

Криоконсервирование первичной культуры тироцитов новорожденных поросят

UDC 611.441.085.23:615.014.41

S.B. BILYAVSKAYA*, V.D. USTICHENKO, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH

Cryopreservation of Thyroid Primary Culture of Newborn Piglets

Исследовано влияние криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 градус/мин с применением криозащитных сред на основе раствора диметилсульфоксида (ДМСО) на показатели сохранности и жизнеспособности первичной культуры тироцитов новорожденных поросят, представленной клеточной и фолликулярной фракциями. Определены оптимальные концентрации ДМСО для криоконсервирования клеток и фолликулов щитовидной железы.

Ключевые слова: тироцит, щитовидная железа, первичная культура, клеточная и фолликулярная фракции, криоконсервирование, субкультивирование.

Досліджено вплив криоконсервування зі швидкістю охолодження 1 градус/хв з використанням криозахисних середовищ на основі розчину диметилсульфоксиду (ДМСО) на показники збереженості та життєздатності первинної культури тироцитів новонароджених поросят, представлена клітинною та фолікулярною фракціями. Визначено оптимальні концентрації ДМСО для криоконсервування клітин і фолікулів щитовидної залози.

Ключові слова: тироцит, щитовидна залоза, первинна культура, клітинна і фолікулярна фракції, криоконсервування, субкультивування.

Effect of cryopreservation with the cooling rate of 1 degree/min and cryoprotective media based on dimethylsulfoxide (DMSO) solution on survival and viability indices of newborn piglets thyrocyte primary culture, represented by cell and follicular fractions was studied. The optimal concentrations of DMSO for cryopreservation of thyroid gland cells and follicles were established.

Key words: thyrocyte, thyroid gland, primary culture, cell and follicular fractions, cryopreservation, subculturing.

Вопросы культивирования и криоконсервирования клеток щитовидной железы имеют большое значение в экспериментальной и клинической трансплантологии в связи с возможностью применения органотипических и клеточных культур для коррекции тиреоидной недостаточности [1, 7]. К преимуществам трансплантации культивированных клеток можно отнести минимизацию инвазивности процедуры, небольшой объем необходимого материала, поскольку дефекты биохимической функции органа можно компенсировать 1–10% клеток органа [6], а также снижение иммуногенности путем элиминации “лейкоцитов-пассажира”, которые являются костимуляторами иммунного ответа [11]. Существует мнение, что криоконсервирование также снижает иммуногенность за счет уменьшения пула антигенпрезентирующих клеток [16, 17], а клеточные культуры по сравнению с нативной суспензией клеток обладают более высокой устойчивостью к процессу криоконсервирования [15]. В этом аспекте актуальным является вопрос разработки режимов криоконсервирования биологического материала, направленных на максимальное сохранение жизнеспособных клеток.

The tasks of culturing and cryopreservation of thyroid gland cells are of great value in experimental and clinical transplantology due to possible application of organotypic and cell cultures in correction of thyroid deficiency [1, 7]. The advantages of cultured cells transplantation are, in particular, the minimization of procedure invasiveness, small amount of required material, since the defects in the organ biochemical function could be compensated by 1–10% cells of the organ [6], as well as reduction of immunogenicity by elimination of "passenger leukocytes", being co-stimulators of immune response [11]. There is an opinion that cryopreservation also reduces immunogenicity due to decrease of a pool of antigen-presenting cells [16, 17], and the cell cultures unlike the native cell suspension have higher resistance to cryopreservation [15]. In this aspect a task about development of cryopreservation regimens for biological material directed to maximum preservation of viable cells is an actual one.

It has been known that endocrine tissues are highly sensitive to various ischemic factors, osmotic changes, and effect of low temperatures. There are various reports presenting the cryopreservation methods for cells and tissues of some endocrine organs utilizing

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* 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:
s_bilyavskaya@mail.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373
3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: s_bilyavskaya@mail.ru

Известно, что эндокринные ткани высоко чувствительны к различного рода ишемическим факторам, осмотическим изменениям, действию низких температур. В литературе широко представлены способы криоконсервирования клеток и ткани некоторых эндокринных органов с использованием низких скоростей охлаждения, в частности 1 градус/мин, и растворов криопротектора ДМСО, который в определенной концентрации обладает выраженным противоишемическим действием [14]. Описаны положительные результаты при замораживании островков поджелудочной железы в присутствии 20%-го раствора ДМСО [12, 13], суспензии клеток надпочечников новорожденных поросят – 7%-го [8], суспензии клеток Сертоли фетальных семенников крыс – 10%-го [10], органотипической культуры щитовидной железы новорожденных поросят – 7%-го [4].

