

УДК 612.753, 617-089.844

О.С. Сидоренко\*, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко

## Формирование цитосфер и нейрональная дифференцировка в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят<sup>#</sup>

UDC 612.753, 617-089.844

O.S. Sidorenko\*, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko

## Formation of Cytospheres and Neuronal Differentiation in New-Born Piglet Adrenal Cell Culture<sup>#</sup>

**Ключевые слова:** культура клеток надпочечников, цитосферы, нейрональная дифференцировка,  $\beta$ -III-тубулин, трипсин, коллагеназа.

**Ключові слова:** культура клітин наднирників, цитосфери, нейрональне диференціювання,  $\beta$ -III-тубулін, тріпсин, колагеназа.

**Key words:** adrenal cell culture, cytospheres, neuronal differentiation,  $\beta$ -III-tubulin, trypsin, collagenase.

В последнее время активно изучается возможность индукции нейрональной дифференцировки в культуре хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечников, которые развиваются из нервного гребня, а также функциональные особенности полученных в этих культурах нейронов [3, 5, 6]. Эти исследования перспективны в связи с потенциальным использованием собственных клеток надпочечников пациента для получения нейронов *in vitro* и аутотрансплантации при лечении нейродегенеративных заболеваний.

Жизнеспособность и функциональная активность клеток при культивировании *in vitro* во многом зависят от выбранного способа дезинтеграции ткани. В случае ферментативной дезинтеграции широко применяются коллагеназа и трипсин [2]. Степень повреждения ткани при воздействии на нее трипсином или коллагеназой зависит от типа клеток и может варьировать в широких пределах [4].

Целью работы было изучить влияние состава ферментного раствора, применяемого для дезинтеграции ткани надпочечников новорожденных поросят, на морфологические особенности полученных клеток при культивировании.

Клетки получали из надпочечников новорожденных поросят ферментативным способом с использованием коллагеназы (1 мг/мл) и дезоксирибонуклеазы (0,1 мг/мл) либо трипсина (1 мг/мл) и дезоксирибонуклеазы (0,1 мг/мл). Клетки культивировали в плас-

Nowadays the possibility to initiate neuronal differentiation in cultured adrenal medulla chromaffin cells, originating from the neural crest, as well as functional features of neurons derived in these cultures are studied [3, 5, 6]. These studies are promising due to the potential use of the patient's own cells for procurement of adrenal neurons *in vitro* and autotransplantation in the treatment of neurodegenerative diseases.

Viability and functional activity of cells under *in vitro* culturing are dependent to a large extent on the chosen method of tissue disintegration. Collagenase and trypsin are widely used in the case of enzymatic disintegration [2]. The extent of tissue damage under exposure to trypsin or collagenase depends on the type of cells and may vary within wide limits [4].

The aim was to study the effect caused by enzyme solution composition used for disintegration of adrenal tissue of newborn piglets on the morphological features exhibited by these cells in culture.

Cell suspension was procured from newborn piglets adrenal glands using enzymatic method involved collagenase (1 mg/ml) and DNase (0.1 mg/ml) or trypsin (1 mg/ml) and DNase (0.1 mg/ml) combinations. Cells were cultured in plastic flasks with media 199 or DMEM/F12 supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics (100 U/ml penicillin, 200  $\mu$ g/ml streptomycin) and amphotericin B (5  $\mu$ g/ml) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

Cell viability was assessed by their ability to exclude trypan blue (0.4%).

Отдел биохимии и фармакологии нейрогуморальных систем, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: sidorenkoolga13@gmail.com

<sup>#</sup>Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013

Принята в печать 01.12.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 359–362. © 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Biochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: sidorenkoolga13@gmail.com

<sup>#</sup>This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24<sup>th</sup> of May, 2013.

Received June, 15, 2013

Accepted December, 1, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 359–362. © 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

тиковых флаконах в среде 199 или DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, антибиотиков (100 ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина) и амфотерицина В (5 мкг/мл) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Жизнеспособность клеток оценивали по их способности исключать трипановый синий (0,4%).

