

Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят

UDC 57.086.833:615.361.451.014.41

O.S. SIDORENKO, G.A. BOZHOK*, E.I. LEGACH, T.M. GURINA Study of Possibility to Obtain and Cryopreserve Adrenal Cell Primary Culture of Newborn Piglets

Исследовали влияние способа криоконсервирования биологического материала (состав криозащитной среды, скорость охлаждения, криоконсервирование фрагментов ткани или первичной культуры) на жизнеспособность клеток надпочечников новорожденных поросят, а также их поведение при дальнейшем культивировании. Разработали способ криоконсервирования, позволяющий достичь высокой сохранности и жизнеспособности клеток, а также сохранить способность к адгезии и распластыванию при последующем культивировании.

Ключевые слова: фрагменты надпочечников, первичная культура клеток надпочечников, криоконсервирование, жизнеспособность, адгезия.

Досліджували вплив способу криоконсервування біологічного матеріалу (склад криозахисного середовища, швидкість охолодження, криоконсервування фрагментів тканини або первинної клітинної культури) на життєздатність клітин наднирників новонароджених поросят, а також їх поведінку при подальшому культивуванні. Розробили спосіб криоконсервування, який дозволяє досягти високого рівня збереження та життєздатності клітин, а також зберегти здатність до адгезії та розпластування при наступному культивуванні.

Ключові слова: фрагменти наднирників, первинна культура клітин наднирників, криоконсервування, життєздатність, адгезія.

There was investigated the effect of method of biological material cryopreservation (composition of cryoprotective medium, cooling rate, cryopreservation of tissue fragments or primary cell culture) on viability of newborn piglets adrenal cells as well as their behavior during further culturing. The cryopreservation method, enabling to achieve a high survival and viability of cells as well as to preserve their ability to adhesion and flattening during further culturing was developed.

Key words: adrenal fragments, primary culture of adrenal cells, cryopreservation, viability, adhesion.

Клеточная и тканевая трансплантация все чаще применяется для лечения заболеваний эндокринной системы, сопровождающихся недостаточной выработкой гормонов [11]. При лечении первичной и вторичной гормональной надпочечниковой недостаточности доказана эффективность трансплантации клеточных и органотипических культур надпочечников [6, 18, 21]. Для получения биологического материала в экспериментальных целях и для клинического применения в перспективе донорами клеток и тканей для ксенотрансплантации человеку могут быть свиньи.

Криоконсервирование – наиболее приемлемый способ долгосрочного хранения биологического материала до трансплантации. На современном этапе развития криобиологии разработаны режимы замораживания фрагментов и органотипических культур ткани надпочечников, позволяющие сохранить гормонопродуцирующую функцию клеток

Cell and tissue transplantation is mostly used for treatment of endocrine system diseases accompanied by insufficient hormone production [11]. During treatment of primary and secondary hormonal adrenal deficiency there was established the efficiency of cell and organotypic adrenal cultures' transplantation [6, 18, 21]. For obtaining the biological material for experimental purposes and clinical use the pigs could be perspective donors of cells and tissues for xenotransplantation in human.

Cryopreservation is the most reasonable method for long-term storage of biological material prior to transplantation. The freezing regimens for fragments and organotypic cultures of adrenal tissue, enabling to preserve hormone-producing cell function [4, 6] have been designed at the present stage of cryobiology development. However, organotypic culture does not manifest a proliferative activity under long-term culturing. Its trophic support is impaired during culturing, and there

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
bozhokgaru@mail.ru

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 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: bozhokgaru@mail.ru

[4, 6]. Однако органотипическая культура при долгосрочном культивировании не проявляет пролиферативной активности. В процессе культивирования нарушается ее трофическая поддержка, накапливаются вредные продукты обмена веществ, что приводит к деградации такой культуры на 5–7-е сутки культивирования [17]. Альтернативным источником биологического материала для трансплантации является первичная культура клеток (ПКК) надпочечников. Для получения ПКК нативная ткань подвергается измельчению на фрагменты и последующей ферментативной обработке (рис. 1). Полученные одиночные клетки помещаются в питательную среду для культивирования. Криоконсервирование позволяет хранить ПКК длительное время до момента трансплантации. Криоконсервирование биологического материала в виде фрагментов ткани более быстрый и экономически выгодный процесс по сравнению с криоконсервированием первичной культуры. Запас криоконсервированной ткани позволяет в любое время получить ПКК. При сохранении морфологических и функциональных особенностей, ПКК, полученные из криоконсервированных фрагментов ткани, могут быть использованы для дальнейших исследований или трансплантаций.

Криоконсервирование должно обеспечивать сохранность максимального количества жизнеспособных клеток. Кроме того, клетки, полученные из криоконсервированного материала и предназначенные для культивирования, должны обладать способностью к адгезии и расплыванию.

В доступной литературе отсутствуют сведения о получении ПКК из криоконсервированных фрагментов надпочечников. Также не разработана методика криоконсервирования ПКК надпочечников новорожденных поросят, полученных из нативных фрагментов ткани.

В нашей работе мы исследовали в сравнительном аспекте жизнеспособность и адгезию клеток надпочечников новорожденных поросят, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани, а также из криоконсервированной ПКК.

Цель работы – разработка способа криоконсервирования биологического материала в виде фрагментов ткани и ПКК надпочечников новорожденных поросят, позволяющего сохранить максимальное количество жизнеспособных клеток для дальнейшего культивирования.

Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (2007, Киев) и согласованными с положениями "Европейской Конвенции о защите позво-

is an accumulation of toxic products of metabolism, that results in degradation of the culture by the 5–7th day of culturing [17]. Primary cell culture (PCC) of adrenal glands is the alternative source of biological material for transplantation. For obtaining the PCC the tissue is fragmented and then treated with enzymes (Fig. 1). Obtained single cells are placed into nutrition medium for culturing. Cryopreservation enables to preserve PCC during long period prior to transplantation. Cryopreservation of biological material in the form of tissue fragments is more rapid and cost-effective process unlike the primary culture cryopreservation. The stock of cryopreserved tissue enables to obtain PCC when required. If morphology and functional peculiarities are preserved, the PCC, obtained from cryopreserved tissue fragments may be used for further research and transplantation.

