

УДК 57.086.13:611.451.085.23

О.Ю. Новикова, О.С. Сидоренко, Г.А. Божок*, Т.П. Бондаренко

Влияние криоконсервирования на экспрессию хромогранина А в культуре клеток надпочечников неонатальных свиней

UDC 57.086.13:611.451.085.23

O.Yu. Novikova, O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok*, T.P. Bondarenko Cryopreservation Effect on Chromogranin A Expression in Neonatal Pig Adrenal Cell Culture

Реферат: Исследована экспрессия хромогранина А (ХрА) в хромоаффинных клетках надпочечников новорожденных поросят после криоконсервирования. Фрагменты ткани надпочечников криоконсервировали с использованием 10% диметилсульфоксида и контролируемой скорости охлаждения 1 град /мин до -80°C с дальнейшим погружением в жидкий азот. В качестве интактного контроля использовали незамороженные фрагменты. Ферментативным методом из фрагментов получали суспензию клеток, которую помещали в условия культивирования. Культуры клеток из интактных и криоконсервированных фрагментов представляли собой монослой с прикрепленными на нем мультিকлеточными сфероидами (МС). Методом цитофлуориметрии с использованием антител к ХрА установлено, что количество ХрА-позитивных клеток в криоконсервированных образцах значимо не отличается от контроля ($(31,1 \pm 2,7)$ и $(32,9 \pm 3,6)\%$ соответственно). Иммуноцитохимическим методом в обеих культурах на начальные сутки культивирования выявлены ХрА-позитивные клетки как в составе монослоя, так и в МС. В течение культивирования количество этих клеток значимо не отличалось, однако они перераспределялись: уменьшалось их содержание в монослое и увеличивалось в МС. Сходные относительное количество клеток с экспрессией ХрА и характер их распределения в обеих культурах свидетельствуют о том, что криоконсервирование фрагментов надпочечников в использованном режиме сохраняет основные структурно-функциональные свойства хромоаффинных клеток.

Ключевые слова: культура клеток надпочечников, мультিকлеточные сфероиды, хромогранин А, криоконсервирование, хромоаффинные клетки.

Реферат: Досліджено експресію хромограніну А (ХрА) в хромоафінних клітинах наднирників новонароджених поросят після криоконсервування. Фрагменти тканини наднирників криоконсерували з використанням 10% диметилсульфоксиду і контрольованої швидкості охолодження 1 град/хв до -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот. У якості інтактного контролю використовували незаморожені фрагменти. Ферментативним методом із фрагментів отримували суспензію клітин, яку поміщали в умови культивування. Культури клітин з інтактних і криоконсервованих фрагментів мали вигляд моношару з прикріпленими на ньому мультіклітинними сфероїдами (МС). Методом цитофлуориметрії з використанням антитіл до ХрА встановлено, що кількість ХрА-позитивних клітин у криоконсервованих зразках значуще не відрізняється від контролю ($(31,1 \pm 2,7)$ і $(32,9 \pm 3,6)\%$ відповідно). Імуноцитохімічним методом в обох культурах на початкову добу культивування виявлені ХрА-позитивні клітини як у складі моношару, так і в МС. Протягом культивування кількість цих клітин значуще не відрізнялася, однак вони перерозподілялися: зменшувався вміст у моношарі, але збільшувався у МС. Схожі кількість клітин із експресією ХрА та характер їх розподілу в обох культурах свідчать про те, що криоконсервування фрагментів наднирників у використаному режимі зберігає основні структурно-функціональні властивості хромоафінних клітин.

Ключові слова: культура клітин надниркових залоз, мультіклітинні сфероїди, хромогранін А, криоконсервування, хромоафінні клітини.

Abstract: The expression of chromogranin A (CgA) in chromaffin cells of adrenal glands of newborn piglets after cryopreservation was studied. Adrenal tissue fragments were cryopreserved using 10% dimethyl sulfoxide and a controlled cooling rate of 1 deg / min down to -80°C with further immersion into liquid nitrogen. Unfrozen fragments were used as an intact control. The cell suspension was obtained by enzymatic method from the fragments, placed into culturing conditions. Cell cultures from intact and cryopreserved fragments represented a monolayer with multicellular spheroids (MS) attached to it. Flow cytometry using antibodies to CgA revealed that the number of CgA-positive cells in cryopreserved samples did not significantly differ from the control ((31.1 ± 2.7) and $(32.9 \pm 3.6)\%$, respectively). By the immunocytochemical method, in both cultures, on the initial day of culturing the CgA-positive cells were found both in the monolayer and in MS. During culturing the number of these cells did not significantly differ, however, they were redistributed, i. e. their content in the monolayer decreased and it was increased in the MS. Similar relative numbers of cells with the CgA expression and their distribution nature in both cultures indicated that the cryopreservation of adrenal fragments in the mode used retained the basic structural and functional properties of chromaffin cells.

Key words: adrenal cell culture, multicellular spheroids, chromogranin A, cryopreservation, chromaffin cells.

Відділ кріоендокринології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryoendocrinology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: bozhokgaru@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: bozhokgaru@gmail.com

Надійшла 25.03.2019

Прийнята до друку 14.11. 2019

Received March, 25, 2019

Accepted November, 14, 2019

© 2019 G.A. Bozhok, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Хромогранин А (ХрА) – термостабильный гидрофильный кислый белок семейства гранинов, состоящий из 460 аминокислот. Он синтезируется в клетках нейроэндокринной системы и входит в состав их секреторных гранул [15]. Изучение динамики экспрессии ХрА в онтогенезе важно для понимания причин физиологических и патологических перестроек в нейроэндокринной системе.

