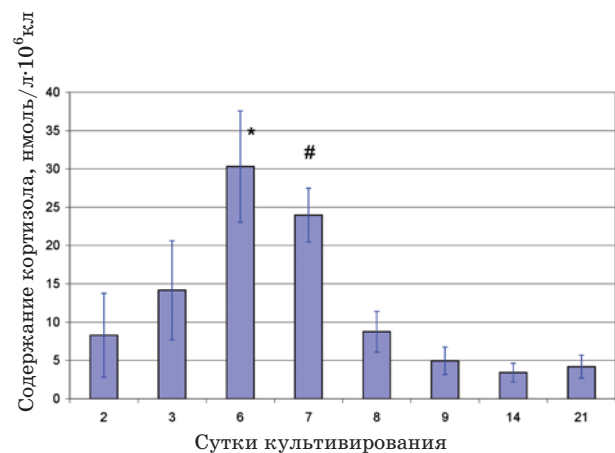


Рис. 3. Изменение уровня кортизола в среде культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят.

* — Различия достоверны по отношению к 3-м сут, $P < 0,05$;

— различия достоверны по отношению к 8-м сут, $P < 0,05$

Как было установлено, необходимым условием культивирования, поддерживающим пролиферацию и гормонопродукцию в ПКК надпочечников новорожденных поросят, является использование ФТС в концентрации не ниже 10%. В этих условиях уже к 3–4-м сут культивирования формируется клеточный монослой. Морфология клеток и характер формирования монослоя в ККН новорожденных поросят соответствуют данным литературы, полученным при культивировании клеток надпочечников других животных и человека [32, 33, 37–40].

Для поддержания хромаффинных клеток в культуре необходимо введение в среду глюкокортикоидов. Без глюкокортикоидов хромаффинные клетки либо исчезают из культуры, либо проявляют морфологическую и функциональную пластичность, приобретаемая характерные особенности нейрональных клеток [32]. Наиболее часто в качестве индуктора дифференцировки в нейрональном направлении используется NGF. Такая трансдифференцировка хромаффинных клеток является обратимой, и в конечном счете морфофункциональные характеристики зависят не только от присутствия глюкокортикоидов и NGF в среде культивирования, но и от их соотношения [32, 33].

В нашем эксперименте появление клеток с нейроноподобной морфологией не зависело от присутствия NGF в среде, а наблюдалось на фоне снижения секреции кортизола. На данном этапе исследования остается открытым вопрос, являются ли клетки нейроноподобной морфологии результатом дифференцировки каких-либо прогениторных клеток, присутствующих в сфероиде, или они появляются в культуре вследствие трансдифференцировки хромаффинных клеток.

Особый интерес представляют сфероиды, появляющиеся в ПКК надпочечников новорожденных поросят на 4–5-е сут. Подобные сфероиды формировались при культивировании хромаффинных клеток, полученных из надпочечников взрослого быка, и были описаны Chung и соавт. [17]. Было показано, что при культивировании в среде без глюкокортикоидов с 10% ФТС в условиях, препятствующих прикреплению, дифференцированные хромаффинные клетки не выживали, однако сохранялась небольшая популяция прогениторных клеток. В результате их пролиферации формировались трехмерные сферические структуры, названные хромосферами. В отличие от хромаффинных клеток первичной культуры, клетки хромосфер экспрессировали марке-

ры стволовых нервных клеток, а также маркеры производных нервного гребня. Под влиянием дексаметазона или NGF из клеток хромосфер формировались зрелые хромаффинные клетки или нейроны, соответственно.