Cryopreservation must provide the preservation of maximum number of viable cells. Moreover, the cells obtained from cryopreserved material and suitable for culturing should have the ability to adhesion and flattening.

The available literature does not contain the information on obtaining the PCC from cryopreserved fragments of adrenal glands. There is also no described method of cryopreservation of newborn piglet adrenal PCC obtained from native tissue fragments.

In this paper we compared the viability and adhesive ability of newborn piglet adrenal cells obtained from cryopreserved fragments of tissue and from cryopreserved PCC.

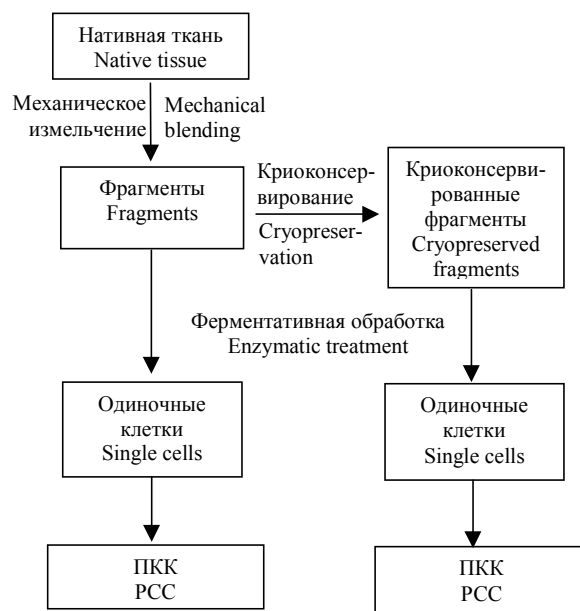


Рис. 1. Схема получения ПКК из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани.

Fig. 1. Diagram of PCC derivation from native and cryopreserved tissue fragments

ночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985).

Источником биологического материала служили новорожденные поросята первого поколения пород крупная белая и украинская мясная.

После экстирпации железы измельчали на фрагменты размером около 1 мм³, отмывали от крови 3–4 раза средой 199 ("Sigma", США) с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин). Фрагменты надпочечников криоконсервировали под защитой диметилсульфоксида (ДМСО) в конечной концентрации 10% с использованием двух режимов замораживания: в режиме 1 фрагменты охлаждали со скоростью 5°C/мин до –70°C на программном замораживателе "Cryoson" (Германия) с последующим погружением в жидкий азот, в режиме 2 – со скоростью 100–150°C/мин по методу [14] трехэтапным погружением в жидкий азот.

Клетки надпочечников новорожденных поросят получали из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани ферментативным способом. Замороженные фрагменты надпочечников отогревали на водяной бане при температуре 40°C, затем пятикратно отмывали от ДМСО средой 199 с антибиотиками. Фрагменты подвергали ферментативной обработке коллагеназой (тип IA, 1 мг/мл, "Sigma", США) и дезоксирибонуклеазой (0,1–0,15 мг/мл, "Sigma", США) на среде 199 при 37°C и постоянном помешивании в три этапа (30, 10 и 10 мин). После отмывки от коллагеназы и дезоксирибонуклеазы полученную суспензию клеток для удаления клеточного дебриса пропускали через нейлоновое сито с диаметром пор 125 мкм.

Клетки, полученные из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани, культивировали на питательной среде 199 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, "Sigma", США) и антибиотиков (пенициллин, канамицин) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

На 3–7-е сутки культивирования образовавшийся клеточный монослой открепляли от поверхности культивирования с использованием смеси растворов трипсина ("Sigma", США) и Версена ("Биолот", Россия) в соотношении 1:1 (конечная концентрация трипсина составляла 0,25%) при 37°C в течение 3 мин. К открепившимся клеткам добавляли среду 199 с 5% ЭТС, пипетировали, собирая их в отдельную пробирку. От трипсина клетки отмывали средой 199 с 5% ЭТС двукратным центрифугированием.

Для оценки возможного токсического влияния криопротектора ДМСО к суспензии клеток, полученной после открепления клеточного монослоя и отмывки от трипсина, добавляли раствор ДМСО, конечная концентрация которого составляла 10 и

The research aim was to develop the cryopreservation method for biological material in the form of tissue fragments and PCC of newborn piglet adrenal glands, enabling to preserve maximum number of viable cells for further culturing.

Materials and methods

The experiments in animals were performed according to the General ethical principles of experiments in animals, approved by the 3rd National congress on bioethics (Kiev, 2007) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1985).

The newborn piglets of first generation of Large White and Ukrainian Meat breeds were the source of biological material.

After extirpation the glands were fragmented into pieces of about 1 mm³, washed from blood thrice or four times with the medium 199 (Sigma, USA) supplemented with antibiotics (penicillin, streptomycin). The fragments of adrenal glands were cryopreserved under protection of dimethylsulfoxide (DMSO) in 10% final concentration using two freezing regimens: in the regimen 1 the fragments were cooled with the rate of 5°C/min down to –70°C in the programmable freezer "Cryoson" (Germany) and further plunging into liquid nitrogen; regimen 2 comprised three step plunging into liquid nitrogen with average cooling rate of 100–150°C/min according to the method [14].

The adrenal cells of newborn piglets were obtained from native and cryopreserved tissue fragments by enzymatic method. The frozen fragments of adrenal glands were thawed in water bath at 40°C, then five-times washed from DMSO by medium 199 supplemented with antibiotics. The fragments were enzymatically treated with collagenase (type IA, 1 mg/ml, Sigma, USA) and deoxyribonuclease (0.1–0.15 mg/ml, Sigma, USA) in medium 199 at 37°C and constant mixing during three cycles (30, 10 and 10 min). After washing from collagenase and deoxyribonuclease the cell debris was removed by filtering the obtained cell suspension through nylon sieve with pore diameter of 125 μm.

The cells obtained from native and cryopreserved tissue fragments were cultured in nutrition medium 199 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA) and antibiotics (penicillin, kanamycin) at 37°C in the 5% CO₂ atmosphere.