Для иммуноцитохимических исследований использовали первичные мышечные anti-β-III-tubulin (TU-20) моноклональные антитела (1:500) и вторичные козы anti-mouse FITC-конъюгированные антитела (1:1000, все «Abcam», Великобритания). Для идентификации клеточных ядер к образцам добавляли пропидия йодид (2 мкг/мл). Исследование и фотосъемку образцов выполняли с помощью микроскопа Axio Observer Z1 («Carl Zeiss», Германия) и анализировали с использованием программы AxioVision Rel. 4.7 («Carl Zeiss»).

Количественные данные экспериментов обрабатывали статистически. Показатели представлены в виде среднего ± ошибка среднего. Статистическую значимость различий между показателями определяли с использованием критерия Стьюдента.

Все эксперименты проводили с соблюдением норм биоэтики и правил биологической безопасности, что подтверждено заключением Комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины.

На первом этапе исследования для дезинтеграции ткани и получения клеток применяли ферментный раствор, содержащий коллагеназу и дезоксирибонуклеазу (Кол/ДН). Жизнеспособность полученных клеток составляла (74,4 ± 15,5)%.

Затем полученную общую суспензию (клетки коры, медуллы, соединительной ткани и эндотелия) культивировали. Первичная культура была ожидаемо гетерогенна по клеточному составу. После 1-х суток культивирования к поверхности прикреплялось (71,7 ± 5,7)% посаженных клеток, большая часть которых распластывалась, а неприкрепившиеся в основном были представлены эритроцитами. После прикрепления и распластывания в культуре преобладали мультиполярные фибробластоподобные, а также округлые клетки с контрастными включениями (предположительно гормонопродуцирующие). В ходе последующего культивирования формировались упорядоченные структуры – «потоки» из тесно прилегающих друг к другу вытянутых биполярных фибробластоподобных клеток (рисунок, А). Такая организация клеточного монослоя характерна для перехода из log-фазы развития культуры на стадию плато [2].

Во второй серии экспериментов для получения клеточной суспензии использовали ферментный раствор, содержащий трипсин и дезоксирибонуклеазу (Тр/ДН). В этом случае жизнеспособность клеток была выше, чем в первом и составляла (87,3 ± 3,2)%. Однако учет количества полученных клеток в обоих случаях не позволил признать второй метод более

Immunocytochemical assessment utilized primary mouse anti-β-III-tubulin (TU-20) monoclonal antibodies (1:500) and secondary goat anti-mouse FITC-conjugated antibodies (1:1000, all by Abcam, UK). Cell nuclei were visualized by propidium iodide (2 μg / ml). Imaging and photodocumentation of samples was made with Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) and analyzed using AxioVision Rel.4.7 (Carl Zeiss).

Quantitative experimental data were processed statistically. Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance of differences between parameters were determined using Student's t-test.

All the experiments were performed in compliance with the norms and rules of bioethics and biological safety that was confirmed by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and and Cryo-medicine.

At the first stage of the experiment, disintegration of the tissue and cells procurement were performed by enzymatic solution combined collagenase and deoxyribonuclease (Col/DN). Viability of cells was (74.4 ± 15.5)%.

Thereafter the resulting total suspension (cells of cortex, medulla, connective tissue and endothelium) were cultured. Cell composition of primary culture was heterogeneous as expected. After the first day of culture (71.7 ± 5.7)% of the seeded cells attached to the surface, most of them flattened and non-adherent ones were mainly erythrocytes. After attachment and spreading the culture contained predominantly multipolar fibroblast-like cells, as well as round-shape cells with contrast cytoplasmic inclusions (presumably hormone-producing cells). Further culturing resulted in appearance of ordered structures, 'threads' of closely adjacent to each other elongated bipolar fibroblast-like cells (Figure A). Such organization of the cell monolayer is characteristic for the culture changing the log-phase of development for the plateau stage [2].