Наличие в надпочечнике прогениторных клеток, способных дифференцироваться в нейроны, вполне закономерно и объясняется общим происхождением хромаффинных клеток и симпатических нейронов. Адреномедулярные клетки и нейроны симпатических ганглиев принадлежат к клеткам симпатoadреналовой линии, являются производными нервного гребня и развиваются из общей клетки-предшественника [3, 31, 41]. Ehrlich и соавт. в эксперименте *in vivo* показали, что в надпочечнике эмбриона крысы существует популяция клеток, которые одновременно экспрессируют маркеры зрелых хромаффинных клеток и нейронов [42]. В мозговом веществе надпочечников существует популяция недифференцированных клеток, ответственных за обновление клеточного состава и восполняющих пул хромаффинных клеток взамен утраченных при повреждении [43]. Возможно, эти клетки представляют собой недифференцированные производные нервного гребня, детерминированные в симпатoadреналовом направлении. Развитие клетки-предшественника симпатoadреналовой линии по эндокринному или нейрональному пути определяется набором специфических факторов, выделяемых клетками микроокружения. Наиболее полно изучено влияние таких факторов, как глюкокортикоиды, bFGF, NGF, инсулиноподобные факторы роста (IGF-1, IGF-2), трансформирующие факторы роста (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) и др. [44, 45]. Однако влияние этих факторов на процессы дифференцировки прогениторных клеток надпочечников требует дальнейшего изучения.

Таким образом, оптимальным условием для культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят, поддерживающим пролиферацию и гормональную секрецию, является использование сред DMEM/F12 и 199, содержащих 10% ФТС.

В этих условиях наблюдается формирование многоклеточных сфероидов, из которых при пересеве образуются клетки нейроноподобной морфологии.

Для выяснения природы описанных сфероидов и потенциальной возможности их использования в различных областях биологии и медицины необходимо дальнейшее изучение условий их формирования и клеточного состава.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Мельниченко Г. А., Фадеев В. В. Эндокринология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 432 с.
2. Ehrhart-Bornstein M., Hinson J. P., Bornstein S. R. et al. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis // *Endocr. Rev.* — 1998. — V. 19. — P. 101–143.
3. Kuo B. R., Erickson C. A. Regional differences in neural crest morphogenesis // *Cell Adh. Migr.* — 2010. — V. 4, N 4. — P. 567–585.
4. Chamoux E., Otis M., Gallo-Payet N. A connection between extracellular matrix and hormonal signals during the development of the human fetal adrenal gland // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2005. — V. 38, N 10. — P. 1495–1503.
5. Parlato R., Otto C., Tuckermann J. et al. Conditional inactivation of glucocorticoid receptor gene in dopamine-beta-hydroxylase cells impairs chromaffin cell survival // *Endocrinology.* — 2009. — V. 150, N 4. — P. 1775–1781.
6. Wilson S. P., Chang K. J., Viveros O. H. Proportional secretion of opioid peptides and catecholamines from adrenal chromaffin cells in culture // *J. Neurosci.* — 1982. — V. 2, N 8. — P. 1150–1156.
7. Lee M.-K., Bae Y. H. Cell transplantation for endocrine disorders // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2000. — V. 42, N 1–2. — P. 103–120.
8. Dunn J. C., Chu Y., Lam M. M. et al. Adrenal cortical cell transplantation // *J. Pediatr. Surg.* — 2004. — V. 39, N 12. — P. 1856–1858.
9. Patino J. F., Fenn J. E. A successful transplant of embryonic adrenal tissue in a patient with Addison's disease // *Yale J. Biol. Med.* — 1993. — V. 66, N 1. — P. 3–10.
10. Fitzpatrick K. M., Raschke J., Emborg M. E. Cell-based therapies for Parkinson's disease: past, present and future // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2009. — V. 11, N 9. — P. 2189–2208.
11. Hallett M., Litvan I. Evaluation of surgery for Parkinson's disease // *Neurology.* — 1999. — V. 53, N 9. — P. 1910–1921.
12. Lu Y., Jing R., Yeomans D. C., Pappas G. D. Porcine chromaffin cells, culture, and transplant for antinociceptive effects in rodents and primates // *Neurol. Res.* — 2004. — V. 26, N 7. — P. 707–712.
13. Sagen J., Wang H., Tresco P. A., Aebischer P. Transplants of immunologically isolated xenogeneic chromaffin cells provide a long-term source of pain-reducing neuroactive substances // *J. Neurosci.* — 1993. — V. 73, N 6. — P. 2415–2423.
14. King P., Paul A., Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — V. 106, N 50. — P. 21185–21190.
15. Kim A. C., Barlaskar F. M., Heaton J. H. et al. In search of adrenocortical stem and progenitor cells // *Endocr. Rev.* — 2009. — V. 30, N 3. — P. 241–263.
16. Kim A. C., Hammer G. D. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances // *Mol. Cell Endocrinol.* — 2007. — V. 265–266. — P. 10–16.
17. 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, N 10. — P. 2602–2613.
18. Marchenko S., Flanagan L. Counting human neural stem cells // *J. Vis. Exp.* — 2007. — V. 7. — P. 262–264.
19. Suslov O. N., Kukekov V. G., Ignatova T. N., Steindler D. A. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — V. 99, N 22. — P. 14506–14511.
20. Li H. Y., Say E. H., Zhou X. F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia // *Stem Cells.* — 2007. — V. 25, N 8. — P. 2053–2065.
21. Lan L., Cui D., Nowka K., Derwahl M. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2007. — V. 92, N 9. — P. 3681–3688.
22. Uchida S., Yokoo S., Yanagi Y. et al. Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells in vitro // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2005. — V. 46, N 5. — P. 1620–1625.
23. Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells // *Genes Dev.* — 2003. — V. 17, N 10. — P. 1253–1270.
24. Anderson D. J., Carnahan J. F., Michelsohn A., Patterson P. H. Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage // *J. Neurosci.* — 1991. — V. 11, N 11. — P. 3507–3519.
25. Hall B. K., Ekanayake S. Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives // *Int. J. Dev. Biol.* — 1991. — V. 35. — P. 367–387.
26. Reynolds B. A., Tetzlaff W., Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astro-