Известно, что экспрессия ХрА коррелирует с количеством секреторных гранул в нейроэндокринных клетках, является маркером их дифференцировки в норме и при неопластической трансформации [11]. В хромоаффинных клетках мозгового вещества надпочечников ХрА содержится в секреторных гранулах и высвобождается вместе с катехоламинами. Внутри клетки ХрА участвует в биосинтезе секреторных гранул на уровне аппарата Гольджи [13]. Он избирательно преобразуется в пептиды, регулирующие уровень некоторых биологических функций, включая клеточную пролиферацию, ангиогенез и секрецию гормонов [19]. Кроме того, ХрА играет важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза кальция, обладает высокой кальций-связывающей способностью. Крупные секреторные гранулы с оптически плотными ядрами (*large densecore granules*) в хромоаффинных клетках фактически представляют собой резервуар кальция [20].

В процессе замораживания-отогрева любая клетка претерпевает трансформацию, связанную с нарушением проницаемости мембраны, флуктуациями объема, количественными и качественными изменениями внутриклеточного содержимого [1, 10]. Изучение динамики экспрессии ХрА в клетках мозгового вещества надпочечников необходимо для оценки влияния факторов криоконсервирования на биогенез секреторных гранул, в котором принимают участие практически все компоненты эндомембранной системы [9].

Культура клеток надпочечников неонатальных свиней является удобной моделью, поскольку для нее разработаны способы культивирования *in vitro* и криоконсервирования [2–5].

Цель работы – изучение экспрессии хромогранина А в первичной культуре надпочечников неонатальных поросят до и после криоконсервирования.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447–IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных

Chromogranin A (CgA) is a thermostable hydrophilic acidic protein of the granin family, consisting of 460 amino acids. It is synthesized in the neuroendocrine system cells and is a part of their secretory granules [10]. Studying the dynamics of CgA expression in ontogenesis is important for understanding the causes of physiological and pathological rearrangements in the neuroendocrine system.

The CgA expression is known to correlate with the number of secretory granules in neuroendocrine cells, and it is a marker of their differentiation in normal and neoplastic transformation [6]. In the chromaffin cells of adrenal medulla, the CgA is found in secretory granules and is released along with catecholamines. Inside a cell the CgA is involved into biosynthesis of secretory granules at the Golgi apparatus level [8]. It selectively transforms into peptides, regulating the level of certain biological functions, including cell proliferation, angiogenesis, and hormone secretion [19]. In addition, the CgA plays an important role in maintaining intracellular calcium homeostasis and it has a high Ca-binding ability. Actually large densecore granules in chromaffin cells represent a calcium reservoir [20].

During freezing-warming, any cell undergoes a transformation associated with an impaired membrane permeability, volume fluctuations, and quantitative and qualitative changes in intracellular contents [1, 5]. The dynamics of CgA expression in adrenal medulla cells should be studied to assess the effect of cryopreservation factors on the biogenesis of secretory granules, in which almost all components of the endomembrane system participate [4].

Neonatal pig adrenal cell culture is a convenient model because the *in vitro* culturing and cryopreservation methods have been developed for it [11, 12, 15, 16].

The research aim was to investigate the expression of chromogranin A in the primary adrenal gland culture of neonatal piglets prior to and after cryopreservation.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (N 3447 – IV dated of February 2nd, 2006), when keeping the requirements of the Institute's Bioethics Committee, consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The experiments were performed in adrenal glands of pigs of early neonatal age (days 1–3 after



животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Опыты проводили на надпочечниках поросят раннего неонатального возраста (1-е – 3-и сутки после рождения). Органы извлекали и каждый измельчали на 5 – 6 фрагментов. Одну часть фрагментированных надпочечников замораживали в криопробирках («SPL», Германия) со скоростью охлаждения 1 град/мин до -80°C на программном замораживателе «ЗПМ-1» (НПК «Отел», Украина), затем погружали в жидкий азот и хранили до использования. Образцы криоконсервировали в среде, содержащей DMEM («Biowest», Франция) и 10%-й диметилсульфоксид (ДМСО). Криоконсервированные фрагменты надпочечников хранили в течение месяца. Для получения культуры клеток фрагменты быстро размораживали на водяной бане при 37°C и отмывали от криопротектора.

Суспензию клеток получали методом ферментативной дезагрегации по ранее описанному протоколу [4]. Для этого использовали вторую часть фрагментов (интактный контроль) и деконсервированные фрагменты надпочечников.

Клетки высевали в концентрации 4×10^5 кл/мл и культивировали в течение 15 суток в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C и 5% CO_2 в чашках Петри для культур клеток («SPL»). Использовали питательную среду DMEM/F12 («Bio-west»), содержащую 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, «Biowest»), 1-й % раствор антибиотика-антимикотика («Biowest»). Замену среды осуществляли на каждые третьи сутки.

Относительное количество ХрА-позитивных клеток анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимии.

Ранее было установлено, что в суспензии клеток, полученных ферментативным способом из надпочечников, присутствует несколько типов клеток [18]. В условиях культивирования одна субпопуляция клеток начинает прикрепляться сразу, а другая, к которой относятся и хромаффинные клетки, – позже. Таким образом, для изучения динамики экспрессии ХрА в культуре необходимо учитывать две субпопуляции клеток – прикрепленную и флотирующую. Общая схема эксперимента представлена на рис. 1.

Каждые трое суток культивирования собирали питательную среду с неприкрепленными клетками (флотирующая субпопуляция). Монослой клеток снимали с поверх-

the birth). The organs were removed and each was crushed into 5 – 6 fragments. One part of the fragmented adrenal glands was frozen in cryovials (SPL, Germany) with a cooling rate of 1 deg / min down to -80°C using the ZPM-1 program freezer (SPC Otel, Ukraine), then immersed into liquid nitrogen and stored before use. Samples were cryopreserved in a medium containing DMEM (Biowest, France) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). Cryopreserved adrenal fragments were stored for one month. To obtain a cell culture, the fragments were quickly warmed in a water bath at 37°C and washed from the cryoprotectant.

