

Криоустойчивость органотипических культур, полученных из тканей надпочечников крыс разного возраста

UDC 57.043.085.23

T.P. BONDARENKO^{1*}, YU.KH. RUMIEKH²

Cryoresistance of Organotypic Cultures Derived from Adrenal Tissues of Rats of Various Ages

В работе исследована криочувствительность органотипических культур из тканей надпочечников белых крыс разного возраста (1, 3, 6 12 и 24 месяцев) на основе анализа жизнеспособности клеток в культуре до и после криоконсервирования в присутствии 5% ДМСО. Установлено, что секретирующая способность клеток культуры зависит от возраста животного, из тканей которого получены культуры. Культуры, полученные из тканей старых животных (12-24 месяцев), имеют меньшую активность и более чувствительны к действию низких температур.

Ключевые слова: криоконсервирование, органотипические культуры надпочечников, секреция гормонов, жизнеспособность, возраст животного.

У роботі досліджено криочутливість органотипічних культур із тканин наднирників білих щурів різного віку (1, 3, 6, 12 та 24 місяців) на підставі аналізу життєздатності клітин в культурі до і після криоконсервування в присутності 5% ДМСО. Встановлено, що секретуюча здібність клітин культур залежить від віку тварин, з тканин якого отримані культури. Культури з тканин старих тварин (12-24 місяців) мають меншу активність та більш чутливі до дії низьких температур.

Ключові слова: криоконсервування, органотипічні культури наднирників, секреція гормонів, життєздатність, вік тварин.

The paper covers the studies in cryosensitivity of organotypic cultures derived from the adrenal tissues of white rats of various ages (1, 3, 6, 12 and 24 months) based on the analysis of viable cells in culture prior to and after cryopreservation in 5% dimethyl sulfoxide presence. It has been established that secreting ability of culture cells depends on an age of the animal that the tissues were derived from. The cultures of tissues of aged animals (12-24 months) have lower activity and higher sensitivity to low temperature effect.

Key-words: cryopreservation, adrenal organotypic cultures, hormone secretion, viability, animal's age.

Интерес медиков и биологов к изучению физиологии коры надпочечников обусловлен тем, что этот орган отвечает за адаптацию организма млекопитающих, определяющую роль в которой играют синтез и секреция глюкокортикоидов. Среди данных гормонов высокой биологической активностью обладают кортикостерон, альдостерон, кортизон и кортизол, а наибольшим глюкокортикоидным эффектом – кортикостерон и кортизол, что связано с наличием гидроксильной группы в 11-м положении циклопентанпергидрофенантронового ядра.

Видовой особенностью крыс является доминирующий синтез кортикостерона [10]. Секреция и синтез глюкокортикоидов регулируются аденокортикотропным гормоном (АКТГ). Утрата надпочечниками глюкокортикоидной функции надпочечников у млекопитающих ведет к летальному исходу. При старении организма гормональная активность тканей данной железы снижается [7].

При оптимальном способе криоконсервирования органотипических культур тканей надпочеч-

Interest of medical workers and biologists to the studying of adrenal cortex physiology is stipulated by the fact that this organ is responsible for adaptation of mammalian organism, the determining role in which is played by the synthesis and secretion of glucocorticoids. Among the mentioned hormones corticosterone, aldosterone, cortisone and cortisol possess a biological activity and the highest glucocorticoid effect have corticosterone and cortisol. This is related to the presence of hydroxyl-group in the 11th position of cyclopentene hydrophenantren nucleus.

The species peculiarity of rats is dominating synthesis of corticosterone [10]. Secretion and synthesis of glucocorticoids are regulated with adrenocorticoid hormone (ACTH). The loss of glucocorticoid function by adrenal glands results in lethal outcome for mammals. With ageing this organ hormonal activity of changes in them [7].

At optimal cryopreservation protocol for organotypic cultures about 15% of cells die in adrenal tissues [6]. There was supposed that during cryopreservation older cells died, since it made them more sensitive to

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²V.N. Karazin Kharkov National University, 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: cryo@online.kharkov.ua

ников погибает около 15% клеток [6]. Было выдвинуто предположение, что при криоконсервировании погибают более старые клетки, поскольку с возрастом происходят изменения липидного состава мембран, что делает их более чувствительными к воздействию экстремальных условий среды [8]. К тому же известно, что плазматические мембраны – первичное звено повреждений при действии низких температур [1].