By the 3–7th culturing day the formed cell monolayer was detached from a culturing surface by trypsin (Sigma, USA) and Versene (Biolot, Russia) solutions' mixture in 1:1 ratio (final concentration of trypsin made 0.25%) at 37°C for 3 min. Medium 199 supplemented with 5% FBS was added to detached cells, then the

15%, и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от ДМСО средой 199 путем постепенного снижения концентрации ДМСО и центрифугирования. После этого подсчитывали количество клеток в камере Горяева и оценивали их жизнеспособность.

После открепления клеточного монослоя и отмывки от трипсина клетки осаждали центрифугированием, сливали надосадочную жидкость и добавляли равный объем соответствующей криозащитной среды двойной концентрации. В работе применяли несколько вариантов криозащитных сред: среда 199 с 5; 7; 10 и 15% ДМСО (конечная концентрация), а также среда 199 с 5; 7; 10 и 15% ДМСО в сочетании с 25% ЭТС (конечная концентрация).

Образцы ПКК замораживали со скоростью 1°C/мин до -70°C на программном замораживателе "Cryoson" (Германия) с последующим погружением в жидкий азот.

Замороженные образцы ПКК отогревали на водяной бане при температуре 40°C. Затем клетки отмывали от ДМСО средой 199 постепенным снижением концентрации ДМСО и центрифугированием.

Жизнеспособность клеток определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим [8] и выражали в процентах как отношение количества живых клеток к их общему количеству. Сохранность клеток в суспензии после криоконсервирования рассчитывали как количество клеток в суспензии после отогрева по отношению к количеству клеток до замораживания, выраженное в процентах.

После отогрева ПКК и отмывки от ДМСО клетки помещали в питательную среду и культивировали 6 ч 30 мин. После этого собирали культуральную среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, и подсчитывали их количество. Процент адгезии вычисляли по формуле:

$$A = \left[1 - \frac{НК}{ПК} \right] \cdot 100\%,$$

где НК – количество неприкрепившихся клеток; ПК – количество клеток, посаженных на культивирование.

При статистической обработке результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента [2]. Достоверными считались различия при $p < 0,05$. Данные представляли как среднее значений, полученных в серии аналогичных экспериментов ($n = 10$), \pm стандартное отклонение.

suspension was pipetted, and collected into separate tube. The cells were twice washed (with centrifugation) from trypsin by medium 199 supplemented with 5% FBS.

To estimate a possible toxic effect of DMSO cryoprotectant it's solution in final concentration of 10 and 15% was added to cell suspension obtained after detaching of cell monolayer and washing from trypsin and kept for 20 min at room temperature. Later the cells were washed from DMSO with medium 199 by a gradual reduction of DMSO concentration and centrifugation. Afterwards a number of cells was calculated in Goryaev's chamber and their viability was evaluated.

After detaching of cell monolayer and washing from trypsin the cells were sedimented by centrifugation, supernatant fluid was removed and an equal volume of certain cryoprotective medium of double concentration was added. During study we used the following variants of cryoprotective media: medium 199 with 5; 7; 10 and 15% DMSO (final concentration) as well as medium 199 with 5; 7; 10 and 15% DMSO in combination with 25% FBS (final concentration).

The samples of PCCs were frozen with the rate of 1°C/min down to -70°C in the programmable freezer "Cryoson" (Germany) with further plunging into liquid nitrogen.

The frozen samples of PCCs were thawed in water bath at 40°C. Then the cells were washed from DMSO with medium 199 by gradual reduction of DMSO concentration and centrifugation.

The cell viability was determined by the method of supravital staining with trypan blue [8] and expressed in percents as the ratio of viable cell number and their total number. The post-thaw cell survival in suspension was evaluated as a number of cells in suspension after thawing in respect of cell number prior to freezing, and expressed in percents.

After thawing of PCC and washing from DMSO the cells were placed into nutrition medium and cultured during 6 hrs 30 min. After that the culture medium containing non-attached cells was collected and their number was calculated. Adhesion percentage was calculated by the formula:

$$A = \left[1 - \frac{NC}{PC} \right] \cdot 100\%,$$

where NC is the number of non-attached cells; PC is the number of cells placed for culturing.

The results were statistically processed using the single-factor dispersion analysis and Student's t-criterion [2]. The differences were considered as statisti-

Результаты и обсуждение

Известно, что криопротекторы могут оказывать токсическое действие на клетку [5, 13]. Исследовали влияние наибольших концентраций ДМСО (как отдельно, так и в сочетании с 25% ЭТС), применяемых для криоконсервирования фрагментов и ПКК надпочечников, на жизнеспособность клеток. Объектом исследования являлась ПКК 7 суток культивирования. Контролем служили клетки той же культуры, прошедшие все этапы экспериментальной обработки, кроме добавления ДМСО (рис. 2).

Жизнеспособность клеток в контрольной пробе составляла $78,0 \pm 11,9\%$. Жизнеспособность клеток, обработанных ДМСО разной концентрации, колебалась от $68 \pm 13,3$ до $81,4 \pm 3,9\%$. Статистически достоверных различий между данными по жизнеспособности клеток представленных групп обнаружено не было. Это позволило сделать выводы, что ДМСО в концентрации до 15% не снижает этот показатель.

Следующим этапом работы было криоконсервирование фрагментов ткани надпочечников для получения из них ПКК. Для этого был выбран криопротектор ДМСО в конечной концентрации 10%. Ранее была показана эффективность криоконсервирования органотипических культур надпочечников [14], а также кластеров хромоаффинной ткани [22] именно с такой концентрацией ДМСО.

Жизнеспособность клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов надпочечников, замороженных в режимах 1 и 2, была достоверно ниже по сравнению с жизнеспособностью клеток, полученных из нативных фрагментов ткани (рис.3), и составляла $46,2 \pm 20,6$ и $37,6 \pm 12,7\%$ соответственно. Жизнеспособность клеток, полученных из нативных фрагментов ткани, составляла $76,1 \pm 6,2\%$.

