

© И. В. Тамарина, Т. П. Бондаренко

УДК 57. 043:612. 4

**И. В. Тамарина, Т. П. Бондаренко**

## **КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ЭНДОКРИННЫХ ОРГАНОВ**

**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины**

**(г. Харьков)**

Данная работа является фрагментом НИР «Структурно-функціональні властивості та проліферативний потенціал ендокринних тканин при культивуванні, криоконсервуванні та трансплантації», шифр 2.2.6.64.

Проблема трансплантации желез внутренней секреции с целью лечения эндокринной недостаточности, не утратила своей актуальности и сегодня, так как потеря функции этих органов вызывает ряд серьезных нарушений в организме. Применение методов заместительной терапии ограничено узким спектром биологических эффектов на организм. Такая терапия приводит лишь к частичной компенсации гормональной недостаточности, а также часто сопровождается развитием невосприимчивости к вводимым извне гормонам, возникновением побочных реакций, необходимостью систематического введения гормонов и невозможностью постоянно осуществлять регуляцию метаболизма в соответствии с биологическими потребностями организма в каждый конкретный период времени. Низкотемпературные технологии, как метод долгосрочного хранения, обеспечивают необходимым количеством доступного, функционально активного материала для трансплантации. Особенностью трансплантации эндокринных структур является возможность их пересадки в виде его фрагмента либо отдельных клеток [5].

В связи с эти разработка протоколов криоконсервирования клеток и тканей эндокринных органов, что обеспечивает доступность трансплантационного материала с высокими показателями функциональной активности и жизнеспособности и служит для минимизации повреждений, связанных с изменениями осмотического давления, кристаллообразованием, ишемией, является актуальной проблемой современной биологии и медицины. Эффективность процесса криоконсервирования связана с оптимизацией скоростей охлаждения и отогрева, состава криозащитных сред, времени экспозиции с криопротекторами в зависимости от структуры ткани или клеточного состава образца. На результат криоконсервирования так же оказывает влияние размер клеток, особенности их биохимического состава, плотность упаковки, а также количество межклеточных контактов в случае криоконсервирования фрагментов тканей. В литературе широко представлены способы криоконсервирования клеток и тканей щитовидной, паращитовидной, поджелудочной желез, яичников, надпочечников и семенников с использованием в качестве криопротектора

диметилсульфоксида (ДМСО) и различных скоростей охлаждения для разного типа тканей.

**Щитовидная железа.** Ткань щитовидной железы включает в себя ряд популяций клеток, различных по своему происхождению и выполняемым функциям. Тироциты, формирующие фолликулярные структуры, заполненные тиреоглобулином, и являющиеся основным клеточным компонентом щитовидной железы, представляют собой эпителиальные клетки, функция которых заключается в биосинтезе и секреции тироксина. В цитоплазме тироцитов хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть и элементы комплекса Гольджи [6]. Парафолликулярные клетки, кальцитониноциты, или С-клетки составляют 0,1% от всех клеток щитовидной железы и являются производными клеток нервного гребня. Единичные клетки расположены между основанием тироцитов и базальной мембраной фолликулов. В цитоплазме хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть, элементы комплекса Гольджи. Парафолликулярные клетки синтезируют гормон кальцитонин. Оксифильные клетки, или клетки Ашкенази–Гюртле, отличаются от фолликулярного эпителия большей величиной, эозинофильной гранулированной цитоплазмой, данные клетки секретируют биогенные амины, в том числе серотонин. Пространство между фолликулами содержит ретикулярные волокна, а так же значительное количество кровеносных и лимфатических сосудов, что обогащает клеточную культуру эндотелиальными клетками и фибробластами [6]. Наличие белкового коллоида, соединительнотканной капсулы, высокое содержание липидов говорят в пользу низкого содержания воды в фолликуле, что, по всей видимости, и обеспечивает более высокую криоустойчивость тканей щитовидной железы [3].

В литературе обсуждаются протоколы криоконсервирования клеточной суспензии, фрагментов ткани и фолликулярной фракции щитовидной железы, так как именно фолликул является основной функциональной единицей данного органа.

Китamura с соавторами [24] утверждают, что оптимальными для криоконсервирования являются фрагменты щитовидной железы, объемом 1 мм<sup>3</sup>, помещенные в раствор, содержащий 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 10% ДМСО, с использованием медленных скоростей охлаждения до -80°C, с предварительной инкубацией при 4°C в течение 1 часа. Количество жизнеспособных клеток при использовании данного подхода составляет 1.24-2.03 (1. 71 ± 0. 40) × 10<sup>6</sup>/0.1 г ткани.

В работе Билявской с соавторами [1] обсуждается эффективность применения различных составов криозащитных сред для криоконсервирования суспензий клеток, полученных из фолликулярной и клеточной фракций щитовидной железы после культивирования, при использовании скорости охлаждения  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Так, авторами было показано, что наиболее высокая жизнеспособность для образцов фолликулярной фракции (65–80%) была обнаружена в случае их криоконсервирования в присутствии в средах 15% ДМСО как при наличии 25% сыворотки, так и без нее. Для культур из клеточной фракции, лучшие показатели жизнеспособности клеток имели место при использовании сред, включающих 10% ДМСО и сыворотку, когда данный показатель составлял 89,82%. По мнению авторов данной работы [1] эффективность более высокой концентрации ДМСО для фолликулярной фракции связана с тем, что сохраненные межклеточные связи замедляют насыщение кластера криопротектором.