Накопленный в литературе экспериментальный материал по криоконсервированию тиреоидной ткани [1, 3–5, 9] не включает данные о возможности замораживания клеточных и фолликулярных первичных культур щитовидной железы.

Цель работы – изучение сохранности, жизнеспособности клеточной и фолликулярной фракций первичной культуры тироцитов новорожденных поросят после криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 градус/мин в присутствии различных концентраций ДМСО и последующего субкультивирования.

Материалы и методы

Эксперименты на животных проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Тироциты и фолликулы изолировали из щитовидных желез новорожденных поросят путем 3-этапной ферментативной дезагрегации с использованием 1 мкг/мл коллагеназы типа I A и 0,15 мкг/мл дезоксирибонуклеазы (“Sigma”, США) при 37°C с последующим охлаждением и 3-кратной отмывкой раствором, содержащим 0,2% бычьего сывороточного альбумина. Фолликулярную и клеточную фракции разделяли путем фильтрации через мембрану с диаметром пор 30 мкм (“Consalt T.S.”, Италия). После фильтрации фолликулярная фракция была представлена в основном фолликулами среднего диаметра (> 30 мкм), а клеточная фракция – тироцитами, эритроцитами и мелкими фолликулами (< 30 мкм).

Полученные фракции с концентрацией клеток 1×10^6 и фолликулов 1×10^5 культивировали в

low cooling rates, particularly 1 degree/min and DMSO cryoprotectant solution, which in certain concentration expressed an anti-ischemic effect [14]. There are the successful attempts to cryopreserve the pancreatic islet cells using 20% DMSO solution [12, 13], newborn piglet adrenal gland cell suspensions with 7% DMSO [8], Sertoli cell suspensions of rat fetal testes with 10% DMSO [10] and organotypic culture of newborn piglet thyroid gland with 7% DMSO [4].

The existing experimental data on cryopreservation of thyroid tissue [1, 3–5, 9] do not include the information about possibility of the freezing of primary cellular and follicular cultures of thyroid gland.

The research aim is to study the survival and viability of cell and follicular fractions of newborn piglet thyrocyte primary culture after cryopreservation with the cooling rate of 1 degree/min in presence of various DMSO concentrations and further subculturing.

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).

Thyrocytes and follicles were isolated from thyroid glands of newborn piglets by 3-stage enzyme disaggregation using 1 $\mu\text{g/ml}$ collagenase of type I A and 0.15 $\mu\text{g/ml}$ deoxyribonuclease (Sigma, USA) at 37°C with further cooling and 3-fold washing with the solution, containing 0.2% of bovine serum albumin. Follicular and cellular fractions were separated by filtration through the membrane with of 30 mm pores (Consalt T.S., Italy). After filtration the follicular fraction was mainly represented by middle size follicles (> 30 mm) and cellular fraction included thyrocytes, erythrocytes and small follicles (< 30 mm).

The obtained fractions with concentration of cells 1×10^6 and follicles 1×10^5 were cultured in cultural flasks (Sarstedt, USA) with the medium 199, enriched by 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, USA) supplemented with antibiotics as penicillin (100 units/ml), kanamycine (200 $\mu\text{g/ml}$) and amphotericin B (1 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C in the atmosphere of 5% CO₂ for 6 days. The culture was disaggregated by incubation in 0.25% trypsin mixed with Versene solution in the 1:1 ratio at 37°C for 3 min with further adding of nutrition medium 199 with 5% FBS, and removed from the substrate by pipeting till the moment of monolayer detaching and then centrifuged at 1,000 rpm.