Таким образом, жизнеспособность клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов надпочечников, значительно снижается вне зависимости от выбранных режимов замораживания фрагментов. Возможно, это связано с разрушительным действием криоповреждающих факторов и последующей ферментативной обработкой фрагментов ткани.

Как известно, большинство нетрансформированных клеток млекопитающих (за исключением лимфоцитов) для роста в культуре нуждаются в прикреплении к поверхности культивирования. Неприкрепившиеся к поверхности клетки быстро дегенерируют [1]. Для получения ПКК из криоконсервированных фрагментов ткани необходимо сохранить свойства клеток прикрепляться к поверхности культивирования и способность к пролиферации. Однако мы обнаружили, что при культивировании клеток, полученных из криоконсервирован-

нally significant at $p < 0.05$. The data were presented as an mean of values, obtained in the series of analogous experiments ($n = 10$) \pm standard deviation.

Results and discussion

Cryoprotectants are known to affect toxically the cell [5, 13]. We studied the effect of the highest concentrations of DMSO (both separately and in combination with 25% of FBS) used for cryopreservation of fragments and adrenal PCCs on cell viability. The research object was PCC after 7 days of culturing. As the control served the cells of the same culture specimen, underwent all the stages of experimental treatment, except addition of DMSO (Fig. 2).

Viability of cells in the control sample made $78.0 \pm 11.9\%$. Viability of cells, treated with DMSO of different concentration varied from 68 ± 13.3 to $81.4 \pm 3.9\%$. No statistically significant differences were found between the data on cell viability of presented groups. This enabled to conclude that 15% DMSO did not reduce this index.

The following research stage was cryopreservation of the fragments of adrenal tissue for deriving the PCCs from them. For this aim we selected DMSO cryoprotectant in 10% final concentration. Earlier this concentration was shown as the efficient one during cryopreservation of adrenal organotypic cultures [14] as well as clusters of chromaffin tissue [22].

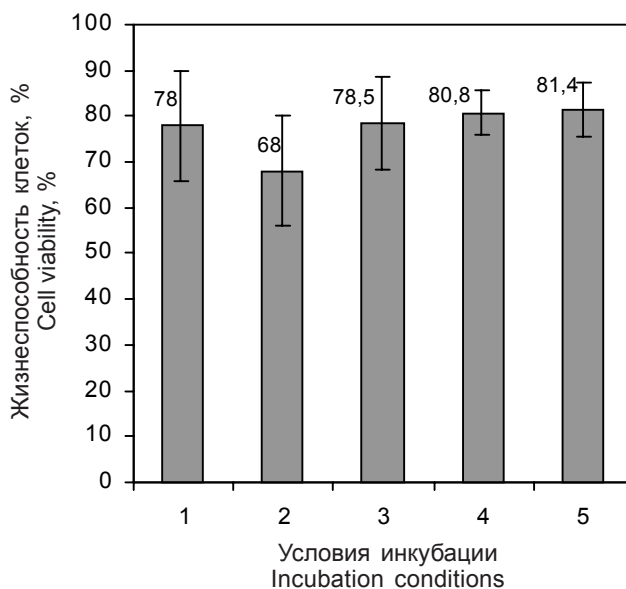


Рис. 2. Зависимость жизнеспособности клеток надпочечников новорожденных поросят от концентрации ДМСО в среде инкубации: 1 – без ДМСО; 2 – 10% ДМСО; 3 – 15% ДМСО; 4 – 10% ДМСО + 25% ЭТС; 5 – 15% ДМСО + 25% ЭТС.

Fig. 2. Dependence of adrenal cell viability of newborn piglets vs. DMSO concentration in incubation medium: 1 – without DMSO (the control); 2 – 10% DMSO; 3 – 15% DMSO; 4 – 10% DMSO + 25% FBS; 5 – 15% DMSO + 25% FBS.

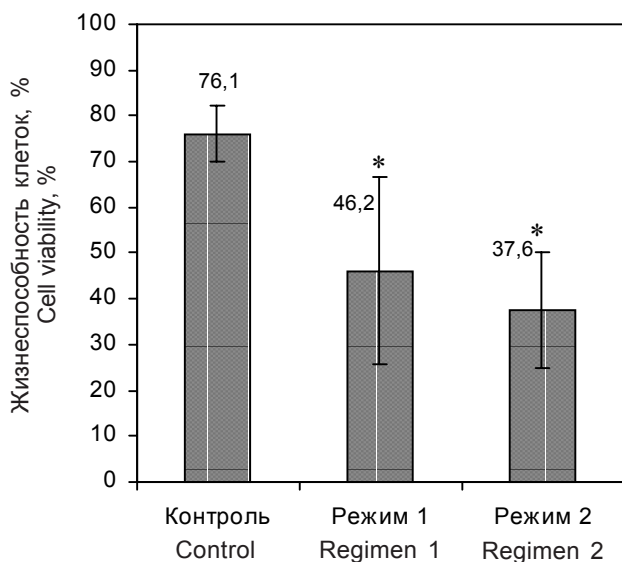


Рис.3. Жизнеспособность клеток, полученных из фрагментов ткани надпочечников, криоконсервированных в режимах 1 и 2; * – отличия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$. Контролем служили клетки, полученные из нативных фрагментов ткани.

Fig. 3. Viability of cells derived from adrenal tissue fragments cryopreserved with regimens 1 and 2; * – differences were significant if compared with the control, $p < 0.05$. The cells derived from native tissue fragments were the control.

ных фрагментов, замороженных в режимах 1 и 2, к 3-м суткам видны одиночные живые клетки, плавающие в среде, а также прикрепившиеся, но не распластанные. В таких культурах не происходила пролиферация клеток и формирование монослоя в течение 12 суток культивирования. Вероятно, это связано с повреждением белков цитоскелета [3], принимающих участие в распластывании и движении клеток на поверхности культивирования [24].

Криоконсервирование фрагментов надпочечников новорожденных поросят с использованием описанных скоростей охлаждения не позволяет получить ПКК, поскольку такие клетки не распластываются на поверхности культивирования, что исключает возможность формирования монослоя. Вероятно, желаемого результата удастся достигнуть, изменяя режим криоконсервирования так, чтобы нивелировать повреждения клеток во время замораживания фрагментов ткани.