**Паращитовидные железы.** Наиболее многочисленными клетками паращитовидной железы являются паренхимальные клетки, делящиеся на 2 типа – базофильные и оксифильные паратироциты. Базофильные паратироциты являются функционально активными. Это небольшие клетки с незначительно гранулированной цитоплазмой и образующие линейные структуры. Оксифильные паратироциты являются функционально не активными. Они имеют небольшое темное ядро, ацидофильную цитоплазму и образуют шарообразные структуры, состоящие из нескольких клеток. Межклеточное пространство содержит ретикулярные волокна, а также значительное количество кровеносных сосудов [6].

Для криоконсервирования фрагментов паращитовидных желез объемом в  $1\text{ мм}^3$  в литературе обсуждаются криозащитные среды, основным компонентом которых выступает раствор RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 [18,27,36], концентрация которого варьируется от 0 до 80%, а скорость охлаждения составляет  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Другие авторы предлагают использовать в качестве добавок 2мМ глутамин [19]. Обсуждаемые концентрации ДМСО в одних следованиях варьируются от 7,5 до 20% [11], а в других указывается лишь одна 10% концентрация [18]. Кроме того, в качестве необходимого компонента среды криоконсервирования называется либо 10-30% аутологическая сыворотка [12, 18, 31, 36], либо 10-20% фетальная телячья сыворотка (ФТС) [19, 27]. В случаях, когда не используется раствор RPMI, в состав среды консервирования рекомендуется вводить 90% ФТС [17].

Исследования таких показателей как жизнеспособность и функциональная активность клеток до и после криоконсервирования не выявили достоверных различий. Однако, при использовании в качестве компонентов криозащитной среды 10% ДМСО и 10% ФТС [36] было показано значительное сокращение количества клеток до  $>70\%$ . В этой же работе установлено, что снижение общего числа

клеток характерно как для криоконсервированных фрагментов, так и для суспензий клеток [13].

Коэн с соавторами [13], использовавшие в качестве компонентов криозащитной среды 60% RPMI, 10% ДМСО и 30% аутологичную сыворотку, указывают что функциональная активность и жизнеспособность клеток напрямую связаны с временем хранения образцов при  $-196^{\circ}\text{C}$ . Значения обоих показателей значительно уменьшились при хранении образцов более 22-х месяцев. Используемые скорости охлаждения в данных экспериментах составляли  $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот [17].

**Надпочечники.** Коровое вещество надпочечника лежит снаружи мозгового вещества, состоит из тяжей, различают три зоны: клубочковую, пучковую и сетчатую.

Клубочковая зона построена из мелких секреторных клеток, преимущественно цилиндрической формы. Клетки содержат округлое ядро с более конденсированным хроматином и умеренно развитыми нитчатыми митохондриями, комплексом Гольджи, одичными рибосомами и полисомами. Большее развитие имеет агранулярная эндоплазматическая сеть в связи с синтезом гормонов стероидного типа [6].

В клубочковой зоне расположены крупные гормонсинтезирующие клетки.

Пучковая зона представлена более крупными полигональными железистыми клетками. Клетки этой зоны образуют радиально ориентированные тяжи, между которыми проходят прослойки соединительной ткани с синусоидными капиллярами. В цитоплазме клеток хорошо развиты гладкая эндоплазматическая сеть, пузырьчатые митохондрии с пластинчатой формой крист, лежащих вдоль или перпендикулярно продольной оси митохондрий. Клетки очень богаты липидами.

Для сетчатой зоны характерны анастомозы и переплетения ее клеточных тяжей. Клетки бедны липидами. Хорошо развиты гладкая эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи; имеются рибосомы.

Мозговое вещество расположено в центральной части надпочечника. В его состав входят хромоаффинные клетки, симпатические нейроны, большое количество нервных волокон и синусоидных капилляров.

Хромааффинные клетки многоугольной формы, размер их до 30 мкм. Клетки группируются в тяжи. Между ними проходят синусоидные капилляры, образующие обширные сплетения. В хромоаффинных клетках слабо развиты гранулярная эндоплазматическая сеть, митохондрии [6].