The samples were cryopreserved in the programmable freezer (Cryoson 115, Germany) using the cooling rate of 1 degree/min [2] in presence of 10 and 15% DMSO both with and without adding 25% FCS. Thawing was carried-out on water bath at 37°C till

культуральных флаконах (“Sarstedt”, США) на среде 199, обогащенной 10%-й фетальной телячьей сывороткой (ФТС) (“Sigma”, США) с добавлением антибиотиков – пенициллина (100 ЕД/мл), канамицина (200 мкг/мл) и амфотерицина Б (1 мкг/мл) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 6 суток. Культуру дезагрегировали путем инкубации в 0,25%-м растворе трипсина, смешанном с раствором Версена в соотношении 1:1, при 37°C в течение 3 мин с последующим добавлением питательной среды 199 с 5% ФТС, снимали с подложки пипетированием до открепления монослоя и центрифугировали при 1000 об/мин.

Образцы криоконсервировали с использованием скорости охлаждения 1 градус/мин [2] в присутствии 10 и 15%-го ДМСО с добавлением и без добавления 25% ФТС на программном замораживателе (“Cryocon 115”, Германия). Отогрев проводили на водяной бане при 37°C до исчезновения твердой фазы. После ступенчатого удаления криопротектора клеточную и фолликулярную фракции субкультивировали 6 суток в 24-луночной планшете (“Sarstedt”, США) при концентрации 1×10⁴ клеток и фолликулов в 1 мл при описанных выше условиях. Сохранность клеток после криоконсервирования определяли как общее количество клеток после отогрева по отношению к общему количеству клеток до замораживания, выраженное в процентах. Количество жизнеспособных клеток после замораживания-отогрева устанавливали методом суправитального окрашивания с трипановым синим путем подсчета в гемоцитометре и находили по формуле:

$$ЖК = \frac{\sum_{\text{неокр}}}{\sum_{\text{общ}}} \times 100,$$

где $\sum_{\text{неокр}}$ – количество живых (неокрашенных) клеток, $\sum_{\text{общ}}$ – общее количество клеток в поле зрения. На 6-е сутки культуру фиксировали в 4%-м параформальдегиде и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Микроскопию проводили на инвертированном светооптическом микроскопе (“Meiji Techno”, Япония) с цифровой камерой и пакетом прикладных программ для обработки изображения Bio Vision 4.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента для выборки с нормальным распределением значений и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для непараметрических данных.

Результаты и обсуждение

Криоконсервирование первичной культуры тироцитов с использованием различных концентраций ДМСО показало, что культура, полученная из

disappearance of a solid phase. After step-wise removal of cryoprotectant the cellular and follicular fractions were subcultured during 6 days in 24-well plate (Sarstedt, USA) with seeding concentration of 1×10⁴ in 1 ml both of cells and follicles according the above described conditions. Post-thaw cell survival was determined as a total number of cells after thawing in respect of total number of cells prior to freezing and expressed in percents. A post-thaw number of viable cells was established using the method of supravital staining with trypan blue by calculation in hemocytometer and determined by the formula:

$$VC = \frac{\sum_{\text{nonstained}}}{\sum_{\text{total}}} \times 100,$$

where $\sum_{\text{nonstained}}$ is the number of living (nonstained) cells; \sum_{total} is total number of cells per vision field.

By the 6th day the culture was fixed in 4% paraformaldehyde and stained with haematoxylin and eosin according to the standard method. Microscopy was carried-out with inverted light-optical microscope (Meiji Techno, Japan) equipped with digital camera and the software Bio Vision 4 was used for image processing.

Statistical processing of results was performed with Student's t-criterion for samples with normal distribution of values and single-factor dispersion analysis (ANOVA) for non-parametric data.

Results and discussion

Cryopreservation of thyrocyte primary culture using different DMSO concentrations showed that the culture, obtained from follicular fraction (Fig. 1) was more resistant to freeze-thawing unlike the culture, passaged from cellular fraction (Fig. 2). This effect may be explained by preserved intercellular contacts of thyrocyte basal membranes, that is associated with morphological peculiarities of thyroid parenchyma. Whereas structure-functional unit of thyroid gland is a follicle, containing colloid, which is a product of thyroid epithelium cell secretion, it likely affects the follicle cell survival due to restriction of volumetric changes.

The highest survival (95–97%) was characteristic for the samples of follicular fraction, cryopreserved with 15% DMSO both with serum and without it (see Fig. 1). The viability made 65–80%. These high values could be the result of using high concentrations of cryoprotectant in the case of cell clusters, due to its longer penetration into cells with the preserved intercellular bonds. This suggestion agrees with the reported data on cryopreservation of other type of cell clusters, pancreatic islets, where authors used successfully 20% DMSO concentration [12, 13].