Цель данной работы – исследование криоустойчивости органотипических культур тканей надпочечников крыс разного возраста.

Материалы и методы

Исследования были проведены на белых беспородных крысах разного возраста (1, 3, 6, 12 и 24 месяцев), содержащихся в стандартных условиях вивария. Все манипуляции с животными проводили согласно положениям “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Экстирпацию эндокринных желез осуществляли с соблюдением строгих правил асептики и антисептики у животных после легкого наркоза эфиром и декапитации. Культивирование осуществляли по стандартной методике [9] в течение 5 суток.

Культуру клеток замораживали под защитой 5% ДМСО [6] в криостойких ампулах объемом 2 мл со скоростью охлаждения 1°C/мин до –80°C и последующим погружением в жидкий азот, отогревали на водяной бане при 42°C.

Жизнеспособность клеток в культуре определяли колориметрическим методом de Miguel в модификации [3]. Количество жизнеспособных клеток определяли окрашиванием суправитальным красителем трипановым синим после ферментативного расщепления фрагментов органотипических культур надпочечников. За 100% было принято общее количество клеток ткани, используемой для культивирования. При оценке жизнеспособности клеток после замораживания-отогрева за 100% была принята жизнеспособность клеток до криоконсервирования.

Содержание глюкокортикоидов определяли флуориметрическим методом Резникова в модификации [2].

Экстракты гипофиза (ЭГ) получали по описанию в работе [6], нормировали на количество белка, измеренное по методу Бредфорда [4], вводили в культуру клеток и после 1 ч инкубирования регистрировали реакцию на АКТГ, содержащийся в ЭГ.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по методу Стьюдента-Фишера [5].

the effect of extreme environmental conditions [8]. It is also known that plasma membranes are the primary links of impairments under low temperatures [1].

The research aim is to investigate the cryoresistance of organotypic cultures derived from adrenal tissues of the rats of various ages.

Materials and methods

The studies were carried-out in white breedless rats of different ages (1, 3, 6, 12 and 24 months) maintained under the standard vivarium conditions. All the manipulations with animals were performed according to the statements of “European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

Endocrine glands were extirpated with keeping all the strict rules of aseptic and anti-septic in the animals after light narcosis with ether and decapitation. Culturing was made on standard methods [9] for 5 days.

Cell culture was frozen with 5% DMSO protection [6] in cryostable 2 ml vials with cooling rate of 1°C/min down to –80°C and following plunging into liquid nitrogen, thawed on water bath at 42°C.

Cell viability in culture was examined with colorimetric method modified by de Miguel [3]. The amount of viable cells was studied by staining with trypan blue supravital dye after enzyme cleavage of the organotypic culture fragments of adrenal glands. Total amount of tissue cells used for culturing was assumed as 100%. When estimating the post-thaw viability of cells the one of the cells prior to cryopreservation was assumed 100%.

The content of glucocorticoids was found with modified by Reznikov fluorimetric method [2].

Pituitary extracts (PEs) were obtained as described in the paper [6], levelled on the amount of protein measured by Bredford’s method [4], introduced into cell culture and after an hour of incubation the reaction of ACTH containing in PEs was recorded.

The results were statistically processed by the Student-Fisher’s method [5].

Results and discussion

Endocrine cells in case of preserving their structural integrity during their growth out of an organism are known as secreting corresponding hormones using exogenic precursors for hormone synthesis [12]. Based on this at the first stage of our research we have examined culture cell viability at all culturing terms (1-5 culturing days).

After culturing for 24 hrs in all variants of cell culture the viability about 73-78% was observed, that was likely related to the methods of culture obtaining, dissection, resulting in the mechanical damage of a part of cells and their dyeing (Table 1). These results

Результаты и обсуждение

Известно, что эндокринные клетки в случае сохранения своей структурной целостности при росте вне организма могут секретировать соответствующие гормоны, используя экзогенные предшественники для синтеза гормонов [12]. На основании этого на первом этапе нашей работы определяли жизнеспособность клеток культуры на всех сроках культивирования (1-5 сутки).

