

Гипотермическое культивирование как способ обеспечения сохранности гормонопродуцирующей активности нативных и криоконсервированных надпочечников новорожденных поросят *in vitro*

UDC 57.043.085.23:612.451

V.D. USTICHENKO, N.M. ALALBEDALKARIM, T.P. BONDARENKO*

Hypothermic Culturing as the Method to Provide *in vitro* Preservation of Hormone-Producing Activity of Native and Cryopreserved Adrenal Glands of Newborn Piglets

Одним из способов, позволяющих сохранить морфофункциональные свойства клеток при культивировании, является снижение температуры ниже физиологической (гипотермическое культивирование). Установлено, что культивирование при 24–26°C предотвращает повреждения клеток, возникающие при культивировании в условиях 37°C [4]. Показана высокая функциональная активность эндокринных графтов, подвергнутых предтрансплантационному культивированию при температуре ниже физиологической [1, 5].

Цель работы – исследовать влияние гипотермического культивирования и рекультивирования после замораживания-отогрева на гормонопродуцирующую активность фрагментов и органотипической культуры надпочечников новорожденных поросят.

Материалы и методы

Для получения органотипической культуры фрагменты надпочечных желез (1–3 мм³) новорожденных поросят помещали в среду RPMI, содержащую 100 ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина, 10% сыворотки крупного рогатого скота, и культивировали 5 суток при 37 или 24°C в газовой атмосфере с 5% CO₂ с ежедневной заменой среды культивирования. В разные сроки культивирования отбирали пробы культуральной среды для определения содержания гормонов.

Фрагменты надпочечников замораживали в пластиковых контейнерах “Nunc” (2 мл) со скоростью охлаждения 1°C/мин [2] и 100°C/мин [3] в присутствии 5 и 10% ДМСО соответственно. Отогревали в водяной бане (37°C) до появления жидкой фазы. В ряде случаев криоконсервированный

One of the methods, enabling to preserve cell morphofunctional properties under culturing is temperature decrease lower than physiological one (hypothermic culturing). Culturing at 24–26°C was established as preventing cell damage, occurring under culturing at 37°C [4]. A high functional activity of endocrine grafts, subjected to pre-transplanted culturing at temperature lower than physiological one was shown [1, 5].

The research was aimed to investigate the effect of hypothermic culturing and re-culturing after freezethawing on hormone-producing activity of enzymes and organotypic culture of newborn piglet adrenal glands.

Materials and methods

To obtain an organotypic culture the newborn piglet's adrenal gland fragments (1–3 mm³) were placed in RPMI medium, containing 100 U/ml penicillin, 200 µg/lm streptomycin, 10% bovine serum and cultured for 5 days either at 37 or 24°C in atmosphere with 5% CO₂ with daily change of cultural medium. Samples of cultural medium were taken in different culturing terms for hormone content determination.

Adrenal fragments were frozen in “Nunc” plastic containers (2 ml) with 1 [2] and 100°C/min [3] cooling rates at 5 and 10% DMSO presence, cor-respondingly. Thawing was done on water bath (37°C) up to a liquid phase appearance. In some cases a cryopreserved material was cultured after thawing (re-culturing) under standard conditions at 24 and 37°C for 2 days with a single change of nutritive medium.

Cortisone content in the incubation medium of newborn piglet adrenal fragments was radioimmunologically measured with STERON-K-¹²⁵I-M test kit (Byelorussia) and normalised for protein test, determined by the Bradford method.

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: cryo@online.kharkov.ua

* 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

материал культивировали после отогрева (рекультивировали) в стандартных условиях при 24 и 37°C в течение 2-х суток с однократной заменой питательной среды.

Содержание кортизола в среде инкубации фрагментов надпочечников новорожденных поросят измеряли радиоиммунологическим методом при помощи тест-набора СТЕРОН-К-¹²⁵I-М (Беларусь) и нормировали на белок пробы, который определяли по методу Бредфорд.

Результаты и обсуждение

Установлено, что с увеличением продолжительности культивирования при 37°C снижается базальная секреция кортизола гормонопродуцирующими клетками органотипической культуры. В первые сутки культивирования адренокортикальные клетки обладали высокой стероидогенной активностью (184,55±50,26 нмоль/г белка). Однако в последующие 24 ч культивирования уровень секреции снизился до 31,86±7,02 нмоль/г белка и после 72 ч культивирования стабилизировался на уровне 11–16 нмоль/г белка. В случае гипотермического культивирования также наблюдалось снижение гормонопродуцирующей активности адренокортицитов. Однако падение уровня секреции кортизола на 2–5-е сутки при 24°C менее выражено, чем при 37°C. При этом абсолютные значения секреции кортизола для гипотермической культуры во всех точках превышали данные для стандартной органотипической культуры.

На основе полученных экспериментальных данных о позитивном эффекте гипотермического культивирования на стероидогенную активность нативных культур было исследовано влияние температуры рекультивирования на уровень гормонопродуцирующей активности криоконсервированных фрагментов надпочечников.