Freezing with 10% DMSO resulted in insignificant reduction of survival and viability of follicular fraction. Herewith the cryoprotective effect of serum was found,

фолликулярной фракции (рис. 1), более устойчива к замораживанию-отогреву по сравнению с культурой, полученной при пассаже клеточной фракции (рис. 2). Такой эффект можно объяснить сохранением межклеточных контактов на базальных мембранах тироцитов, что связано с морфологическими особенностями тироидной паренхимы. Поскольку структурно-функциональной единицей щитовидной железы является фолликул, содержащий продукт секрета клеток тироидного эпителия – коллоид, это возможно влияет на целостность клеток фолликула вследствие ограничения объемных изменений.

Наиболее высокая сохранность (95–97%) была характерна для образцов фолликулярной фракции, криоконсервированных с 15%-м ДМСО как в присутствии сыворотки, так и без нее (см. рис. 1). Жизнеспособность составляла 65–80%. Такие показатели можно объяснить использованием высоких концентраций криопротектора именно для клеточных кластеров по причине более длительного его проникновения в клетки с сохраненными межклеточными связями. Данное предположение согласуется с исследованиями, в которых для криоконсервирования другого вида клеточных кластеров – островков поджелудочной железы использовали 20%-й ДМСО [12, 13].

Замораживание в присутствии 10%-го ДМСО приводило к незначительному снижению сохранности и жизнеспособности фолликулярной фракции. При этом проявлялся криопротекторный эффект сыворотки – увеличение показателя сохранности на 10% по отношению к образцам, криоконсервированным без сыворотки.

Культуры из клеточной фракции имели более низкие значения сохранности клеток по сравнению с фолликулярной (рис. 2). При использовании 10%-го раствора ДМСО в присутствии сыворотки отмечены максимальная сохранность (80,45%) и высокий уровень жизнеспособности клеток (89,82%). Добавление сыворотки к образцам с 10 и 15%-м ДМСО приводило к некоторому увеличению показателя сохранности по отношению к соответствующей бессывороточной криозащитной среде.

Суммируя результаты сохранности и жизнеспособности после отогрева криоконсервированных образцов, можно сказать, что наиболее эффективными концентрациями криопротектора для фолликулярной фракции являются 15%-й ДМСО и 10–15%-й ДМСО с 25%-й ФТС – для клеточной.

Микроскопически установлено, что в фолликулярной фракции после замораживания-отогрева образцов, криоконсервированных в присутствии 15%-го ДМСО, на 3-и сутки субкультивирования конfluenceность монослоя достигала 100%, а также были отмечены максимальные показатели сохранности и жизнеспособности.

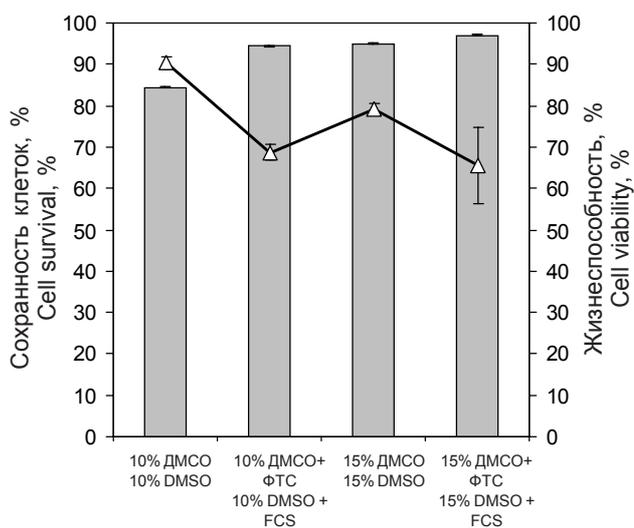


Рис. 1. Влияние криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 градус/мин в присутствии разных концентраций ДМСО на сохранность (■) и жизнеспособность (△) первичной культуры, полученной из фолликулярной фракции щитовидной железы новорожденных поросят ($n = 8$).

Fig. 1. Cryopreservation effect with the cooling rate of 1 degree/min in presence of DMSO different concentrations on survival (■) and viability (△) of primary culture, derived from follicular fraction of newborn piglets' thyroid gland ($n = 8$).