In the second series of experiments, for obtaining of cell suspension we used enzymatic solution containing trypsin and deoxyribonuclease (Tr/DN). In this case, cell viability was higher than in the first case and made (87.3 ± 3.2)%. However, if we took in account the total amount of the cells in both cases, the second method was not recognized as more effective. Treatment of tissue fragments from one adrenal gland with Col/DN solution gave 6.50 ± 3.57 million cells in average, and Tr/DN did only 1.08 ± 0.86 million cells.

Cultures of cells procured following enzymatic treatment with Tr/DN were, in the large, similar to those obtained in the case of Col/DN: they comprised fibroblast-like cells and round-shape ones with contrast cytoplasmic inclusions. Along with that we observed the differences: some areas of monolayer in cell cultures derived following Tr/DN treatment were formed by dense rounded groups of cells (Figure B) with well defined boundary that separated these from the rest of monolayer formed by fibroblast-like cells. It was noted that such

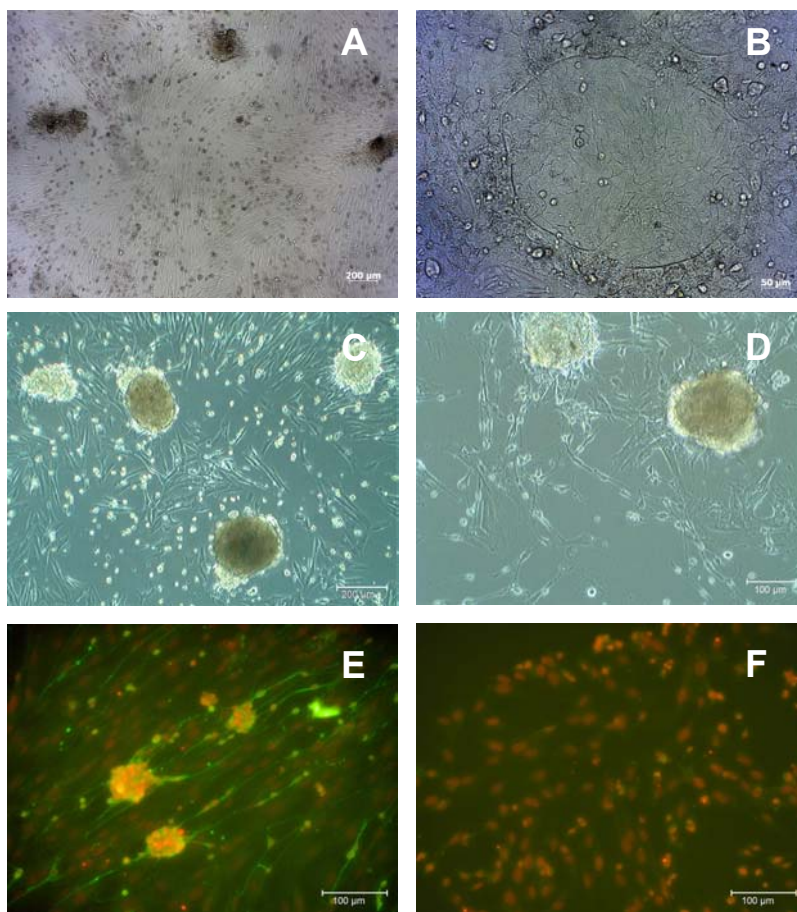


эффективным. Обработка фрагментов ткани одного надпочечника раствором Кол/ДН дала в среднем  $6,50 \pm 3,57$  млн клеток, а Тр/ДН – всего  $1,08 \pm 0,86$  млн.