Установлено, что при гипотермическом рекультивировании сохраняется высокий уровень секреции кортизола клетками фрагментов, криоконсервированных со скоростью 1 и 100°C/мин. Базальная секреция в обоих случаях превышала секрецию кортизола криоконсервированными фрагментами, рекультивированными при 37°C, и составляла 137,67±17,53 и 261,05±13,23 нмоль/г белка для медленно и быстро криоконсервированных фрагментов соответственно.

Выводы

Гипотермическое культивирование и рекультивирование после замораживания-отогрева обеспечивают сохранение более высокого уровня функциональной активности нативных и криоконсервированных надпочечников новорожденных поросят.

Results and discussion

With increase in culturing duration at 37°C there is a decrease in cortisone basal secretion by hormone-producing cells of organotypic culture. Within the first culturing days the adrenocortical cells were of high steroidogenic activity (184.55±50.26 nmol/g protein). However within following 24 hrs of culturing the secretion level reduced down to 31.86±7.02 nmol/g protein and it was stabilised at the level of 11–15 nmol/g protein after 72 hrs of culturing. In case of hypothermic culturing a decrease in hormone-producing ability of adrenocorticocytes was also observed. However to the 2–5th days at 24°C the cortisone secretion level fall was less manifested than at 37°C. At the same time the absolute values of cortisone secretion for hypothermic culture in all points exceeded the data for the standard organotypic culture.

Basing on the obtained experimental data about a positive effect of hypothermic culturing on steroidogenic activity of native cultures there was studied the effect of re-culturing temperature at the level of hormone-producing activity of cryopreserved adrenal fragments.

It was established, that under hypothermic re-culturing a high level of cortisone secretion by cells of fragments, cryopreserved with 1 and 100°C/min rates was kept. Basal secretion in both cases exceeded the cortisone secretion by cryopreserved fragments, recultured at 37°C and was 137.67±17.53 and 261.05±13.23 nmol/g protein for slowly and rapidly cryopreserved fragments, correspondingly.

Conclusion

Hypothermic culturing and re-culturing after freeze-thawing provide the preservation of higher functional activity of native and cryopreserved adrenal glands of newborn piglets.

References

1. Leonovich S.I., Sluka B.A., Ignatovich I.N., Goranov V.A. Transplantation of culture of pancreas islet cells into red bone marrow // *Belorus. Med. Zhurn.* – 2004. – Vol. 1, N7. – P. 61–69.
2. Patent of Ukraine N 34848A, Ukraine IPC6 C12N 5/02. Cryopreservation method of adrenocortical tissue cell culture / T.P. Bondarenko, E.I. Legach; Applied 13.07.1999; Published 15.03.2001; Bull. N2.
3. Patent of Ukraine N 4567, IPC7, N12N5/08 A01N1/02. Cryopreservation method of adrenal organ culture / T.M. Gurina, N.M. Alabedalkarim, V.D. Ustichenko, T.P. Bondarenko; Applied 07.06.2004; Published 17.01.2005; Bull. N1.
4. Hunt L., Hacker D.L., Grosjean F. et al. Low-temperature pausing of cultivated mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.* – 2005. – Vol. 89, N2. – P. 157–163.
5. Ricordi C., Lacy P.E., Santiago J.V. et al. Transplantation of parathyroid, adrenal cortex and adrenal medulla using procedures which successfully prolonged islet allograft survival // *Horm. Metab. Res. Suppl.* – 1990. – Vol. 25. – P. 132–135.

Accepted in 06.05.2008

Литература

1. *Леонович С.И., Слука Б.А., Игнатювич И.Н., Горанов В.А.* Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы в красный костный мозг // Белорусский мед. журнал.– 2004.– Т. 1, № 7.– С. 61–69.
2. *Пат. України № 34848А, Україна, МПК⁶ С12N 5/02.* Спосіб кріоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини / Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач. Заявлено 13.07.99; Опубл. 15.03.2001; Бюл. № 2.
3. *Пат. України № 4567, МПК⁷, №12N5/08 А01N1/02.* Спосіб кріоконсервування органної культури надниркових залоз/ Т.М. Гуріна, Н.М. Алабедалькарім, В.Д. Устиченко, Т.П. Бондаренко. Заявлено 07.06.2004; Опубл. 17.01.05; Бюл №1.
4. *Hunt L., Hacker D.L., Grosjean F. et al.* Low-temperature pausing of cultivated mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.*– 2005.– Vol. 89, N2.– P. 157–163.
5. *Ricordi C., Lacy P.E., Santiago J.V. et al.* Transplantation of parathyroid, adrenal cortex and adrenal medulla using procedures which successfully prolonged islet allograft survival // *Horm. Metab. Res. Suppl.*– 1990.– Vol. 25.– P. 132–135.

Поступила 06.05.2008