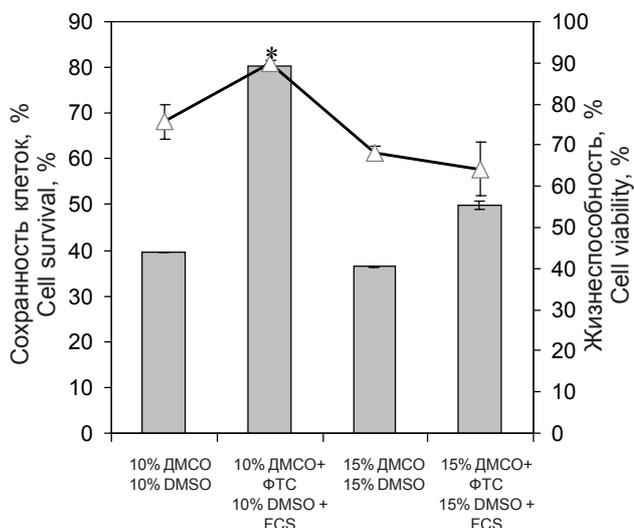


Рис. 2. Влияние криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 градус/мин в присутствии разных концентраций ДМСО на сохранность (■) и жизнеспособность (△) первичной культуры, полученной из клеточной фракции щитовидной железы новорожденных поросят ($n = 8$): * – значения достоверны по отношению к образцам, криоконсервированным с соответствующей концентрацией ДМСО без сыворотки ($p < 0,05$).

Fig. 2. Cryopreservation effect with the cooling rate of 1 degree/min in presence of DMSO different concentrations on survival (■) and viability (△) of primary culture, derived from cellular fraction of newborn piglets' thyroid gland ($n = 8$); integrity; viability: * – values are significant in respect of the samples, cryopreserved with corresponding concentration of DMSO without serum ($p < 0.05$)

При микроскопическом исследовании первичной культуры тироцитов новорожденных поросят, полученной из фолликулярной фракции, наблюдалось спонтанное фолликулообразование при достижении конfluenceности монослоя как при нулевом, так и при первом пассажах (рис. 3, а, б): видны фолликулоподобные структуры, растущие на подложке клеток щитовидной железы. При субкультивировании криоконсервированных образцов органоспецифическая дифференцировка не наблюдалась (рис. 3, с). Для таких образцов характерен равномерный монослой, представленный крупными клетками полигональной формы, как правило, с двумя ядрышками и широкими межклеточными пространствами.

При культивировании клеточной фракции процесс органоспецифической дифференцировки про-

i. e. 10% increase of survival index in respect of the samples cryopreserved without serum.

The cultures from cellular fraction had lower cell survival values if compared with the follicular fraction (Fig. 2). When using 10% DMSO with serum the maximum survival (80.45%) and high level of cell viability (89.82%) were noted. Addition of serum to the samples with 10 and 15% DMSO resulted in some increasing of survival in respect of appropriate serum-free cryoprotective medium.

Summarizing the results on post-thaw survival and viability in the samples, it is possible to conclude that the most effective concentrations of cryoprotectant in the case of follicular fraction is 15% DMSO and for cellular one is 10–15% DMSO with 25% FCS.

Microscopical investigations showed that samples of follicular fraction after freeze-thawing with 15% DMSO gave by the 3rd day of subculturing the 100% confluent monolayer, as well as the maximal indices of survival and viability.

Microscopic investigation of newborn piglet thyrocyte primary culture obtained from the follicular fraction revealed spontaneous follicle-formation after achieving the monolayer confluency both after zero and first passages (Fig. 3, а, б): the follicle-like structures, growing on substrate of thyroid gland cells were observed. During subculturing of frozen-thawed samples no organospecific differentiation was observed (Fig. 3, с). These samples are characterized by homogenic monolayer, represented by large polygonal-shaped cells, usually with two nucleoli and wide intercellular spaces.