В связи с тем, что нам не удалось получить ПКК из криоконсервированных фрагментов ткани надпочечников, была предпринята попытка криоконсервировать ПКК, полученную из нативных фрагментов ткани. После 1-х суток культивирования клетки, полученные из нативных надпочечных желез, прикреплялись к поверхности и распластывались. К 3–4-м суткам образовывался монослой из крупных фибробластоподобных и веретено-

Viability of cells obtained from cryopreserved adrenal fragments frozen-thawed using regimens 1 and 2 was significantly lower if compared with viability of cells obtained from native tissue fragments (Fig. 3) and made 46.2 ± 20.6 and $37.6 \pm 12.7\%$, correspondingly (Fig. 3). The viability of cells obtained from native tissue fragments made $76.1 \pm 6.2\%$.

Thus, viability of cells obtained from cryopreserved adrenal fragments significantly decreases independently on chosen regimens for the fragments' freezing. Probably this is caused by destructive effects of cryodamaging factors and following enzymatic treatment of tissue fragments.

Most non-transformed mammalian cells (except lymphocytes) are known to require the attachment onto culturing surface for growth in culture. The non-attached cells rapidly degenerate [1]. To obtain PCC from cryopreserved tissue fragments it is necessary to preserve the properties of cells to attach to culturing surface as well as the proliferation ability. However, during culturing of cells, obtained from cryopreserved fragments, frozen-thawed according to regimens 1 and 2 we observed by the 3rd day only the single viable cells, floating in the medium, as well as attached, but not flattened cells. In these cultures no cell proliferation and monolayer formation occurred during 12 days of culturing. Probably it is associated with impairments in cytoskeleton proteins [3], participating in cell spreading and movement on culturing surface [24].

Freeze-thawing of adrenal fragments of newborn piglets using the described cooling rates did not allow to obtain PCC: the frozen-thawed cells did not flatten on culturing surface, making the monolayer formation not possible. Probably, the better result could be achieved by changing the freeze-thawing regimen parameters in a manner to neutralize cell damaging when freezing tissue fragments.

Unsuccessful attempts of obtaining the PCC from the cryopreserved fragments of adrenal tissue led us to check if cryopreservation of PCC obtained from native tissue fragments is possible. After the 1st day of culturing the cells obtained from native adrenal glands attached to the surface and flattened. By the 3rd–4th day there was formed the monolayer of large fibroblast-like and spindle-shaped cells. By the 3rd–7th day of culturing the monolayer was detached from the cultural surface and the cell suspension was frozen.

To cryopreserve mammalian PCC the most widely applied methods include the regimens providing slow cooling rates [1] with 10% DMSO solution as cryoprotectant [13, 20]. In our experiments on PCC cryopreservation we tested DMSO concentrations from 5 to 15%. In parallel series of experiments the FBS was added into the cryoprotective media with the same DMSO concentrations.

образных клеток. На 3–7-е сутки культивирования монослой открепляли от поверхности культуральных сосудов, полученные клетки замораживали.

Для криоконсервирования ПМК млекопитающих наиболее широко применяются режимы, предусматривающие медленные скорости охлаждения [1], с использованием 10%-го раствора ДМСО в качестве криопротектора [13, 20]. В наших экспериментах по криоконсервированию ПМК были опробованы концентрации ДМСО от 5 до 15%. В параллельной серии экспериментов к криозащитным средам с аналогичными концентрациями ДМСО добавлялась ЭТС.

Известно, что ЭТС помогает сбалансировать осмотическое давление при криоконсервировании клеточных культур, поэтому она часто применяется как компонент криозащитной среды [12, 15, 20]. Однако данные о влиянии сыворотки на жизнеспособность криоконсервированных клеток противоречивы. Так, в работе [15] показано, что добавление ЭТС в криозащитную среду способствует повышению жизнеспособности стволовых клеток опухоли мозга. В [20] отмечено отсутствие влияния ЭТС на жизнеспособность фибробластов при криоконсервировании сосудов.

Необходимо учитывать, что многие исследователи отказываются от применения сыворотки для снижения риска контаминации клеточной культуры и стандартизации условий эксперимента [10, 16, 21].

Исследовали влияние ЭТС как добавочного компонента криозащитной среды на сохранность и жизнеспособность клеток надпочечников при криоконсервировании ПМК. Содержание ЭТС в составе криозащитной среды составляло 25%. Оценивали сохранность и жизнеспособность клеток, криоконсервированных в криозащитных средах, содержащих различные концентрации ДМСО (5; 7; 10; 15%) без ЭТС и с добавлением 25% ЭТС (рис. 4). Сохранность клеток, криоконсервированных в описанных средах, колебалась от $62,4 \pm 17,1$ до $89,0 \pm 17,6\%$. При добавлении в криозащитную среду ЭТС жизнеспособность клеток достоверно увеличивалась. Так, жизнеспособность клеток в каждой пробе с ЭТС была выше по сравнению с пробами, содержащими ту же концентрацию ДМСО, но без ЭТС. Наибольшие показатели жизнеспособности выявлялись в образцах, криоконсервированных в средах с 5; 7; 10% ДМСО в сочетании с 25% ЭТС. В этих пробах жизнеспособность составляла от $87,1 \pm 8,4$ до $91,0 \pm 6,2\%$. Жизнеспособность клеток, криоконсервированных в среде с 15% ДМСО и 25% ЭТС, оказалась ниже по сравнению с остальными пробами с ЭТС. Вероятно, это связано с тем, что ДМСО в концентрации 15% является токсичным для клеток при криоконсервировании.