После 1-х суток культивирования во всех вариантах культуры клеток наблюдали жизнеспособность около 73-78%, что видимо связано с методикой получения культур – иссечением, в результате которого часть клеток получают механические повреждения и погибают (табл. 1). Эти результаты согласуются с данными, полученными для органотипических культур из надпочечников, семенников и щитовидной железы новорожденных поросят [3]. При последующем культивировании отмечалась тенденция к росту числа жизнеспособных клеток. Следует также отметить более низкую жизнеспособность образцов культуры клеток из тканей старых животных по сравнению с клетками из тканей молодых животных. Причем тенденция к росту количества жизнеспособных клеток для образцов, полученных у старых животных, не отмечалась.

Данный факт может быть связан с развитием процессов старения в тканях надпочечников, что подтверждается данными о динамике секреции 11-ОКС в среду культивирования (рисунок) – функциональной характеристике данной органотипической культуры. Профили кривых динамики секреции 11-ОКС для культур из тканей животных разного возраста совпадают. Во всех случаях максимальная секреция наблюдается на 5-е сутки после начала культивирования, что совпадает с данными других исследователей [6, 8], при этом для всех возрастных групп отмечены достоверные различия ($p < 0,05$) по отношению к уровню секреции в 1-е сутки культивирования. Достоверных отличий между уровнями секреции в культурах из тканей молодых животных (1, 3 и 6 месяцев) не наблюдалось, а уровень секреции для культур из тканей старых животных (12 и 24 месяца) достоверно ($p < 0,05$) снижался.

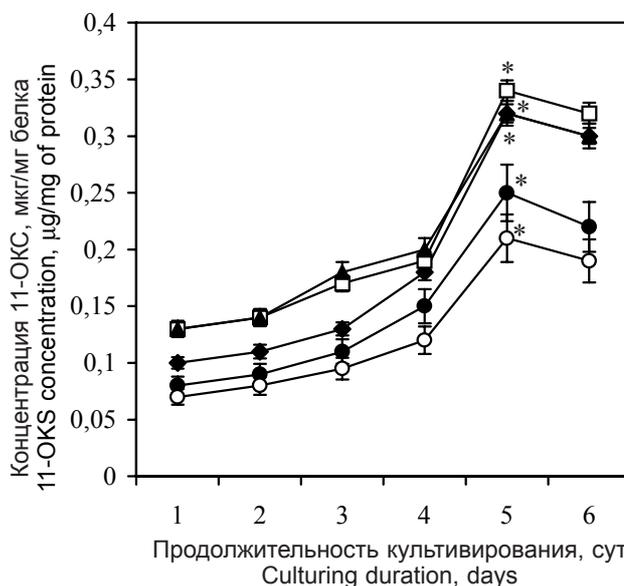
Синтез и секреция глюкокортикоидов в организме контролируются АКГГ, т. е. реакция культуры на его введение в среду также является показателем функциональной активности клеток. В этих экспериментах были использованы культуры с максимальной активностью секреции 11-ОКС (5-суточные). После 1 часа инкубации с ЭГ наблю-

Таблица 1. Жизнеспособность клеток органотипических культур, полученных из надпочечников крыс разного возраста в различные сроки культивирования в % от исходно взятого материала

Table 1. Viability of cells of organotypic cultures derived from rat's adrenal glands within various culturing terms, in percentage from initially obtained material

Возраст животных, мес Animals' age, month	Сроки культивирования, сут Culturing terms, days				
	1	2	3	4	5
1	78,21±4,49	80,32±5,35	82,28±5,15	82,88±5,61	84,48±5,69
3	79,08±4,61	80,88±5,01	81,80±5,21	81,78±5,74	85,82±6,51
6	79,28±5,01	81,76±5,63	82,48±5,64	83,76±5,69	84,33±6,24
12	73,08±4,66	74,32±5,02	74,55±5,01	73,38±4,91	75,80±4,67
24	71,12±3,92	72,14±5,36	73,31±4,98	74,23±5,11	74,24±5,21

conform to the data obtained for organotypic cultures derived from adrenal glands, testes and thyroid gland of new-born piglets [3]. During following culturing the tendency to the growth in the number of viable cells was traced. Lower viability of the samples of cell cultures from the tissues of aged animals should be also noted if compared with the cells from the tissue of young animals. Herewith no tendency to the growth