During culturing of cellular fraction the organospecific differentiation was

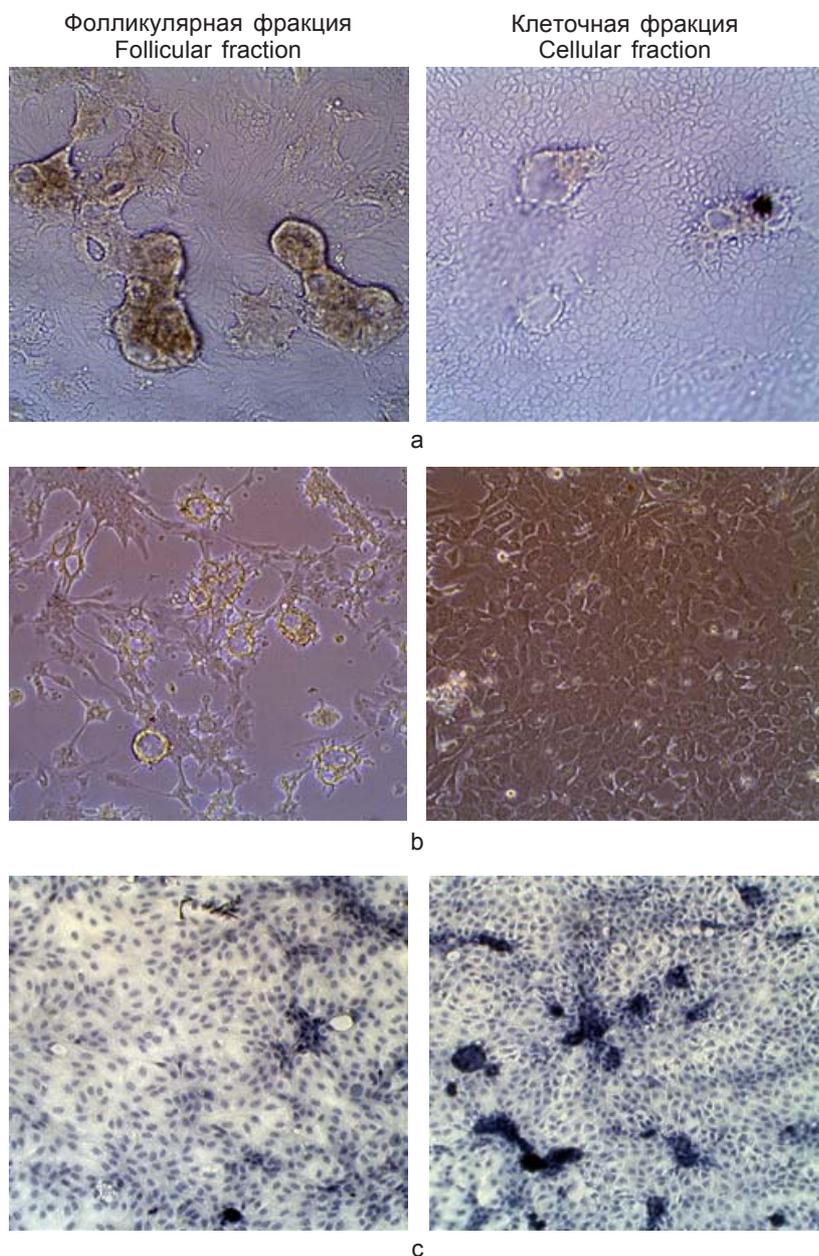


Рис. 3. Первичная культура тироцитов новорожденных поросят (6-е сутки): а – нативный контроль (0 пассаж); б – нативный контроль (1 пассаж); с – субкультивирование после замораживания-отогрева образцов, криоконсервированных с использованием 15%-го ДМСО и 25%-й ФТС. Окраска гематоксилином и эозином (с). Фазовый контраст (а, б). $\times 200$.

Fig. 3. Thyroid primary culture of newborn piglets (6th day): а – native control (0 passage); б – native control (1st passage); с – subculturing after freeze-thawing of samples, cryopreserved with 15% DMSO and 25% FBS. Staining with haematoxylin and eosin (с). Phase contrast (а, б). $\times 200$.

являлся только при нулевом пассаже (рис. 3, а). Для культуры первого пассажа характерен плотный однородный монослой без образования фолликулов (рис. 3, б). В субкультивированных криоконсервированных культурах выявлялись сфероподобные образования с многослойной клеточной структурой и многочисленные тяжи, состоящие из плотно упакованных клеток (рис. 3, в).