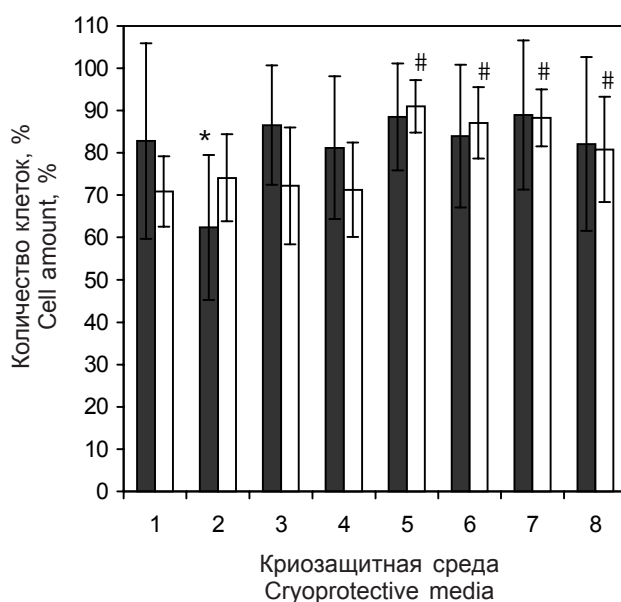


Рис. 4. Сохранность (■) и жизнеспособность (□) клеток надпочечников, криоконсервированных в виде ПМК в различных криозащитных средах: 1 – 5% ДМСО; 2 – 7% ДМСО; 3 – 10% ДМСО; 4 – 15% ДМСО; 5 – 5% ДМСО + 25% ЭТС; 6 – 7% ДМСО + 25% ЭТС; 7 – 10% ДМСО + 25% ЭТС; 8 – 15% ДМСО + 25% ЭТС; * – отличия достоверны по сравнению с данным показателем в средах других составов, $p < 0,05$; # – отличия достоверны по сравнению с данным показателем в средах, содержащих те же концентрации ДМСО, но без ЭТС, $p < 0,05$.

Fig. 4. Cell survival rate (■) and viability (□) of adrenal cells cryopreserved as PCCs in different cryoprotective media: 1 – 5% DMSO; 2 – 7% DMSO; 3 – 10% DMSO; 4 – 15% DMSO; 5 – 5% DMSO + 25% FBS; 6 – 7% DMSO + 25% FBS; 7 – 10% DMSO + 25% FBS; 8 – 15% DMSO + 25% FBS; * – differences are significant if compared with given index in the media containing the same DMSO concentrations, but without FBS, $p < 0.05$.

It has been known that FBS assists to balance osmotic pressure during cryopreservation of cell cultures, therefore it is often used as a component of cryoprotective medium [12, 15, 20]. However, the data on effect of the serum on survival of frozen-thawed cells are contradictory. For example, it was shown recently [15] that FBS addition into cryoprotective medium resulted in increased viability of brain tumor stem cells. Other authors reported [20] the absence of FBS effect on fibroblasts' viability during freezing-thawing of vessels.

It should be also considered that many researchers decline the application of the serum to decrease the risk of contamination of cell culture and to standardize the experimental conditions [10, 16, 21].

The effect of FBS as a supplement of cryoprotective medium on adrenal cell number preservation rate and viability after freeze-thawing of PCCs was studied. The content of FBS in composition of cryoprotective medium made 25%. The cell survival and viability

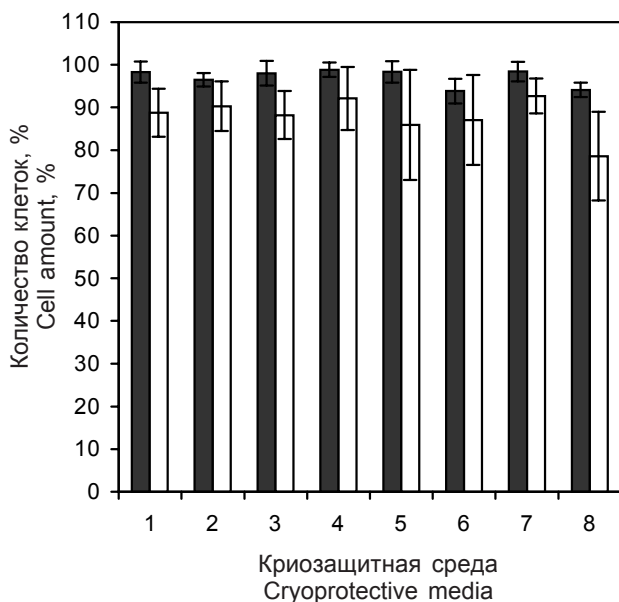


Рис. 5. Относительное количество прикрепившихся (■) и распластанных (□) клеток, полученных из нативных фрагментов надпочечников и криоконсервированных в виде ПКК в различных криозащитных средах: 1 – 5% ДМСО; 2 – 7% ДМСО; 3 – 10% ДМСО; 4 – 15% ДМСО; 5 – 5% ДМСО + 25% ЭТС; 6 – 7% ДМСО + 25% ЭТС; 7 – 10% ДМСО + 25% ЭТС; 8 – 15% ДМСО + 25% ЭТС.

Fig. 5. Relative number of attached (■) and flattened (□) cells derived from native fragments of adrenal glands and cryopreserved as PCCs in different cryoprotective media: 1 – 5% DMSO; 2 – 7% DMSO; 3 – 10% DMSO; 4 – 15% DMSO; 5 – 5% DMSO + 25% FBS; 6 – 7% DMSO + 25% FBS; 7 – 10% DMSO + 25% FBS; 8 – 15% DMSO + 25% FBS.

При культивировании клеток, полученных из криоконсервированных ПКК, большая часть из них прикреплялась и распластывалась на поверхности культуральных сосудов уже через 6 ч 30 мин культивирования.

Мы оценивали отношение прикрепившихся клеток к общему количеству клеток, посаженных на культивирование, а также долю распластанных клеток среди всех прикрепившихся. Полученные результаты, выраженные в процентах, отражены на диаграмме (рис. 5).

После 6 ч 30 мин культивирования большая часть клеток, полученных из нативных фрагментов надпочечников и криоконсервированных в виде ПКК, прикрепилась к поверхности культивирования. Статистически достоверной разницы по степени адгезии и количеству распластанных клеток между исследуемыми образцами не наблюдалось. Степень адгезии составляла в среднем от 95,3 до 98,8%, при этом 78,6–92,7% всех прикрепившихся клеток распластывались. Таким образом, криоконсервирование ПКК надпочечников с использованием всех выбранных нами составов криозащитных сред позволяет сохранить адгезивную способность клеток на высоком уровне, что является необходимым условием для их пролиферации и формирования клеточного монослоя при дальнейшем культивировании.