Динамика секреции 11-ОКС в среду культивирования органотипическими культурами надпочечников крыс разного возраста, мес (n=8): ◆ – 1; ■ – 3; ▲ – 6; ● – 12; ○ – 24. * – статистически достоверные отличия по сравнению с данными для 1 суток культивирования, $p < 0,05$

Dynamics of 11-OCS secretion into culturing medium by organotypic cultures of adrenal glands of rats with various ages, months (n=8): ◆ – 1; ■ – 3; ▲ – 6; ● – 12; ○ – 24: * – statistically significant changes as compared with data for the 1st day of culturing, $p < 0,05$

Таблица 2. Уровень базальной и стимулируемой секреции гормонов культурами, полученными из надпочечников животных разного возраста (n=8)

Table 2. Level of basal and stimulated secretion of hormones by the cultures obtained from adrenal glands of rats of various ages (n =8)

Возраст животных, мес Animals' age, months	Уровень базальной секреции 11-ОКС, мкг/мг белка Level of basal secretion of 11-OXS, µg/mg of protein	Уровень стимулируемой ЭГ секреции 11-ОКС, мкг/мг белка Level of PE stimulated secretion of 11-OXS, µg/mg of protein
1	0,320±0,015	0,384±0,019*
3	0,341±0,016	0,409±0,023*
6	0,337±0,014	0,387±0,020*
12	0,250±0,013	0,277±0,015*
24	0,240±0,011	0,265±0,013

Примечание: * – достоверные различия при сравнении с уровнем базальной секреции, $p < 0,05$.

Notes: * – significant differences as compared with basal secretion level, $p < 0,05$

дали увеличение уровня секреции гормонов во всех исследуемых образцах (табл. 2). Как видно, это увеличение было различным для образцов из тканей животных различного возраста: прирост стимулированной АКТГ секреции уменьшался от 20% для культур тканей 1-месячных животных до 11% для тканей старых (24 мес) животных. Это может означать, что с возрастом в тканях надпочечников может изменяться уровень секреции гормонов за счет уменьшения синтеза гормонов либо изменения рецепторных взаимодействий.

Главной функцией надпочечников является реализация адаптационных механизмов, когда клетки попадают в новые, не физиологические условия. Возникает вопрос, каким образом будут реагировать физиологически неравноценные клетки тканей молодых и старых животных при действии факторов криоконсервирования, когда на клетки действуют температура, гипертонические растворы электролитов и неэлектролитов и другие факторы.

Полученные данные (табл. 3) говорят о зависимости криочувствительности тканей надпочечников от возраста животного: в культуре тканей молодых животных количество сохранившихся клеток после криоконсервирования составляло 68-69, у 12-месячных – около 56, а 24-месячных – почти 52%. Достоверное снижение жизнеспособности клеток тканей старых животных по сравнению с клетками молодых животных ($p < 0,05$), возможно, свидетельствует об ухудшении адаптационных возможностей тканей старых животных вслед-

in the amount of viable cells for the samples obtained from aged animals was found.

This fact may be connected to the development of ageing processes in adrenal tissues, that is confirmed with the data on the dynamics of 11-OXS secretion in culturing medium (Figure), functional characteristic of this organotypic cultures. Profiles of the curves of 11-OXS secretion dynamics for the cultures from the tissues of animals of different ages coincide. In all the cases maximal secretion is observed to the 5th day after culturing start that also coincides with the data of other researchers [6, 8] herewith for all age groups there are found statistical differences ($p < 0.05$) in respect to the secretion level during the first 24 hrs of culturing. No statistically significant differences between the secretion levels in the cultures from the tissues of young animals (1, 3 and 6 months) were observed and the secretion level for the cultures from the tissues of aged animals (12 and 24 months) statistically and significantly reduced ($p < 0.05$).