Культуры клеток, полученных после ферментативной обработки Тр/ДН, в целом были похожи на полученные в случае использования Кол/ДН: в них присутствовали как фибробластоподобные, так и округлые клетки с контрастными включениями. Наряду с этим наблюдали и отличия: отдельные участки монослоя в культурах клеток, полученных с Тр/ДН, были сформированы плотными округлыми группами клеток с четкой границей, отделяющей их от монослоя, образованного фибробластоподобными клетками (рисунок, В). Ранее отмечено, что подобные «островки» формируются в культурах эпителиоидных клеток [2], однако для подтверждения или опровержения возможности этого в наших экспериментальных условиях необходимы дальнейшие исследования. Можно предположить, что ферментативная обработка ткани коллагеназой в первом случае приводила к элиминации таких эпителиоидных элементов. Однако известно, что обработка коллагеназой, наоборот, сопровождается меньшим по сравнению с трипсином повреждающим эффектом. В то же время разные типы клеток обладают разной устойчивостью к действию как трипсина, так и коллагеназы [4].

После достижения 80% конfluence (3–5-е сутки) в обоих вариантах культур на монослое формировались сферические кластеры (цитосферы) из нескольких клеток (рисунок, С). При дальнейшем культивировании цитосферы увеличивались в размерах, достигая 300 мкм в диаметре, и зрительно уплотнялись. Вероятно, это связано с тем, что клетки в составе цитосфер синтезировали элементы внеклеточного матрикса, создавая необходимое микроокружение.

В некоторых экспериментах цитосферы механически открепляли пипетированием и пересевали, используя питательную среду того же состава. После пересева цитосферы прикреплялись к подложке, после чего наблюдалось выселение из них клеток двух типов: фибробластоподобных, а также сравнительно небольших нейроноподобных, отростки которых формировали сеть (рисунок, D). Иммуноцитохимическое



Культура клеток надпочечников новорожденных поросят (ККННП), полученных с применением Кол/ДН (А) и Тр/ДН (В); последующее формирование цитосфер в ККННП на 13-е сутки культивирования (С) и выселение клеток нейроноподобной морфологии из цитосфер на 5-е сутки после пересева (D). Положительное окрашивание флуоресцентным маркером на  $\beta$ -III-тубулин сомы и отростков нейроноподобных клеток, выселившихся из цитосфер (Е; 7-е сутки после пересева; флуоресцентная микроскопия; ядра окрашены пропидия йодидом); отсутствие положительного окрашивания маркером на  $\beta$ -III-тубулин в монослое из фибробластоподобных клеток (F; флуоресцентная микроскопия; ядра окрашены пропидия йодидом).

Newborn piglets adrenal cell culture (NPACC) obtained using Col/DN (A), and Tr/DN (B); further formation of cytospheres in NPACC on the 13<sup>th</sup> day of culture (C) and migration of neuron-like cells from the cytospheres in 5 days after cytospheres passaging (D); soma and processes of neuron-like cells migrated from cytospheres positively stained by fluorescent marker to  $\beta$ -III-tubulin (E; the 7<sup>th</sup> day after passaging; fluorescent microscopy; nuclei were stained with propidium iodide); and monolayer of fibroblast-like cells with no positive staining with marker to  $\beta$ -III-tubulin (F; fluorescent microscopy; nuclei were stained with propidium iodide).

‘islets’ were usually formed in epithelioid cell cultures [2], however, to confirm or refuse such a possibility in our experimental conditions, further research is needed. It can be assumed that the enzymatic treatment of tissue with collagenase in the first case resulted in the elimination of epithelioid cells. However, *per contra* it is known that treatment with collagenase is accompanied with a lesser, if compared with trypsin, damaging. At the same time, different types of cells have different resistance to both trypsin and collagenase [4].

After reaching the 80% confluence (days 3–5) on the monolayer of both alternative cultures we found

мическое окрашивание выявило экспрессию  $\beta$ -III-тубулина в соме и отростках данных нейроноподобных клеток (рисунок, E). Фибробластоподобные клетки монослоя не экспрессировали  $\beta$ -III-тубулин, о чем свидетельствует отсутствие специфического окрашивания (рисунок, F).