The cell suspension was obtained by enzymatic disaggregation according to the previously described protocol [15]. For this, the second part of the fragments (intact control) and warmed adrenal fragments were used.

Cells were plated at a concentration of 4×10^5 cells / ml and cultured for 15 days in a CO_2 incubator at 37°C and 5% CO_2 in Petri dishes for cell cultures (SPL). We used nutrient medium DMEM / F12 (Biowest) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest), 1% solution of antibiotic-antimycotic (Biowest). The medium was changed every 3 days.

The relative number of CgA-positive cells was analyzed by means of flow cytometry and immunocytochemistry.

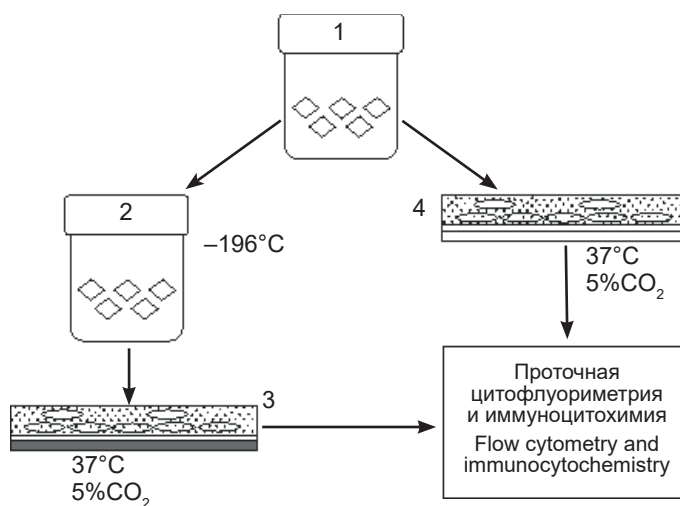


Рис. 1. Схема эксперимента по получению и криоконсервированию первичной культуры клеток надпочечников: 1 – интактные фрагменты ткани надпочечников; 2 – криоконсервированные фрагменты ткани надпочечников; 3, 4 – культуры клеток, полученные из интактных (контроль) и криоконсервированных фрагментов ткани.

Fig. 1. Design of experiment on obtaining and cryopreservation of primary culture of adrenal cells: 1 – intact fragments of adrenal tissue; 2 – cryopreserved adrenal tissue fragments; 3, 4 – cell cultures obtained from intact (control) and cryopreserved tissue fragments.



ности культурального пластика, используя смесь растворов трипсина (конечная концентрация 0,05%) и Версена, отмывали при 300g (прикрепленная субпопуляция). Флотирующую и прикрепленную субпопуляции клеток нативных и криоконсервированных культур в течение 15 мин фиксировали 2%-м раствором параформальдегида («Sigma», США), отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) при 300 g и пермеабилizировали 0,02%-м раствором сапонина («Calbiochem», США) в течение 30 мин. Образцы окрашивали первыми кроличьими антителами к XpA («Abcam», Великобритания) в разведении 1:200. Инкубировали с антителами в растворе PBS (pH 7,4) с добавлением 0,02% Triton X-100 («Sigma») в течение 12 ч при температуре 4°C, затем дважды отмывали в PBS. Окрашивание вторыми антикроличьими Alexa488-конъюгированными антителами («Abcam») в разведении 1:400 проводили в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Неспецифическую флуоресценцию оценивали при инкубации клеток только со вторыми антителами. Анализ проводили на цитофлуориметре «FACSCalibur» («BDBioscience», США) с помощью программ «CellQuestPro» («Becton Dickinson», США) и «WinMDI 2.8» (США).

Для иммунофлуоресцентного анализа монослой клеток контрольных и криоконсервированных культур на каждые третьи сутки фиксировали в течение 15 мин в 4%-м растворе параформальдегида. Культуры отмывали в PBS трижды по 5 мин. Пермеабилizацию проводили в 0,3%-м растворе Triton X-100 в течение 10 мин. Блокировали неспецифическое связывание антител раствором PBS, содержащим 0,1% Triton X-100; 1% бычьего сывороточного альбумина, 0,3 М глицина («Reanal», Венгрия) на протяжении часа при комнатной температуре. Для мечения использовали указанные первые (разведение 1:200) и вторые (разведение 1:400) антитела. Инкубацию с первыми антителами проводили при 4°C на протяжении ночи, затем трижды отмывали PBS, со вторыми антителами – при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Для визуализации ядер фиксированные клетки после инкубации с антителами докрашивали раствором пропидия йодида (2 мг/мл). Микрофотосъемку осуществляли на флуоресцентном микроскопе «Carl Zeiss Axio Observer Z» («Carl Zeiss», Германия). Относительное количество XpA-позитивных клеток в монослое, исключая мультিকлеточные сфероиды (МС), определяли путем подсчета пяти микрофотографий для каждой пробы, выражали

It was previously established that in the suspension of cells obtained by the enzymatic method from the adrenal glands, several types of cells are present [18]. During culturing one subpopulation of cells begins to attach immediately, and the other, which chromaffin cells belong to, starts it later. Thus, in order to study the dynamics of CgA expression in culture, it is necessary to take into account two subpopulations of cells, *i. e.* the attached and floating ones. The general experimental design is shown in Fig. 1

The nutrient medium with non-adhered cells (floating subpopulation) was collected every three days of culturing. A monolayer of cells was removed from the surface of the culture plastic using a mixture of trypsin (0.05% final concentration) and versene solutions, washed at 300g (attached subpopulation). Floating and attached subpopulations of cells of native and cryopreserved cultures were fixed for 15 min with 2% paraformaldehyde solution (Sigma, USA), washed with phosphate-buffered saline (PBS) at 300 g and permeabilized with a 0.02% saponin solution (Calbiochem, USA) for 30 minutes. Samples were stained with the first rabbit anti-XpA antibodies (Abcam, UK) at a 1: 200 dilution. They were incubated with antibodies in PBS solution (pH 7.4) with the addition of 0.02% Triton X-100 (Sigma) for 12 h at 4°C, then washed twice in PBS. Staining with second anti-rabbit Alexa488-conjugated antibodies (Abcam) at a dilution of 1:400 was carried out for 30 min in the dark at room temperature. Nonspecific fluorescence was assessed by incubating cells with only second antibodies. The analysis was carried out with a FACS Calibur cytofluorimeter (BDBioscience, USA) using the CellQuestPro programs (Becton Dickinson, USA) and WinMDI 2.8 (USA).

