

## Изучение экспрессии хромогранина А в криоконсервированной культуре клеток надпочечников неонатальных поросята

О.Ю. Новикова, О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Т.П. Бондаренко  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Study of Chromogranin A Expression in Native and Cryopreserved Cell Culture of Adrenal Glands of Neonatal Piglets

O.Yu. Novikova, O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok, T.P. Bondarenko  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Хромогранин А (ХрА) относится к семейству кислых белков, которые составляют основной компонент секреторных гранул нейроэндокринных клеток. Изучение динамики экспрессии ХрА после криоконсервирования является актуальным, поскольку может выявить вероятные молекулярные перестройки клеток нейроэндокринной системы при действии холодовых факторов

Цель работы – изучение экспрессии ХрА в первичной культуре надпочечников неонатальных поросят до и после криоконсервирования.

Опыты проводили на надпочечниках поросят возраста  $P_0$ – $P_1$ . Органы фрагментировали, при этом одну часть фрагментов криоконсервировали в криозащитной среде, содержащей 10% ДМСО и 90% DMEM/F12 со скоростью охлаждения 0,3 град/мин, вторую подвергали ферментативной обработке [О. Сидоренко и соавт., 2012] для получения первичной культуры клеток. Клетки культивировали на среде DMEM/F12 с 10% фетальной телячьей сыворотки и антибиотиками в течение 9 суток при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По этому же методу получали первичную культуру из криоконсервированных фрагментов. Для цитофлуориметрического (ЦФ) и иммуноцитохимического (ИЦХ) анализов клетки фиксировали каждые трое суток. Для этого отдельно собирали флотирующие и растущие в виде монослоя клетки, окрашивали первичными кроличьими антителами к ХрА («Abcam», Великобритания) в разведении 1:200 и вторичными антикроличьими Alexa488-конъюгированными антителами («Abcam») в разведении 1:400. Анализ проводили на цитофлуориметре FACSCalibur («BD Biosciences», США). Данные ЦФ-анализа сравнивали с результатами, полученными при ИЦХ-анализе, для которого окрашенные антителами по стандартной методике культуры подвергали микроскопическому исследованию.

В результате ЦФ-анализа установлено, что процентное содержание клеток, позитивно-меченных антителами к ХрА, не изменяется в процессе культивирования во флотирующей и прикрепленной фракциях интактной культуры, и в среднем составляет (51,9 ± 2,4) и (75,9 ± 11,5)% соответственно. Сходная динамика была характерна для криоконсервированной культуры, в которой содержание ХрА-позитивных клеток составляло в среднем (51,0 ± 5,3) и (67,5 ± 6,5)% соответственно. Визуальный анализ первичной культуры показал ее неоднородный состав: на монослое присутствовали прикрепленные мультиклеточные сфероиды. Результаты ИЦХ-анализа показали уменьшение содержания ХрА в монослое и повышение в составе МС в течение срока культивирования.

Таким образом, криоконсервирование не оказывает значительного влияния на относительное количество клеток надпочечников, экспрессирующих ХрА *in vitro*. Качественное перераспределение ХрА-экспрессирующих клеток указывает на важность сохранения специфического микроокружения в первичной культуре надпочечников.

Chromogranin A (ChrA) belongs to the family of acid proteins, which form the main component of the secretory granules of neuroendocrine cells. The study of the dynamics of ChrA expression after cryopreservation is relevant, because may indicate the probable molecular rearrangements of neuroendocrine system cells under the action of cold factors.

The aim of the work was to study ChrA expression in the primary adrenal culture of neonatal piglets prior to and after cryopreservation.

The experiments were carried out in the adrenal glands of piglets of  $P_0$ – $P_1$  age. The adrenal glands were fragmented, one part of the fragments were cryopreserved in the cryoprotective medium containing 10% DMSO and 90% DMEM/F12 at a cooling rate of 0.3 deg/min. The second part was subjected to enzymatic treatment by [Sidorenko O. *et al.*, 2012] to obtain of the primary cell culture. The cells were cultured with DMEM/F12 medium with 10% fetal bovine serum and antibiotics for 9 days at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. By the same method, a primary culture was obtained from the cryopreserved fragments. The cells were fixed every 3 days for cytofluorimetric (CF) and immunocytochemical (ICC) analyzes. For this purpose, floating and adherent cells were separately collected. The cells were stained with primary rabbit antibodies to ChrA (Abcam, UK) at a dilution of 1:200 and secondary anti-rabbit Alexa488-conjugated antibodies (Abcam) at 1:400 dilution. Flow cytometry was performed with the FACSCalibur (BD Biosciences, USA). The data of CF-analysis were compared with the results of ICC-analysis, for which the cultures were stained with antibodies by the standard procedure and then microscopically examined.

As a result of the CF-analysis, it was established that the percentage of cells positively labeled with antibodies to ChrA did not change when culturing in floating and adherent fractions of the intact culture averaged (51.9 ± 2.4) and (75.9 ± 11.5)%, respectively. A similar dynamics was in cryopreserved culture, where the content of ChrA-positive cells were (51.0 ± 5.3) and (67.5 ± 6.5)%, respectively. Visual analysis of the primary culture showed its heterogeneous composition as the presence of attached multicellular spheroids (MS) on the cell monolayer. The results of the ICC-analysis showed a decrease of ChrA-positive cells in the monolayer and an increase of ChrA-positive cells in the MS during the culturing period.

Thus, cryopreservation does not significantly affect the relative quantity of adrenal gland cells expressing ChrA *in vitro*. The qualitative redistribution of ChrA-expressing cells points to the importance of maintaining a specific microenvironment in the primary adrenal cell culture.