- cytes // *J. Neurosci.* — 1992. — V. 12, N 11. — P. 4565–4574.
27. *Weiss S., Dunne C., Hewson J. et al.* Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis // *Ibid.* — 1996. — V. 16, N 23. — P. 7599–7609.
 28. *Suzuki M., Wright L. S., Marwah P. et al.* Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101, N 9. — P. 3202–3207.
 29. *Gritti A., Parati E. A., Cova L. et al.* Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor // *J. Neurosci.* — 1996. — V. 16, N 3. — P. 1091–1100.
 30. *Chu Y., Wu B. M., McCabe E. R., Dunn J. C. Y.* Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells // *J. Pediatr. Surg.* — 2006. — V. 41, N 12. — P. 2008–2012.
 31. *Anderson D. J., Carnahan J. F., Michelsohn A., Patterson P. H.* Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage // *J. Neurosci.* — 1991. — V. 11, N 11. — P. 3507–3519.
 32. *Doupe A. J., Landis S. C., Patterson P. H.* Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity // *Ibid.* — 1985. — V. 5, N 8. — P. 2119–2142.
 33. *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. USA.* — 1978. — V. 75, N 7. — P. 3498–3502.
 34. *Unsicker K., Chamley J. H.* Growth characteristics of postnatal rat adrenal medulla in culture // *Cell Tissue Res.* — 1977. — V. 177, N 2. — P. 247–268.
 35. *Harper G. P., Pearce F. L., Vernon C. A.* Production of nerve growth factor by the mouse adrenal medulla // *Nature.* — 1976. — V. 261, N 5557. — P. 251–253.
 36. *Doupe A. J., Patterson P. H., Landis S. C.* Small intensely fluorescent cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with neural crest derivatives // *J. Neurosci.* — 1985. — V. 5, N 8. — P. 2143–2160.
 37. *Haidan A., Bornstein S. R., Glasow A. et al.* Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells // *Endocrinology.* — 1998. — V. 139, N 2. — P. 772–780.
 38. *Ramachandran J., Suyama A. T.* Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1975. — V. 72, N 1. — P. 113–117.
 39. *Di Blasio A. M., Fujii D. K., Yamamoto M. et al.* Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotropin hormone: rationalization of in vitro and in vivo findings // *Biol. Reprod.* — 1990. — V. 42, N 4. — P. 683–691.
 40. *Auersperg N., Wan M. W., Sanderson R. A. et al.* Morphological and functional differentiation of Kirsten murine sarcoma virus-transformed rat adrenocortical cell lines // *Cancer Res.* — 1981. — V. 41, N 5. — P. 1763–1771.
 41. *Huber K.* The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives // *Dev. Biol.* — 2006. — V. 298, N 2. — P. 335–343.
 42. *Ehrlich M. E., Evinger M., Regunathan S., Teitelman G.* Mammalian adrenal chromaffin cells coexpress the epinephrine-synthesizing enzyme and neuronal properties in vivo and in vitro // *Ibid.* — 1994. — V. 163, N 2. — P. 480–490.
 43. *Chen-Pan C., Pan I. J., Yamamoto Y. et al.* Recovery of injured adrenal medulla by differentiation of pre-existing undifferentiated chromaffin cells // *Toxicol. Pathol.* — 2002. — V. 30, N 2. — P. 165–172.
 44. *Unsicker K.* The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor biology // *J. Anat.* — 1993. — V. 183, N 2. — P. 207–221.
 45. *Langley K., Grant N. J.* Molecular markers of sympathoadrenal cells // *Cell Tissue Res.* — 1999. — V. 298. — P. 185–206.