Выводы

1. Криоконсервирование первичной культуры тироцитов, полученной из фолликулярной фракции щитовидной железы, со скоростью охлаждения 1 градус/мин с использованием ДМСО в концентрации 15%, как в присутствии сыворотки, так и без нее позволяет достичь максимальных показателей сохранности (95–97%) и жизнеспособности (65–80%) клеток.

2. Оптимальным условием криоконсервирования первичной культуры, полученной из клеточной фракции щитовидной железы со скоростью охлаждения 1 градус/мин, является использование 10%-го ДМСО в присутствии 25% ФТС.

Литература

1. Білявська С.Б. Корекція експериментального гіпотиреозу шляхом комбінованої трансплантації органотипових культур: Автореф. ... дис. канд. біол. наук.– Харків, 2008.– 20 с.
2. Бондаренко Т.П., Волкова Н.А., Луговой С.В. Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов после ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят // Проблемы криобиологии.– 2001.– №3.– С. 41–42.
3. Волкова Н.А., Бондаренко Т.П. Функционирование криоконсервированной органной культуры щитовидной железы при экспериментальной аллотрансплантации // Проблемы мед. науки та освіти.– 2002.– №4.– С. 38–47.
4. Легащ Е.И., Билявская С.Б., Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Гормонопродуцирующий потенциал криоконсервированной органотипической культуры щитовидной железы при комбинированной ксенотрансплантации // Проблемы криобиологии.– 2007.– Т. 17, №1.– С. 86–92.
5. Луговой С.В. Вплив криоконсервування на культуру клітин щитовидної залози новонароджених поросят: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 2003.– 18 с.
6. Поташов Л.В. Перспективы трансплантации клеточных культур для коррекции некоторых эндокринных заболеваний // Новые Санкт-Петербург. врачев. ведомости.– 1999.– №1.– С. 22–24.
7. Третьяк С.И., Хрыщанович В.Я., Горанов В.А., Зоманович А.В. Функциональная оценка жизнедеятельности макроинкапсулированного тиреоидного ксенотрансплантата после пересадки в сосудистое русло // Белорус. мед. журн.– 2005.– Т. 12, №2.– С. 26–31.
8. Устиченко В. Д. Функціональні властивості надниркових залоз новонароджених поросят при дії різних режимів заморожування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 2008.– 20 с.
9. Чуйко В.А., Чупринова С.И. Влияние низкотемпературной консервации на рост клеточной культуры щитовидной железы // Докл. АН УССР (Сер. Б).– 1982.– №10.– С. 77–81.

manifested only after zero passage (Fig. 3, a). The culture of the 1st passage is characterized by the solid homogenous monolayer without follicle formation (Fig. 3, b). Subcultured frozen-thawed cultures had spheroid formations with multilayer cell structure and multiply cords, consisting of tightly packed cells (Fig. 3, c).

Conclusions

1. Cryopreservation of thyrocyte primary culture, obtained from follicular fraction of thyroid gland, using the cooling rate of 1 degree/min with 15% DMSO both with fetal calf serum and without it enables to achieve the maximal indices of cell survival (95–97%) and viability (65–80%).

2. The optimal condition for cryopreservation of primary culture, obtained from cellular fraction of thyroid gland with the cooling rate of 1 degree/min is the using of 10% DMSO solution supplemented with 25% FBS.