For immunofluorescence analysis, a monolayer of cells from control and cryopreserved cultures was fixed for 15 minutes in a 4% paraformaldehyde solution for every third day. The cultures were washed in PBS three times for 5 minutes. Permeabilization was carried out in a 0.3% Triton X-100 solution for 10 minutes. Nonspecific antibody binding was blocked with a PBS solution containing 0.1% Triton X-100; 1% bovine serum albumin, 0.3 M glycine (Reanal, Hungary) for one hour at room temperature. For labeling, the indicated first (1: 200 dilution) and second (1: 400 dilution) antibodies were used. Incubation with the first antibodies was carried out at 4°C overnight, then washed three times with PBS, with the second antibodies at room temperature for 30 minutes in the dark. To visualize nuclei, fixed cells after incubation with antibodies were stained with propidium



в процентах. За 100% принимали общее количество подсчитанных клеток.

Для статистической обработки данных использовали программные приложения «Excel» («Microsoft», США) и «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Данные представляли в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Различия между выборками оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что в суспензии клеток, выделенной из интактных фрагментов надпочечников неонатальных поросят, содержится $(32,9 \pm 3,6)\%$ ХрА-позитивных клеток, а из криоконсервированных – $(31,1 \pm 2,7)\%$.

Изменение содержания ХрА-позитивных клеток в процессе культивирования представлено в таблице. Следует отметить, что на начальные сутки культивирования приблизительно треть клеток в контрольной и криоконсервированной культурах пребывала во флотирующем состоянии. Такое соотношение клеток сохранялось в течение 15 суток культивирования, хотя каждые трое суток из культуры отбирали питательную среду вместе с флотирующими клетками. Возможно, в использованных условиях культивирования происходит переход ХрА-позитивных клеток из прикрепленного состояния во флотирующее. Это предположение подкрепляется ранее полученными данными о том, что хромаффинные клетки способны пребывать в суспензионной культуре [14].

iodide solution (2 mg / ml). Microphotography was carried out with a Carl Zeiss Axio Observer Z fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany). The relative number of CgA-positive cells in the monolayer, excluding multicellular spheroids (MS), was determined by counting five micrographs for each sample, expressed as a percentage. Total number of counted cells was assumed as 100%.

For statistical data processing, the Excel (Microsoft, USA) and Statistica 7.0 (StatSoft, USA) software were used. Data were presented as means \pm standard deviation. Differences between the samples were evaluated using one-way analysis of variance, the differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Flow cytometry revealed that a suspension of cells isolated from intact adrenal fragments of neonatal piglets contained $(32.9 \pm 3.6)\%$ of CgA-positive cells, and $(31.1 \pm 2.7)\%$ of cryopreserved cells.

The change in the content of CgA-positive cells during cultivation is presented in the Table. It should be noted that on initial day of culturing, approximately a third of the cells in the control and cryopreserved cultures were in a floating state. This cell ratio was maintained for 15 days of cultivation, although every three days a culture medium was taken from the culture along with floating cells. It is possible that under the used culturing conditions, the CgA-positive cells transit from the attached state to the floating one. This assumption is supported by the previously obtained data that chromaffin cells are capable of remaining in suspension culture [9].

Количество ХрА-позитивных клеток в контрольной и криоконсервированной культурах клеток надпочечников неонатальных поросят на разные сутки культивирования

The number of CgA-positive cells in the control and cryopreserved cultures of neonatal piglet adrenal cells on different days of cultivation

Срок культивирования, сутки Culturing terms, days	Количество ХрА-позитивных клеток в контрольной культуре, % Number of CgA-positive cells in control culture, %		Количество ХрА-позитивных клеток в криоконсервированной культуре, % Number of CgA-positive cells in cryopreserved culture, %	
	Флотирующая субпопуляция Floating subpopulation	Прикрепленная субпопуляция Adhered subpopulation	Флотирующая субпопуляция Floating subpopulation	Прикрепленная субпопуляция Adhered subpopulation
2	9,2 \pm 3,2	21,8 \pm 3,1	10,7 \pm 4,1	26,5 \pm 4,4
7	10,4 \pm 2,1	24,6 \pm 4,0	15,1 \pm 2,9	18,2 \pm 4,2
12	14,3 \pm 2,8	16,7 \pm 2,2	11,2 \pm 2,2	21,7 \pm 1,1
15	11,1 \pm 2,2	13,0 \pm 1,5*	12,9 \pm 2,0	17,2 \pm 1,2*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению со вторыми сутками культивирования, $p < 0,05$.

Note: * – the differences are statistically significant compared with day 2 of cultivation, $p < 0,05$.



Количество ХрА-позитивных клеток как во флотирующей, так и в прикрепленной субпопуляциях значимо не отличалось между контрольной и криоконсервированной культурами (таблица). Это свидетельствует о том, что выбранный режим криоконсервирования позволяет сохранить хромаффинные клетки в жизнеспособном состоянии.

К 15-м суткам культивирования в монослой обеих культур наблюдалось значимое уменьшение количества ХрА-позитивных клеток по сравнению с исходными сутками культивирования (таблица). В контрольной культуре этот показатель уменьшался на $(8 \pm 0,12)$, а в криоконсервированной – на $(9 \pm 0,15)\%$. Возможно, это происходило в результате вытеснения ХрА-позитивных клеток клетками других быстро пролиферирующих субпопуляций. В целом количество клеток, экспрессирующих ХрА, в контрольной и криоконсервированной культурах сходно, что подтверждает эффективность выбранного способа криоконсервирования.

