

Цитофлуориметрическая оценка эффективности криоконсервирования цельной суспензии и различных субпопуляций адреноцитов новорожденных поросят

Г.В. ДУДЕЦКАЯ, В.Д. УСТИЧЕНКО, Н.М. АЛАБЕДАЛКАРИМ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Flow Cytometry Estimation of Cryopreservation Efficiency of Whole Suspension and Different Subpopulations of Newborn Piglet Adrenocytes

G.V. DUDETSKAYA, V.D. USTICHENKO, N.M. ALABEDALKARIM
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В настоящее время разработаны успешные режимы криоконсервирования органотипических культур надпочечных желез. Однако попытки криоконсервирования суспензии адренокортикальных клеток мышей и новорожденных поросят, особенно с высокими скоростями замораживания-отогрева, были неудачными. При переносе клеток из криозащитной в изотоническую среду культивирования резко снижалась не только жизнеспособность, но и клеточность суспензии адреноцитов, криоконсервированной со скоростью замораживания более 100°C/мин. По результатам криотолерантности адреноцитов, криоконсервированных в виде фрагментов, сделано предположение: ограничение объемных изменений клеток на этапах добавления-удаления криопротектора и при замораживании-отогреве повышает сохранность криоконсервированных клеток надпочечников.

Цель работы – оценка целостности цитоплазматической мембраны и митохондриального потенциала прикрепленных адреноцитов с использованием флуоресцентных красителей (пропидиум йодид (PI), FDA и JC1) после замораживания-отогрева.

Адреноциты новорожденных поросят получали ферментативным способом, различные популяции клеток – разделением в градиенте фикола. Для выполнения работы адреноциты прекультивировали 18 ч на подложке – фрагменте тонкого кишечника новорожденных поросят (SIS). Замораживание-отогрев осуществляли по методу Гуриной, разработанному для органотипических культур надпочечников новорожденных поросят. Для цитофлуориметрического анализа клетки снимали с подложки трипсинизацией и окрашивали PI, FDA и JC1.

Процент некротических клеток, определенный по включению PI, достоверно не отличался для нативных и криоконсервированных адреноцитов. Установлено, что при окрашивании FDA не сохраняется целостность цитоплазматической мембраны нативных и криоконсервированных клеток. Однако анализ соотношения оранжевой и зеленой флуоресценции при окрашивании JC1 выявил различную криочувствительность дифференцированных субпопуляций адреноцитов. Достоверных изменений в митохондриальной активности после криоконсервирования для неразделенной суспензии адреноцитов и основной популяции клеток, выделенной в градиенте фикола с плотностью 1,0274 г/см³, не установлено. Значительная криочувствительность характерна для клеток, локализованных в градиентах фикола с плотностью 1,044-1,058 г/см³. Мы полагаем, что данный эффект может быть связан с преактивацией этих субпопуляций адреноцитов в процессе отдельного культивирования, предшествующего криоконсервированию.

Nowadays there have been designed the successful cryopreservation regimens for adrenal organotypic cultures. However the attempts to cryopreserve mice and newborn piglet adrenocortical cell suspensions, especially with high freeze-thawing rates, were unsuccessful. When transferring cells out of cryoprotective medium into that of isotonic culture there was a sharp decrease not only in viability but in cellularity of adrenocyte suspension, cryopreserved with freezing rate higher than 100°C/min as well. Based on the feedback from tolerance in adrenocytes, cryopreserved as fragments there was assumed that a limitation of volume changes in cells at the stages of cryoprotectant adding-removal and under freeze-thawing augmented the cryopreserved adrenal cell integrity.

The research was aimed to estimate the integrity of cytoplasmic membrane and mitochondrial potential of attached adrenocytes using fluorescent dyes (propidium iodide (PI), FDA and JC1) after freeze-thawing.

Newborn piglet adrenocytes were procured using an enzyme way, different cell populations were separated in ficoll gradient. For the research performance the adrenocytes were precultured for 18 hrs on an embedding: small intestine segment (SIS) of newborn piglets. Freeze-thawing was done using the method of Gurina, designed for organotypic cultures of newborn piglet adrenal glands. For the flow cytometry analysis the cells were removed from embedding by trypsinisation and PI, FDA and JC1 staining.

Percentage of necrotic cells, determined by PI inclusion did not statistically and significantly differ for native and cryopreserved adrenocytes. During FDV.N.A staining the integrity of cytoplasmic membrane of native and cryopreserved cells was established as not preserved. However when analysing the ratio of orange and green fluorescence during JC1 staining a different cryosensitivity of differentiated subpopulations of adrenocytes has been revealed. No statistically significant changes in mitochondrial activity after cryopreservation for non-separated adrenocyte suspension and main cell population, isolated in ficoll gradient with 1.0274 g/cm³ were established. Significant cryosensitivity is typical for cells, localised in ficoll gradient with 1.044-1.058 g/cm³. We believe that this effect may be related with preactivation of these subpopulations of adrenocytes during separated culturing, preceded cryopreservation.