Выводы

1. Клетки, полученные из фрагментов надпочечников новорожденных поросят, криоконсервированных согласно двум режимам: со скоростью 1°C/мин до –70°C и последующим погружением в жидкий азот и со скоростью 100–150°C/мин путем погружения в жидкий азот; характеризуются низ-

after freeze-thawing in cryoprotective media containing various DMSO concentrations (5; 7; 10 and 15%) without FBS and with 25% FBS were evaluated (Fig. 4). The cell survival rate after freeze-thawing in the described media varied from 62.4 ± 17.1 to $89.0 \pm 17.6\%$. The addition of FBS into cryoprotective medium significantly increased the cell viability. For example the cell viability in each sample with FBS was higher if compared with the samples containing the same DMSO concentration, but without FBS. The highest indices of viability were revealed in the samples cryopreserved in the media with 5; 7 and 10% DMSO in combination with 25% FBS. In these samples the viability made from 87.1 ± 8.4 to $91.0 \pm 6.2\%$. The viability of cells frozen-thawed in the medium with 15% DMSO and 25% FBS was lower if compared with the other samples with FBS. Maybe it is due to the toxic effect of 15% concentration of DMSO on the cells during freeze-thawing.

When culturing the cells obtained from frozen-thawed PCCs their major part had attached and flattened on the culturing surface already in 6 hrs and 30 min of culturing.

We evaluated the ratio of the attached cells to total number of cells subjected to culturing as well as the part of flattened cells among all the attached ones. The obtained results expressed in percents were shown in the diagram (Fig. 5).

After 6 hrs and 30 min of culturing we observed the attachment to culturing surface of the major part of the cells obtained from the native adrenal fragments and frozen-thawed in the form of PCCs. There was no statistically significant difference of adhesion rate and a number of flattened cells between the studied samples. The adhesion rate made in average from 95.3 to 98.8%, herewith 78.6–92.7% of all the attached cells were flattened. Thus, freeze-thawing of adrenal PCCs using all the chosen compositions of cryoprotective media enabled to preserve high adhesive ability of cells, that is the essential condition for their proliferation and formation of cell monolayer during further culturing.

кой жизнеспособностью, при культивировании не распластаются и не образуют монослоя.

2. Криоконсервирование ПМК надпочечников новорожденных поросят со скоростью 1°C/мин до -70°C и последующим погружением в жидкий азот обеспечивает высокую сохранность и жизнеспособность клеток, а также позволяет сохранить их адгезивные свойства. Для криоконсервирования ПМК можно рекомендовать криозащитные среды, содержащие 5; 7; 10% ДМСО с добавлением 25% ЭТС. Такой состав сред обеспечивает максимальную сохранность и жизнеспособность клеток после отогрева.

3. Сравнительный анализ жизнеспособности и адгезивных свойств клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов, а также из криоконсервированной ПМК надпочечников новорожденных поросят, показал, что наиболее успешным способом сохранения клеток надпочечников для дальнейшего культивирования является криоконсервирование первичной культуры.

Литература

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков.– М.: Мир, 1983.– 263 с.
2. *Атраментова Л.А., Утевская О.М.* Статистические методы в биологии.– Горловка, 2008.– 248 с.
3. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
4. *Бондаренко Т.П., Алабедалькарим Н.М., Божок Г.А. и др.* Трансплантация криоконсервированного эндокринного материала как метод коррекции различных патологий у экспериментальных животных // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 393–397.
5. *Глушко Т.А.* Особенности пролиферации клеточных культур после контакта с криопротекторами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1983.– 22 с.
6. *Легач Е.И.* Опыт клинического использования криоконсервированной адренокортикальной ткани // Проблемы криобиологии.– 2000.– №3.– С. 85–90.
7. *Легач Е.И.* Комбинированная трансплантация криоконсервированных органотипических культур эндокринных желез: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.– Харьков, 2009.– 37 с.
8. *Меньшиков В.В.* Лабораторные методы исследования. Справочник.– М.: Медицина, 1987.– 398 с.
9. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
10. *Трошкова Г.П., Мартынец Л.Д., Кирова Е.В. и др.* Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток VERO // Фундаментальные исследования.– 2005.– №5.– С. 94.
11. *Турчин І.С.* Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія.– 1996.– Т. 1, №2.– С. 6–13.
12. *Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др.* Криоконсервирование клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
13. *Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. и др.* Влияние криопротекторов на биологические системы.– Киев: Наук. думка, 1989.– 240 с.

Conclusions

1. The cells obtained from the newborn piglet adrenal fragments frozen-thawed according the two regimens: with the rate of 1°C/min down to -70°C and further plunging into liquid nitrogen and with the rate of 100–150°C/min by plunging into liquid nitrogen; are characterized by low viability, do not flatten and form monolayer when culturing.

2. Cryopreservation of adrenal PCCs of newborn piglets with the rate of 1°C/min down to -70°C and further plunging into liquid nitrogen provides a high cell survival rate and viability, as well as enables to preserve their adhesive properties. For cryopreservation of PCCs the cryoprotective media containing 5; 7; 10% DMSO with addition of 25% FBS could be recommended. This composition of media provides maximum preservation of cell number and viability after thawing.

3. The comparative analysis of viability and adhesive properties of cells obtained from frozen-thawed fragments as well from frozen-thawed PCCs of newborn piglet adrenal glands showed that cryopreservation of primary culture was the most useful method to preserve adrenal cells for further culturing.