Количество ХрА-позитивных клеток в контрольной и криоконсервированной культурах клеток надпочечников неонатальных поросят на разные сутки культивирования

На следующем этапе исследования в контрольной и криоконсервированной культурах надпочечников с помощью иммуноцитохимического метода нами был проведен качественный анализ клеток, экспрессирующих ХрА. Было установлено, что относительное количество ХрА-позитивных клеток в монослой обеих культур снижалось с 7-х суток (рис. 2). Заметим, что клетки, находящиеся в составе МС, не подсчитывались, поскольку корректная оценка данного показателя невозможна. Через 7 суток культивирования относительное количество ХрА-позитивных клеток уменьшалось в контрольной культуре – в 1,8 раза, а в криоконсервированной – в 1,6 раза. Через 15 суток относительное количество данных клеток уменьшалось в контрольной культуре до $(1,5 \pm 0,7)\%$, а в криоконсервированной – до $(0,9 \pm 0,8)\%$.

Нами было выявлено несоответствие между результатами цитофлуориметрического и иммуноцитохимического анализов, поскольку в последнем случае мы наблюдали более значительное уменьшение количества ХрА-позитивных клеток. Однако визуальная оценка экспрессии ХрА в культуре клеток надпочечников неонатальных поросят позволила объяснить данное противоречие. На 2-е сутки в культуре наблюдался формирующийся монослой клеток с равномерным распределением ХрА-позитивных клеток (рис. 3, А). Начиная с 7-х суток культивирования характер клеточного распределения изменился:

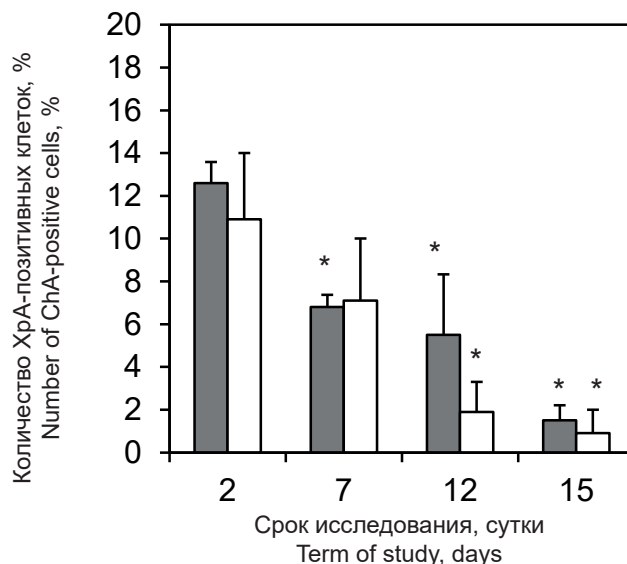


Рис. 2. Относительное количество ХрА-позитивных клеток в монослой: ■ – нативные; □ – после криоконсервирования. Визуализация с помощью иммуноцитохимического метода с использованием антител к ХрА. * – различия статистически значимы по сравнению со вторыми сутками культивирования соответствующей культуры, $p < 0,05$.

Fig. 2. Relative number of CgA-positive cells in monolayer: ■ – the native cells; □ – the cells after cryopreservation. Imaging with immunocytochemical method using antibodies to CgA. * – differences are statistically significant compared with day 2 of cultivation of the corresponding culture, $p < 0.05$.

The number of CgA-positive cells in both the floating and attached subpopulations did not significantly differ between the control and cryopreserved cultures (Table). This suggests that the selected cryopreservation mode allows the preservation of chromaffin cells in a viable state.

By the 15th day of culturing in the monolayer of both cultures, a significant decrease in the number of CgA-positive cells was observed if compared with the initial days of culturing (Table). In control culture, this index decreased by (8 ± 0.12) , and in the cryopreserved culture it did by $(9 \pm 0.15)\%$. This likely occurred as a result of the displacement of CgA-positive cells with the cells of other rapidly proliferating subpopulations. In general, the number of cells expressing CgA in the control and cryopreserved cultures is similar, which confirms the effectiveness of the selected cryopreservation method.

At the next stage of the study, in the control and cryopreserved adrenal cultures using the immunocytochemical method, we qualitatively analyzed the cells expressing CgA. It was found that the relative number of CgA-positive cells in monolayer of both cultures decreased starting from day 7 (Fig. 2). It should be noted that the