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ
ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРИ КЛІТИН
НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ
НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ**

*О. С. Сидоренко
Г. А. Божок
С. Б. Білявська
В. Д. Устиченко
Н. Ф. Губіна
В. С. Холодний
Є. І. Легач
Т. П. Бондаренко*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: sidorenkoolga13@gmail.com

Вивчали вплив умов культивування (тип субстрату, склад живильного середовища) на проліферацію та гормональну секрецію клітин надниркових залоз новонароджених поросят в первинній культурі. За культивування в середовищах з 10% -ю фетальною сироваткою телят спостерігали високу проліферативну активність, що супроводжувалася формуванням клітинного моношару та багатоклітинних сферичних структур (сфероїдів). Під час подальшого культивування або пересівання зі сфероїдів мігрували клітини нейроноподібної морфології. Цей процес відбувався на фоні зниження концентрації кортизолу і не залежав від наявності фактора росту нервів у культуральному середовищі.

Ключові слова: первинна культура клітин, надниркова залоза, новонароджені поросята, фактори росту, сфероїди, кортизол, диференціювання.

**MORPHOFUNCTIONAL
CHARACTERISTICS OF NEWBORN
PIGLETS ADRENAL
CELLS CULTURE**

*O. S. Sidorenko
G. A. Bozhok
S. B. Bilyavskaya
V. D. Ustichenko
N. F. Gubina
V. S. Kholodny
Y. I. Legach
T. P. Bondarenko*

Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: sidorenkoolga13@gmail.com

The influence of culture conditions (type of substrate and composition of culture medium) on proliferation and hormone secretion in the newborn piglets adrenal primary cell culture was studied. The high level of proliferative activity accompanied by a monolayer and multicellular structures (spheroids) formation was observed when cultured in media supplemented with 10% fetal bovine serum. During further cultivation or subcultivation neuron-like cells migrated from spheroids. The process occurred in parallel with decreased cortisol secretion and did not depend on neuronal growth factor content in culture medium.

Key words: primary cell culture, adrenal gland, newborn piglets, growth factors, spheroids, cortisol, differentiation.