Формирование сферических клеточных колоний при культивировании характерно для различных стволовых/прогениторных клеток [1]. Возможно, что формирование цитосфер в нашей работе связано именно с пролиферативной активностью слабо дифференцированных прогениторных клеток, присутствующих в медулле. Поскольку в наших экспериментах на ранних этапах культивирования нейроноподобных клеток в культуре не наблюдалось, мы предположили, что их появление является результатом дифференцировки клеток цитосфер.

Таким образом, состав ферментного раствора, применяемого для дезинтеграции ткани надпочечников новорожденных поросят, влияет на количественный и качественный состав полученной клеточной суспензии. В процессе культивирования полученных клеток формируются сферические клеточные кластеры – цитосферы, из которых затем выселяются нейроноподобные клетки. Нейрональная дифференцировка не зависела от состава питательной среды, в том числе от наличия каких-либо специфических факторов роста.

## Литература

1. Сукач А.Н., Иванов Э.Н. Образование сферических колоний как свойство стволовых клеток // Цитология. – 2007. – Т. 49, №11. – С. 916–922.
2. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.
3. Chung K. F., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla // Stem Cells. – 2009. – Vol. 27, №10. – P. 2602–2613.
4. Danhier P., Copetti T., De Preter G. et al. Influence of cell detachment on the respiration rate of tumor and endothelial cells // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, №1. – e53324.
5. Ehrhart-Bornstein M., Vukicevic V., Chung K.F. et al. Chromaffin progenitor cells from the adrenal medulla // Cell Mol. Neurobiol. – 2010. – Vol. 30, №8. – P. 1417–1423.
6. Santana M.M., Chung K.F., Vukicevic V. et al. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – Vol. 1, №11. – P. 783–791.

formed spherical clusters ('cytospheres') of several cells (Figure C). During further culturing the cytospheres reached 300 micron diameter and became visually compacted. This is probably due to synthesis of an extracellular matrix that the cells comprising cytospheres conducted to create a necessary microenvironment.

In some experiments the cytospheres were mechanically detached by pipetting and subcultured using the same medium composition. After the passage the cytospheres attached to the substrate, and thereafter we observed the migration of two cell types out of the cytospheres: fibroblast-like cells, as well as relatively small neuron-like ones with processes which formed a network (Figure D). Immunocytochemical staining revealed the expression of  $\beta$ -III-tubulin in the soma and processes of neuron-like cells (Figure E). Fibroblast-like cells of the monolayer did not express  $\beta$ -III-tubulin, as evidenced by the absence of specific staining (Figure F).

Forming of spherical cell colonies during culture is characteristic for different stem/progenitor cells [1]. It is possible that the formation of cytospheres in our experiments is associated with proliferative activity of poorly differentiated progenitor cells present in the medulla. Considering that in our experiments no neuron-like cells were observed in the culture at the early stages of culture, we assumed that their appearance was the result of differentiation of cytosphere cells.

Thus, the composition of the enzyme solution used for disintegration of newborn piglets adrenal tissue affects the quantitative and qualitative composition of the resulting cell suspension. During the culture of these cells spherical cell clusters, the cytospheres, were formed, which were then the source of neuron-like cells migration. Neuronal differentiation did not depend on the culture medium composition, in particular, on the presence of any particular growth factors.

## References

1. Sukach A.N., Ivanov E.N. Formation of spherical colonies as a property of stem cells // Tsitologiya. – Vol. 49, N11. – P. 916–922.
2. Freshney R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. New-York: Wiley-Blackwell, 2005. – 672 p.
3. Chung K. F., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla // Stem Cells. – 2009. – Vol. 27, N10. – P. 2602–2613.
4. Danhier P., Copetti T., De Preter G. et al. Influence of cell detachment on the respiration rate of tumor and endothelial cells // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N1. – e53324.
5. Ehrhart-Bornstein M., Vukicevic V., Chung K.F. et al. Chromaffin progenitor cells from the adrenal medulla // Cell Mol. Neurobiol. – 2010. – Vol. 30, N8. – P. 1417–1423.
6. Santana M.M., Chung K.F., Vukicevic V. et al. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – Vol. 1, N11. – P. 783–791.