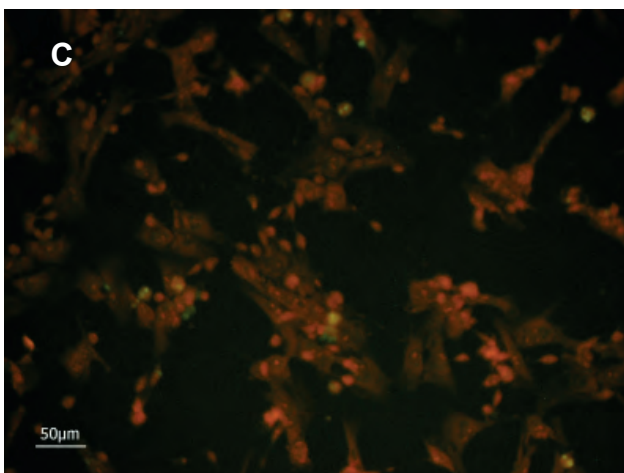
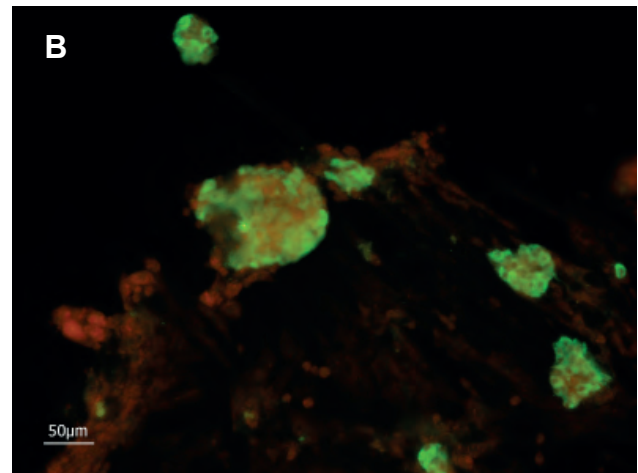
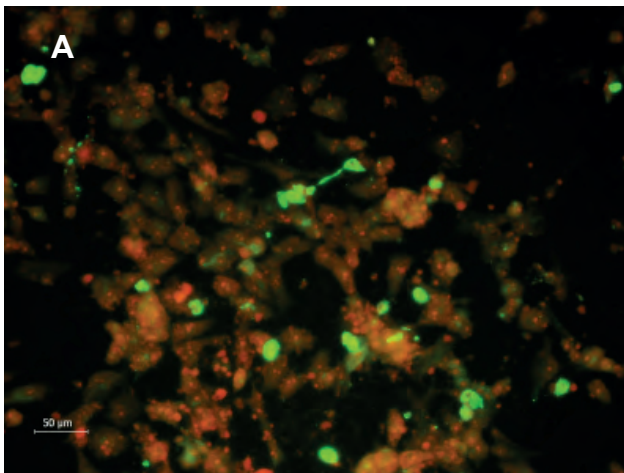


Рис. 3. Иммуноцитохимическое мечение антителами к ХрА (зеленая флуоресценция) в культуре клеток надпочечников неонатальных свиней на 2-е (А) и 15-е (В, С) сутки культивирования. А – ХрА-позитивные клетки равномерно распределены в монослое; В – экспрессия ХрА преимущественно в мультиклеточных сфероидах; С – отсутствие экспрессии ХрА в клетках монослоя. Ядра клеток контрастированы пропидий йодидом (красная флуоресценция).

Fig. 3. Immunocytochemical labeling with antibodies to CgA (green fluorescence) in culture of neonatal pig adrenal cells on days 2 (A) and 15 (B, C) of culturing. A – CgA-positive cells are evenly distributed in monolayer; B – CgA expression mainly in multicellular spheroids; C – lack of CgA expression in monolayer cells. Cell nuclei are contrasted with propidium iodide (red fluorescence).

ХрА-меченные клетки были преимущественно сосредоточены в МС, хотя единичные меченные клетки изредка встречались в монослое. На 15-е сутки наблюдалось увеличение размеров МС, состоящих в основном из ХрА-позитивных клеток (рис. 3, В). В монослое данные клетки практически отсутствовали (рис. 3, С).

Ранее были описаны два способа получения криоконсервированной культуры клеток из надпочечников неонатальных свиней. Первый способ заключается в получении первичной культуры клеток и ее криоконсервировании с использованием криозащитных сред на основе ДМСО. Было установлено, что криоконсервирование первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят в средах, содержащих 10% ДМСО с добавлением ФТС, со скоростью охлаждения 1 град/мин позволяет сохранить до 80 % жизнеспособных клеток [6]. Второй способ предполагает криоконсервирование фрагментов ткани надпочечников в среде с 10% ДМСО с использованием низких скоростей охлаждения 0,3–1 град/мин. При этом первичная культура, полученная из криоконсервированных фрагментов, обладала сходными морфофункциональными свойствами

cells being a part of the MS were not counted, since the correct assessment of this index is impossible. After 7 days of cultivation, the relative number of CgA-positive cells decreased in the control culture in 1.8 times, and in cryopreserved that diminished in 1.6 times. After 15 days the relative amount of these cells decreased in the control culture down to (1.5–0.7)%, and in cryopreserved culture it did down to (0.9 ± 0.8)%.

We revealed a discrepancy between the results of cytofluorimetric and immunocytochemical analyses, since in the latter case we observed a stronger decrease in the number of CgA-positive cells. However, a visual assessment of CgA expression in neonatal piglet adrenal cell culture allowed this contradiction to be explained. On day 2 in culture, a monolayer of cells was formed with uniform distribution of CgA-positive cells (Fig. 3A). After 7 days of cultivation, the nature of cell distribution changed, namely the CgA-labeled cells were predominantly concentrated in the MS, although single labeled cells were rarely found in the monolayer. On day 15 an increase in the size of MS was observed, consisting mainly of ChrA-positive cells (Fig. 3B). In monolayer, these cells were virtually absent (Fig. 3C).



[7]. Жизнеспособность клеток, их способность к адгезии, морфологические особенности, экспрессия некоторых фенотипических маркеров, например, β III-тубулина, при данном способе криоконсервирования у интактной и криоконсервированной культур значимо не отличаются.

В настоящей работе мы использовали второй способ получения криоконсервированной культуры клеток надпочечников, а именно – криоконсервирование фрагментов ткани с 10% ДМСО и скоростью охлаждения 1 град/мин. Установлено, что суспензия клеток, полученная из интактных фрагментов надпочечников новорожденных поросят, содержала около 30 % клеток, экспрессирующих ХрА. Криоконсервирование существенно не влияло на этот показатель.

Интересно, что количественное соотношение ХрА-позитивных клеток во флотирующей и прикрепленной субпопуляциях первичной культуры клеток надпочечников неонатальных поросят сохранялось после замораживания-отогрева. В контрольной и криоконсервированной культурах начиная с 7-х суток значимо снижалось количество клеток, экспрессирующих ХрА, возможно, за счет преимущественного деления других быстро пролиферирующих типов клеток.

Хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников – это нейроэндокринные клетки-производные нервного гребня. Вместе с симпатическими нейронами спинных ганглиев, а также мелкими интенсивно флуоресцирующими клетками они составляют симпатoadреналовую линию производных нервного гребня [12]. Ранее было выявлено свойство клеток мозгового вещества надпочечников разных видов млекопитающих и человека к образованию МС в культуре [3, 8, 16, 17]. При этом важно отметить, что количество, размер, способность к колониеобразованию, фенотипический состав МС зависят от условий их получения (вид культуральной поверхности, присутствие ФТС в среде, наличие и комбинация ростовых факторов).

В настоящей работе установлено, что клетки, экспрессирующие ХрА, принимают участие в формировании МС в условиях культивирования клеток надпочечников неонатальных поросят в среде с ФТС на адгезивной подложке. При этом в процессе культивирования выявлено изменение распределения ХрА-позитивных клеток: снижение их относительного количества в составе монослы и повышение в МС. Механизм образования МС в культуре клеток надпочечников требует отдельного исследования, однако можно предположить, что клетки, экспрессирующие ХрА, играют в этом процессе важную роль.

Two methods have previously been described for preparing a cryopreserved cell culture of adrenal glands of neonatal pigs. The first method is to obtain a primary cell culture and its cryopreservation using cryoprotective media based on DMSO. It was found that cryopreservation of the primary culture of adrenal gland cells in newborn piglets in the media containing 10% DMSO with the addition of FBS, with a cooling rate of 1 deg / min, allows up to 80% of viable cells to be preserved [17]. The second method involves cryopreservation of adrenal tissue fragments in a medium with 10% DMSO using low cooling rates of 0.3–1 deg / min. Moreover, the primary culture obtained from cryopreserved fragments had similar morphofunctional properties [2]. Cell viability, their ability to adhere, morphological features, expression of some phenotypic markers, for example, β III-tubulin, do not significantly differ in this method of cryopreservation in intact and cryopreserved cultures.

In this research, we used the second method for obtaining a cryopreserved adrenal cell culture, namely, cryopreservation of tissue fragments with 10% DMSO and a cooling rate of 1 deg / min. It was found that a cell suspension obtained from intact adrenal fragments of newborn piglets contained about 30% of cells expressing CgA. Cryopreservation did not significantly affect this index.

It is of interest that the quantitative ratio of CgA-positive cells in the floating and attached subpopulations of the primary culture of neonatal piglet adrenal cells was kept after freezing-warming. In the control and cryopreserved cultures, after 7 days the number of cells expressing CgA was significantly reduced, possibly due to the predominant division of other rapidly proliferating cell types.

Chromaffin cells of the adrenal medulla are neuroendocrine cells derived from the neural crest. Together with the sympathetic neurons of the dorsal ganglia, as well as small, intensely fluorescent cells, they make up the sympathoadrenal line of the neural crest derivatives [7]. Previously, the property of adrenal medulla cells of different mammalian and human species to the formation of MS in culture was revealed [3, 12–14]. It is important to note that the amount, size, colony forming ability, phenotypic composition of MS depend on the conditions of their preparing (type of culture surface, presence of FBS in medium, presence and combination of growth factors).

In this work the cells expressing CgA were found to participate in the formation of MS during culturing of adrenal gland cells of neonatal piglets in the medium with FBS on an adhesive substrate. Moreover, during the cultivation a change in the distri-



Выводы

1. Криоконсервирование фрагментов надпочечников новорожденных поросят с контролируемой скоростью 1 град/мин до -80°C в защитной среде с 10% ДМСО значимо не влияет на количество клеток, экспрессирующих ХрА ($(32,9 \pm 3,6)\%$ в контрольной и $(31,1 \pm 2,7)\%$ в криоконсервированной суспензиях клеток).

2. В первичной культуре клеток надпочечников новорожденных поросят начиная с 7-х суток культивирования снижается количество ХрА-позитивных клеток, вероятно, за счет преимущественного роста других быстро пролиферирующих субпопуляций клеток.

3. В процессе культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят происходит изменение распределения ХрА-позитивных клеток: снижение их относительного количества в составе монослоя и повышение в МС.

4. Сходное соотношение ХрА-позитивных клеток в контрольной и криоконсервированной культурах, а также одинаковая динамика их перераспределения при росте культуры свидетельствуют, что криоконсервирование фрагментов надпочечников в использованном режиме значимо не влияет на основные структурно-функциональные свойства хромоаффинных клеток.

Литература

1. Бондаренко ТП, Легач ЕИ, Киروشка ВВ, и др. Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков; 2012. С. 361–401.
2. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Криоконсервирование мультিকлеточных сфероидов, полученных из надпочечников новорожденных поросят. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(4): 322–33.
3. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, и др. Экспрессия β -III-тубулина в культуре клеток неонатальных надпочечников: сравнение монослойного и 3D-культивирования. Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, серія «Біологія». 2017; 28: 76–86.
4. Сидоренко ОС, Божок ГА, Билявская СБ, и др. Морфофункциональные характеристики культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. Біотехнологія. 2012; 5(5): 72–81.
5. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач ЕИ, и др. Получение первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. Медицина сьогодні і завтра. 2011; 1(2): 248–52.
6. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач ЕИ, и др. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. Проблемы криобиологии. 2011; 21(1): 58–67.
7. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. Cryobiology. 2016; 73(2): 152–61.

tion of CgA-positive cells was revealed, *i. e.* a decrease in their relative amount in the monolayer and an increase in MS. The mechanism of the formation of MS in adrenal cell culture demands a separate study, however, it can be assumed that the cells expressing CgA play an important role in this process.

Conclusions

1. Cryopreservation of adrenal fragments of newborn piglets with a controlled rate of 1 deg / min down to -80°C in a cryoprotective medium with 10% DMSO did not significantly affect the number of cells expressing CgA ($(32.9 \pm 3.6)\%$ in the control and $(31.1 \pm 2.7)\%$ in cryopreserved cell suspensions).

