

Морфологические особенности первичной культуры клеток надпочечников, полученной из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани

О.С. СИДОРЕНКО, В.С. ХОЛОДНЫЙ, Т.М. ГУРИНА, Е.И. ЛЕГАЧ, Г.А. БОЖОК
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological Peculiarities of Primary Culture of Adrenal Cells, Obtained From Native and Cryopreserved Tissue Fragments

O.S. SIDORENKO, V.S. KHOLODNYI, T.M. GURINA, YE.I. LEGACH, G.A. BOZHOK
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Первичная культура клеток (ПКК) эндокринных органов широко используется в качестве объекта биомедицинских исследований. Для ее длительного хранения применяется криоконсервирование, перед которым нативная ткань подвергается механическому измельчению на фрагменты, ферментативной обработке, полученные клетки культивируются.

Цель работы – получить ПКК из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани надпочечников новорожденных поросят и изучить ее морфологические особенности.

Клетки, полученные из нативных надпочечных желез ферментативным методом, культивировали в среде 199 с 10 и 2% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Фрагменты надпочечников криоконсервировали под защитой 10% ДМСО с высокой (>100°C/мин) и низкой (5°C/мин до –70°C) скоростями охлаждения с последующим погружением в жидкий азот.

После 1-х суток культивирования клетки, полученные из нативных надпочечных желез, прикреплялись к поверхности и распластывались. К 3–4-м суткам образовывался монослой, состоящий из крупных фибробластоподобных и веретенообразных клеток и достигающий 80% конfluenceности. При замене на 3-и сутки питательной среды на аналогичную, но содержащую 2% ЭТС, к 6–7-м суткам культивирования в ПКК наблюдались разрежение монослоя и формирование сфероподобных структур, прикрепленных к монослою. При переносе сфероподобных структур в среду культивирования, содержащую 10% ЭТС, отмечалось их прикрепление к поверхности и выделение из них нейроноподобных клеток в последующие 2–3-и сутки.

При культивировании клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов надпочечных желез (замороженных с высокой и низкой скоростями охлаждения), к 3-м суткам были обнаружены одиночные живые клетки, плавающие в среде, а также прикрепившиеся, но не распластанные. В таких культурах не происходили пролиферация клеток и формирование монослоя.

Таким образом, ПКК надпочечников новорожденных поросят в виде монослоя может быть получена из нативных фрагментов ткани. После криоконсервирования фрагментов как с высокой, так и с низкой скоростями охлаждения не наблюдается формирование монослоя. Возможно, это является следствием совместного действия криоповреждающих факторов и ферментативной обработки. Кроме того, при снижении концентрации ЭТС в среде культивирования в ПКК надпочечников новорожденных поросят, полученной из нативных фрагментов, формируются сферические колонии клеток, из которых в дальнейшем выселяются клетки, морфологически отличающиеся от клеток первичного монослоя.

Primary cell culture (PCC) of endocrine organs is widely used as the object of biomedical researches. For its long-term storage the cryopreservation is used, prior to which native tissue is subjected to mechanical fragmentation, enzymatic processing, and culturing of obtained cells.

The research aim was to obtain PCC from native and cryopreserved fragments of newborn pig adrenal tissues and study their morphological peculiarities.

The cells obtained from native adrenal glands by means of enzymatic method were cultured in medium 199 with 10 and 2% fetal calf serum (FCS). Adrenal fragments were cryopreserved under 10% DMSO protection with high (>100°C/min) and low (5°C/min down to –70°C) cooling rates with following plunging into liquid nitrogen.

After first 24 hrs of culturing the cells obtained from native adrenal glands adhered to the surface and flattened. To the 3rd–4th days the monolayer, consisting of large fibroblast-like and spindle-like cells and achieving 80% confluence, was formed. After changing the nutrient medium at the 3rd day to similar one, but containing 2% FCS in PCC we found monolayer loosening and formation of sphere-like structures adhered to monolayer to the 6–7th culturing days. After transfer of sphere-like structures into culturing medium, containing 10% FCS we observed their adherence to a surface and release of neurone-like cells within the following 2–3 days.

During culturing the cells obtained from cryopreserved adrenal fragments (frozen both with high and low cooling rates) to the 3rd day we found single living cells, floating in the medium, as well as adhered ones, but not flattened. In these cultures no proliferation and formation of monolayer took place.

Thus, the PCC of newborn pig adrenal glands as the monolayer may be obtained from native tissue fragments. After cryopreservation of the fragments with both high and low cooling rates no formation of monolayer was observed. Probably it was the consequence of combined action of cryodamage factors and enzymatic processing. In addition, when lowering the concentration of FCS in culturing medium, the newborn pig adrenal PCC obtained from native fragments gave the formation of spheric cell colonies, and following release of the cells morphologically different from primary monolayer cells.