References

1. *Adams R.* Methods of cell culture for biochemists.– Moscow: Mir, 1983.– 263 p.
2. *Atramentova L.A., Utevskaia O.M.* Statistical methods in biology.– Gorlovka, 2008.– 248 p.
3. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Nauk. Dumka, 1994.– 430 p.
4. *Bondarenko T.P., Alabedal'karim N.M., Bozhok G.A. et al.* Transplantation of cryopreserved endocrine material as correction method of different pathologies in experimental animals // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 393–397.
5. *Glushko T.A.* Proliferation peculiarities of cell cultures after contact with cryoprotectants: Abstract of the thesis of cand. biol. sci.– Kharkov, 1983.– 22 p.
6. *Legach E.I.* The experience of cryopreserved adrenocortical tissue clinical usage // Problems of Cryobiology.– 2000.– N3.– P. 85–90.
7. *Legach E.I.* Combined transplantation of cryopreserved organotypical cultures of endocrine glands: Abstract of the thesis of cand. med. sci.– Kharkov, 2009.– 37 p.
8. *Men'shikov V.V.* Laboratory methods of research. Manual.– Moscow: Meditsina, 1987.– 398 p.
9. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M. et al.* Cryoprotectants.– Kiev: Nauk. Dumka, 1978.– 204 p.
10. *Troshkova G.P., Martynets L.D., Kirova E.V. et al.* Without serum nutrition medium for culturing of VERO cells // Fundamental'nye issledovaniya.– 2005.– N5.– 94 p.
11. *Turchin I.S.* Problem of transplantation of tissues and cells cultures of endocrine glands to patients with different forms of endocrinopathies // Endokrinologiya.– 1996.– Vol. 1, N2.– P. 6–13.
12. *Tsutsaeva A.A., Agranenko V.A., Fedorova L.I. et al.* Cryopreservation of cell suspensions.– Kiev: Nauk. Dumka, 1983.– 240 p.

14. Патент №4567 (Україна), МПК⁷, №12N5/08, A01N1/02. Спосіб криоконсервування органної культури надниркових залоз. Т.М. Гурина, Н.М. Алабедалькарим, В.Д. Устиченко, Т.П. Бондаренко. Заявлено 07.06.2004. Опубл. 17.01.05 // Бюл. №1, 2005.
15. Chong Y.K., Toh T.B., Zaiden N. et al. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme // Stem Cells.– 2009.– Vol. 27, N1.– P. 29–39.
16. Chu Y., Wu B.M., McCabe E.R., Dunn J.C.Y. Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells // J. Pediatr. Surg.– 2006.– Vol. 41, N12.– P. 2008– 2012.
17. 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 adrenocorticotrophic hormone: rationalization of *in vitro* and *in vivo* findings // Biol. Reprod.– 1990.– Vol. 42, N4.– P. 683–691.
18. Dunn J.C.Y., Chu Y., Lam M.M. et al. Adrenal cortical cell transplantation // J. Pediatr. Surg.– 2004.– Vol. 39, N12.– P. 1856–1858.
19. Lee M.-K., Bae Y.H. Cell transplantation for endocrine disorders // Adv. Drug Deliv. Rev.– 2000.– Vol. 42, N 1–2.– P. 103–120.
20. Nakayama S., Ban T., Okamoto Y. Fetal bovine serum is not necessary for the cryopreservation of aortic valve tissues // J. Thorac. Cardiovasc. Surg.– 1994.– Vol. 108, N3.– P. 583–586.
21. Seeliger H., Hoffmann M.W., Behrend M. et al. Transplantation of H-2Kb-transgenic adrenocortical cells in the mouse having undergone an adrenalectomy: functional and morphological aspects // Transplant.– 2000.– Vol. 69, N8.– P. 1561–1566.
22. Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // Brain Res.– 1988.– Vol. 454, N1–2.– P. 383–386.
23. Valk J., Brunner D., De Smet K. et al. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods // Toxicol. In Vitro.– 2010.– Vol. 24, N4.– P. 1053–1063.
24. Zaidel-Bar R., Ballestrem C., Kam Z., Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells // J. Cell Sci.– 2003.– Vol. 116, N22.– P. 4605–4613.
13. Yurchenko T.N., Kozlova V.F. Skorniyakov B.A. et al. Effect of cryoprotectants on biological systems.– Kiev: Nauk. Dumka, 1989.– 240 p.
14. Patent N4567 (Ukraine), IPC⁷, N12N5/08, A01N1/02. Cryopreservation method of organ culture of adrenal glands. T.M. Gurina, N.M. Alabedal'karim, V.D. Ustichenko, T.P. Bondarenko. Applied 07.06.2004, Publ. 17.01.05 // Bull. N1, 2005.
15. Chong Y.K., Toh T.B., Zaiden N. et al. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme // Stem Cells.– 2009.– Vol. 27, N1.– P. 29–39.
16. Chu Y., Wu B.M., McCabe E.R., Dunn J.C.Y. Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells // J. Pediatr. Surg.– 2006.– Vol. 41, N12.– P. 2008– 2012.
17. 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 adrenocorticotrophic hormone: rationalization of *in vitro* and *in vivo* findings // Biol. Reprod.– 1990.– Vol. 42, N4.– P. 683–691.
18. Dunn J.C.Y., Chu Y., Lam M.M. et al. Adrenal cortical cell transplantation // J. Pediatr. Surg.– 2004.– Vol. 39, N12.– P. 1856–1858.
19. Lee M.-K., Bae Y.H. Cell transplantation for endocrine disorders // Adv. Drug Deliv. Rev.– 2000.– Vol. 42, N 1–2.– P. 103–120.
20. Nakayama S., Ban T., Okamoto Y. Fetal bovine serum is not necessary for the cryopreservation of aortic valve tissues // J. Thorac. Cardiovasc. Surg.– 1994.– Vol. 108, N3.– P. 583–586.
21. Seeliger H., Hoffmann M.W., Behrend M. et al. Transplantation of H-2Kb-transgenic adrenocortical cells in the mouse having undergone an adrenalectomy: functional and morphological aspects // Transplant.– 2000.– Vol. 69, N8.– P. 1561–1566.
22. Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // Brain Res.– 1988.– Vol. 454, N1–2.– P. 383–386.
23. Valk J., Brunner D., De Smet K. et al. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods // Toxicol. In Vitro.– 2010.– Vol. 24, N4.– P. 1053–1063.
24. Zaidel-Bar R., Ballestrem C., Kam Z., Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells // J. Cell Sci.– 2003.– Vol. 116, N22.– P. 4605–4613.

*Поступила 02.11.2010
Рецензент І.В. Белочкина*

Accepted in 02.11.2010