2. In the primary culture of adrenal gland cells of newborn piglets, the number of CgA-positive cells decreased since day 7 of culturing, probably due to the predominant growth of other rapidly proliferating cell subpopulations.

3. During the culturing of adrenal gland cells of newborn piglets, a change in the distribution of CgA-positive cells occurs: a decrease in their relative number in the composition of monolayer and an increase in MS.

4. A similar ratio of CgA-positive cells in the control and cryopreserved cultures, as well as the same dynamics of their redistribution during culture growth indicate that cryopreservation of adrenal fragments in the mode used did not significantly affect the basic structural and functional properties of chromaffin cells.

References

1. Bondarenko TP, Legach EI, Kiroshka VV, et al. [Cultivation, cryopreservation and tissue transplantation of endocrine glands]. In: Goltsev AN, editor. [Actual problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkiv: IPCC; 2012. p. 361–401. Russian.
2. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. Cryobiology. 2016; 73(2): 152–61.
3. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. Stem Cells. 2009; 27(10): 2602–13.
4. Elias S, Delestre C, Ory S, et al. Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. Endocrinology. 2012; 153(9): 4444–56.
5. Fuller B, Lane N, Benson E, editors. Life in the frozen state. New York: CRC Press; 2004. 663 p.
6. Gkolfinopoulos S, Tsapakidis K, Papadimitriou K, et al. Chromogranin A as a valid marker in oncology: clinical application or false hopes. World J Methodol. 2017; 7(1):9–15.



8. Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells*. 2009; 27(10): 2602–13.
9. Elias S, Delestre C, Ory S, et al. Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology*. 2012; 153(9): 4444–56.
10. Fuller B, Lane N, Benson E, editors. *Life in the frozen state*. New York. CRC Press; 2004. 663 p.
11. Gkolfinopoulos S, Tsapakidis K, Papadimitrou K, et al. Chromogranin A as a valid marker in oncology: Clinical application or false hopes. *World J Methodol*. 2017; 7(1): 9–15.
12. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol*. 2006; 298(2): 335–43.
13. Kent C, Coupland RE. Localisation of chromogranin A and B, met-enkephalin-arg6-gly7-leu8 and PGP9.5-like immunoreactivity in the developing and adult rat adrenal medulla and extra-adrenal chromaffin tissue. *J Anat*. 1989; 16(6): 213–25.
14. Livett BG, Borges R. Advances in cell culture for chromaffin cells and related cell types. In: Borges R, Gandia L, editors. *Cell biology of the chromaffin cell*. La Laguna, Madrid: Instituto Teófilo Hernando; 2004. p. 261–7.
15. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr Relat Cancer*. 2018; 25(1): R11–R29.
16. Santana MM, Chung KF, Vukicevic V, et al. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. *Stem Cells Transl. Med*. 2012; 1(11): 783–91.
17. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS ONE [Internet]*. 2013 [cited 10.10.2019]; 8(5): e64454. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064454>
18. Unsicker K, Müller TH. Purification of bovine adrenal chromaffin cells by differential plating. *J Neurosci Methods*. 1981; 4(3): 227–41.
19. Xu ZQ, Lew JY, Harada K, et al. Immunohistochemical studies on phosphorylation of tyrosine hydroxylase in central catecholamine neurons using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Neuroscience*. 1998; 82(3): 727–38.
20. Yoo SH, Huh YH, Hur YS. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in chromaffin secretory granules and its relation to chromogranins. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30: 1155–61.
7. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol*. 2006; 298(2): 335–43.
8. Kent C, Coupland RE. Localisation of chromogranin A and B, met-enkephalin-arg6-gly7-leu8 and PGP9.5-like immunoreactivity in the developing and adult rat adrenal medulla and extra-adrenal chromaffin tissue. *J Anat*. 1989; 16(6): 213–25.
9. Livett BG, Borges R. Advances in cell culture for chromaffin cells and related cell types. In: Borges R, Gandia L, editors. *Cell biology of the chromaffin cell*. La Laguna, Madrid: Instituto Teófilo Hernando; 2004. p. 261–7.
10. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr Relat Cancer*. 2018; 25(1): R11–R29.
11. Plaksina EM, Sidorenko OS, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from newborn piglet adrenal glands. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27: 322–33.
12. Plaksina EM, Sidorenko OS, Legach Yel, et al. [Expression of β -III-tubulin in neonatal adrenal cell culture: comparison of monolayer and 3D cultivation]. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 2017; 28: 76–86. Russian
13. Santana MM, Chung KF, Vukicevic V, et al. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. *Stem Cells Transl. Med*. 2012; 1(11): 783–91.
14. Saxena S, Wahl J, Huber-Lang MS, et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS ONE [Internet]*. 2013 [cited 10.10.2019]; 8(5): e64454. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064454>
15. Sidorenko OS, Bozhok GA, Bilavskaya SB, et al. [Morphological and functional characteristics of the culture of adrenal gland cells of newborn piglets.] *Biotechnology* 2012; 5 (5): 72–81. Russian.
16. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach EI, et al. [Obtaining primary culture of adrenal cells of newborn piglets]. *Medytsyna Sogodni i Zavtra*. 2011; 1(2): 248–52. Russian.
17. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach EI, et al. The study of the possibility of obtaining and cryopreservation of the primary culture of adrenal cells of newborn piglets. *Problems of cryobiology*. 2011; 21(1): 58–67.
18. Unsicker K, Müller TH. Purification of bovine adrenal chromaffin cells by differential plating. *J Neurosci Methods*. 1981; 4(3): 227–41.
19. Xu ZQ, Lew JY, Harada K, et al. Immunohistochemical studies on phosphorylation of tyrosine hydroxylase in central catecholamine neurons using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Neuroscience*. 1998; 82(3): 72–38.
20. Yoo SH, Huh YH, Hur YS. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in chromaffin secretory granules and its relation to chromogranins. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30: 115–61.