References

1. Bilyavs'ka S.B. Correction of experimental hypotheriosis by combined transplantation of organotypic cultures: Author's Abstract of the Cand. of Biol. Sciences.– Kharkiv, 2008.– 20 p.
2. Bondarenko T.P., Volkova N.A., Lugovoy S.V. Thyroid hormone level in rabbits' blood plasma after xenotransplantation of cryopreserved organ culture of neonatal piglets' thyroid gland // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 41–42.
3. Volkova N.A., Bondarenko T.P. Functioning of cryopreserved organ culture of thyroid gland at experimental allotransplantation // Problemy Med. Nauki ta Osvity.– 2002.– N4.– P. 38–47.
4. Legach Ye.I., Bilyavskaya S.B., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Hormone-producing potential of cryopreserved organotypic culture of thyroid gland during combined xenotransplantation // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N1.– P. 86–92.
5. Lugovyy S.V. Cryopreservation effect on thyroid gland cell culture of newborn piglets: Author's Abstract of the Cand. of Biol. Sciences.– Kharkiv, 2003.– 18 p.
6. Potashov L.V. Transplantation perspectives of cell cultures for correction of some endocrine diseases // Novye Sankt-Peterburg. Vracheb. Vedomosti.– 1999.– N1.– P. 22–24.
7. Tret'yak S.I., Khryshchanovich V.Ya., Goranov V.A., Zomanovich A.V. Activity functional assessment of macroencapsulated thyroid xenotransplant after implantation into blood stream // Belarus. Med. Zhurn.– 2005.– Vol. 12, N2.– P. 26–31.
8. Ustichenko V.D. Functional peculiarities of adrenal glands of newborn piglets under effect of different freezing regimens: Author's Abstract of the Cand. of Biol. Sciences.– Kharkiv, 2008.– 20 p.
9. Chuyko V.A., Chuprinova S.I. Effect of low temperature preservation on growth of thyroid gland cell culture // Doklady AN USSR. Ser. B.– 1982.– N10.– P. 77–81.
10. Cameron D.E., Othberg A.J., Borlogan C.V. et al. Post-thaw viability and functionality of cryopreserved rat fetal cells cocultured with Sertoli cells // Cell Transpl.– 1997.– Vol. 6, N2.– P. 185–189.
11. Lafferty K.J., Bootes A., Dart G. et al. Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice // Transplantation.– 1976.– Vol. 22, N2.– P. 138–149.

10. Cameron D.E., Othberg A.J., Borlogan C.V. et al. Post-thaw viability and functionality of cryopreserved rat fetal cells cocultured with Sertoli cells // Cell Transpl.– 1997.– Vol. 6, N2.– P. 185–189.
11. Lafferty K.J., Bootes A., Dart G. et al. Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice // Transplantation.– 1976.– Vol. 22, N2.– P. 138–149.
12. Lakey J.R., Aspinwall C.A., Cavanagh T.J. et al. Secretion from islets and single islets following cryopreservation // Cell Transpl.– 1999.– Vol. 8, N6.– P. 691–698.
13. Lakey J.R., Rajotte R.V., Fedorov C.A. et al. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions// Cell Transpl.– 2001.– Vol. 10, N7.– P. 583–589.
14. McGann L.E., Walterson M.L. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone // Cryobiology.– 1987.– Vol. 24, N1.– P. 11–16.
15. Sandler S., Andersson A. The significance of culture for successful cryopreservation of isolated pancreatic islets of langerhans // Cryobiology.– 1984.– Vol. 21, N5.– P. 503–510.
16. Taylor M.J., Bank H.L. Function of lymphocytes and macrophages after cryopreservation by procedures for pancreatic islets: potential for reducing tissue immunogenicity // Cryobiology.– 1988.– Vol. 25, N1.– P. 1–17.
17. Taylor M.J., Bank H.L., Benton M.J. Selective killing of leucocytes by freezing: potential for reducing the immunogenicity of pancreatic islets // Diabetes Res.– 1987.– Vol. 5, N2.– P. 99–103.
12. Lakey J.R., Aspinwall C.A., Cavanagh T.J. et al. Secretion from islets and single islets following cryopreservation // Cell Transpl.– 1999.– Vol. 8, N6.– P. 691–698.
13. Lakey J.R., Rajotte R.V., Fedorov C.A. et al. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions// Cell Transpl.– 2001.– Vol. 10, N7.– P. 583–589.
14. McGann L.E., Walterson M.L. Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone // Cryobiology.– 1987.– Vol. 24, N1.– P. 11–16.
15. Sandler S., Andersson A. The significance of culture for successful cryopreservation of isolated pancreatic islets of langerhans // Cryobiology.– 1984.– Vol. 21, N5.– P. 503–510.
16. Taylor M.J., Bank H.L. Function of lymphocytes and macrophages after cryopreservation by procedures for pancreatic islets: potential for reducing tissue immunogenicity // Cryobiology.– 1988.– Vol. 25, N1.– P. 1–17.
17. Taylor M.J., Bank H.L., Benton M.J. Selective killing of leucocytes by freezing: potential for reducing the immunogenicity of pancreatic islets // Diabetes Res.– 1987.– Vol. 5, N2.– P. 99–103.

Accepted in 28.09.2010

*Поступила 28.09.2010
Рецензент И.В. Белочкина*