Synthesis and secretion of glucocorticoids in an organism are controlled with ACTH, i.e. the culture response to its introduction into a medium is also an index of functional activity of cell functional activity. In these experiments there were used the cultures with maximal activity of 11-OXS secretion (5days²). In an hour after incubation with PEs an increase in the level hormone secretion in all the studied samples was observed (Table 2). As it is seen, this rise was different for the samples from tissues of animals of various ages: an increment of stimulated ACTH secretion decreased from 20% for the cultures of tissues of 1month's animals down to 11% for the tissues of aged animals (24 months). This may mean that with age in adrenal tissues the hormone secretion level may change due to either lessening of hormone synthesis or variations in receptor interactions.

The main function of adrenal glands is realization of adaptation mechanisms when the cells occur in new non-physiological conditions. In what way physiologically unequal cells of young and aged animals under the influence of cryopreservation factors will respond, when temperature, hypertonic solutions of electrolytes and non-electrolytes as well as other factors affect?

The obtained data (Table 3) reflect the dependences of cryosensitivity of adrenal tissues on an animal age: in the culture tissue of young animals the number of preserved cells after cryopreservation made 68-69, about 56 in 12 months and almost 52% in 24-months' ones. Statistical decrease of cell viability of the tissues of aged animals in comparison with the cells of young ones ($p < 0.05$) demonstrates likely the aggravation of adaptation possibilities of the tissues of aged animals because of age alterations occurring in adrenal tissues. Due to this the tissues of aged animals occurred to be more sensitive to the effect of environmental damaging

ствие возрастных изменений, происходящих в тканях надпочечников. Вследствие этого ткани старых животных оказываются более чувствительными к действию повреждающих факторов среды, реализующихся в процессе низкотемпературного консервирования.

Использованный метод криоконсервирования был разработан для органотипической культуры из надпочечников новорожденных поросят и обеспечивал сохранность 85% клеток указанной культуры [6, 8]. При его использовании для криоконсервирования органотипической культуры из надпочечников крыс он менее эффективен. Вероятно, это обусловлено видовыми различиями тканей новорожденных поросят и крыс, а также возрастными особенностями: ткани надпочечников новорожденных поросят по своим свойствам приближаются к эмбриональным тканям, а ткани крыс, использованных в эксперименте, являются тканями зрелыми.

Выводы

Установлено, что секретирующая способность клеток органотипических культур надпочечников крыс и их ответ на стимуляторы стероидогенеза изменяются с возрастом животных. Культуры, полученные из тканей старых животных (12-24 месяца), характеризуются большей чувствительностью к действию низких температур по сравнению с тканями молодых животных (1-6 месяцев): сохранность клеток культуры из тканей старых животных после замораживания-отогрева под защитой 5% ДМСО достоверно меньше сохранности клеток молодых животных.

Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1985.— 257 с.
2. Бондаренко Т.П., Геращенко А.В., Божок Г.А., Алабедалькарич Н.М. Оптимизация условий экстрагирования и развития флуоресценции при определении глюкокортикоидов в биологических жидкостях // Лаб. диагностика.— 2001.— №3.— С. 36-39.
3. Бондаренко Т.П., Волкова Н.А., Самченко И.И. и др. Колориметрическое определение жизнеспособности органной культуры клеток, надпочечников и щитовидной железы // Лаб. диагностика. — 2001.— №4.— С. 43-48.
4. Дарбе А. Практическая химия белка.—М.: Мир, 1989.— 623 с.
5. Зайцев Т.Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии.— М.: Наука, 1984.— 424 с.
6. Легащ Е.И. Влияние криоконсервирования на аденокортикальную ткань: Дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1998.— 128 с.
7. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека.— М.: Мир, 1993.— Т.2.— 413 с.
8. Самченко И.И. Влияние криоконсервирования и условий обработки на функциональное состояние ксенографтов и

Таблица 3. Количество жизнеспособных клеток в процентах от контроля после замораживания-отогрева (n=8)

Table 3. Number of viable cells in percentage after freeze-thawing (n = 8)

Возраст животных, мес Animals' age, months	Жизнеспособность клеток, % от контроля Cell viability, percentage of control
1	68,21±3,05
3	67,53±3,21
6	69,04±3,48
12	56,42±0,52*
24	52,41±2,94*

Примечание: * – статистически достоверные различия по сравнению с данными для 3-6-месячных животных, p<0,05.

Notes: * – significant differences as compared with the data for 3-6 months' animals, p<0.05.

factors realising in the process during low temperature preservation.

Used cryopreservation method was developed for organotypic culture of adrenal glands of new-born piglets and provided the survival of 85% of cells of the mentioned culture [6, 8]. During its application for cryopreservation of organotypic culture of rat's adrenal glands it is less effective. It is probably stipulated by the differences of species for the tissues of new-born piglets and rats, as well as by age peculiarities: the tissues of new-born piglets' adrenal glands on their properties approach to embryonic tissues and the rat's ones used in experiment are mature tissues.

Conclusions

Secreting ability of organotypic culture cells of rat's adrenal cultures and their response to stimulators of steroidogenesis has been established to change with age of animals. The cultures derived from the tissues of aged animals (12-24 months) are characterised with higher sensitivity to low temperature effect if compared with those of young animals (1-6 months): the integrity of culture cells derived from the tissues of aged animals after freeze-thawing under 5% DMSO protection is statistically lower than the integrity of the cells of young animals.

References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A. Structural changes of biological membranes during cooling.— Kiev: Naukova dumka, 1985.— 257 p.
2. Bondarenko T.P., Geraschenko A.V., Bozhok G.A., Alabedalkarim N.M. Optimization of conditions of extraction and

органной культуры *in vitro*: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 2002.– 138 с.

9. Тронько Н.Д., Рыбаков С.И., Комиссаренко И.В. и др. Лечение хронического гипокортицизма методом трансплантации культур клеток коры надпочечных желез: Метод. рекомендации.– Киев, 1990.– 24 с.
10. Mitani F., Suzuki H., Hata J.H. et al. A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role // *Endocrinology*.– 1994.– Vol. 136, N1.– P. 125-143.
11. Rainey W.E., Rodgers R.J., Mason J.I. The role of bovine lipoproteins in the regulation of steroidogenesis and HMG-CoA reductase in bovine adrenocortical cells // *Steroids*.– 1992.– Vol. 57, N4.– P.167-173.
12. Ueno M., Nakashima J., Akita M. et al. Characterization of a newly established cell line derived from human adrenocortical carcinoma // *Int. J. Urol.*– 2001.– Vol. 8, N1.– P. 17-22.
3. Bondarenko T.P., Volkova N.A., Samchenko I.I. et al. Colorimetric examining of viability of adrenal organ cultures of thyroid gland // *Lab. Diagnostika*.– 2001.– N4.– P. 44-47.
4. Darbre A. Practical protein chemistry.– Moscow: Mir, 1989.– 623 p.
5. Zaytsev E.I. Mathematical statistics in experimental biology.– Moscow: Nauka, 1984.– 424 p.
6. Legach E.I. Effect of cryopreservation on adrenocortical tissue: Thesis of Cand. of Med. Sci.: 03.00.19. – Kharkov, 1998.– 128 p.
7. Marry R., Grenner D., Meies P., Roduell V. Human biochemistry.– Moscow: Mir, 1993.– Vol. 2.– 413p.
8. Samchenko I.I. Effect of cryopreservation and treatment conditions on functional state of xenografts and organ cultures in vitro: Thesis of Cand. of Biol. Sciences: 03.00.19. – Kharkov.– 138p.
9. Tronko N.D., Rybakov S.I., Komissarenko I.V. et al. Treatment of chronic hypocorticism by transplantation of cultures of adrenal cortex cells: methodical recommendations.– Kiev, 1990.– 24 p.
10. Mitani F., Suzuki H., Hata J.H. et al. A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role // *Endocrinology*.– 1994.– Vol. 136, N1.– P. 125-143.
11. Rainey W.E., Rodgers R.J., Mason J.I. The role of bovine lipoproteins in the regulation of steroidogenesis and HMG-CoA reductase in bovine adrenocortical cells // *Steroids*.– 1992.– Vol. 57, N4.– P.167-173.
12. Ueno M., Nakashima J., Akita M. et al. Characterization of a newly established cell line derived from human adrenocortical carcinoma // *Int. J. Urol.*– 2001.– Vol. 8, N1.– P. 17-22.

Поступила 27.11.2006

Accepted in 27.11.2006.