На сегодняшний день в ИПКиК НАН Украины разработан режим криоконсервирования органо-типической культуры надпочечников [8], который заключается в эквilibрации фрагментов ткани в присутствии 10% ДМСО при температуре  $21-22^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут и последующим замораживанием с неконтролируемой высокой скоростью. Наряду с этим существует и режим криоконсервирования для суспензии клеток надпочечников новорожденных

поросят [7], заключающийся в использовании в качестве криопротектора 5% концентрацию ДМСО и скорости охлаждения на первом этапе 1-3°С/мин до -70,5°С с последующим погружением в жидкий азот. Имеются также экспериментальные данные по криоконсервированию клеток медуллярной зоны фетальных надпочечников человека с использованием 10% концентрации ДМСО и 10% концентрации ФТС. Согласно данному протоколу жизнеспособность клеток после отогрева составляет более 90% [32]. Поимом этого, известен протокол криоконсервирования для суспензии клеток надпочечников взрослых крыс [4]. Установлено, что наибольшее количество жизнеспособных клеток (50-55%) получается при использовании 7% концентрации ДМСО и скорости охлаждения 1°С/мин. Было также показано, что более высокие скорости охлаждения оказывают криоселективное действие на суспензию клеток. Так, охлаждение со скоростью 10°С/мин приводит к увеличению в суспензии клеток доли стероидпродуцирующих клеток, а использование скорости охлаждения 15°С/мин сопровождается увеличением доли хромоафинных клеток [4]. Об успешном замораживании кластеров из клеток медулы надпочечников человека в присутствии 10% концентрации ДМСО свидетельствуют данные, представленные в работе [32].

**Островки Лангерганса.** Островки построены из инсулярных клеток и обильно снабжены капиллярной сетью, расположенные в соединительнотканной строме поджелудочной железы. Инсулярные клетки – небольшие, светлые с нежной цитоплазмой клетки, в которых хорошо развит комплекс Гольджи; содержатся мелкие митохондрии и секреторные гранулы. Гранулярная эндоплазматическая сеть представлена значительно хуже.

Среди инсулярных различают А-, В-, Д-, Д-1- и РР-клетки. Классификация их основана на морфофункциональной характеристике секреторных гранул. В-клетки составляют около 70% всех клеток, и располагаются в центре островка. А-клетки составляют от 10 до 20% всех клеток, и располагаются по периферии островка. Д- клетки составляют от 5 до 10% всех клеток островка, расположены периферически. Д-1 и РР клетки представлены в доле нескольких процентов, расположены диффузно [6].

Высокое содержание липидов, фолликулярное строение обеспечивают значительную криоустойчивость данной ткани. Замораживанию подвергают как фрагменты железы, так и островки Лангерганса, выделенные ферментативно. Относительно протоколов замораживания – используют как обычное замораживание со скоростями от 0,25 до 75°С/мин в присутствии 2,5-15% концентрации ДМСО [35] так и витрификацию [29]. Показано [25], что изолированные островки способны переносить высокие концентрации ДМСО, вплоть до 30%, что и делает возможным использование для них процедуры витрификации. Райотте с соавторами [30] предложили протокол, ставший классическим, для криоконсервирования фрагментов и суспензии островков.

Суть метода заключается в поэтапном увеличении концентрации ДМСО в пробе до 15% при комнатной температуре, с последующим охлаждением образца до -40°С со скоростью 0,25-1°С/мин, с различным временем экспозиции для тканевых фрагментов и островков. Различные модификации этого протокола касаются либо увеличению скорости замораживания, либо уменьшению концентрации криопротектора, либо изменению времени экспозиции с криопротектором. Примечательно, что для успешного криоконсервирования в состав сред не входили ни сыворотка, ни альбумин. Кэмп с соавторами отмечали 50% сохранение жизнеспособности клеток после криоконсервирования. Согласно данному протоколу, добавление криопротектора осуществлялось одноступенчатым добавлением 10% ДМСО при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение 60 минут [22]. Высокие концентрации ДМСО являются чрезвычайно токсичными для тканей поджелудочной железы в условиях длительной инкубации при комнатной температуре [25]. Однако, если инкубацию производить при 0°С, как показано в работе Райотте и Мазур [26], то его цитотоксичное действие становится незначительным. Протокол, использующий двухступенчатое добавление ДМСО к эксплантатам фетальной поджелудочной железы человека, свидетельствует Шюгама с соавторами [33], о 80% восстановлении возбудимости в ответ на стимуляцию высокими дозами глюкозы и теофилина. Используя трехступенчатый протокол добавления ДМСО к фетальным клеткам поджелудочной железы человека, было получено 100% восстановление возбудимости, высвобождение инсулина в ответ на стимуляцию высокими дозами глюкозы с теофилином. Так же, трансплантация фрагментов, замороженных по данному протоколу, привела к компенсации диабета у опытных мышей BALB/c nu/numice [20].

**Клетки интерстиция семенников.** Основной структурно-функциональной единицей яичка является извитой сменной каналец. Стенка его состоит из соединительнотканной оболочки, в которой выделяют внутреннюю базальную мембрану с клетками герменативного эпителия, между которыми от основания до просвета каналцев находятся пирамидальные клетки Сертоли. В соединительной ткани, разделяющей извитые семенные каналцы, вкраплены группами полигональные клетки Лейдига, всю совокупность которых иногда обозначают термином интерстициальная железа, связывая с ней внутрисекреторную активность семенника [6].

Клетки Лейдига содержат хорошо развитую эндоплазматическую сеть, а также многочисленные митохондрии чашечковидной формы, большей частью с трубчатыми кристами [2]. В их цитоплазме много включений – жировых, белковых и гликогенных капель, что говорит об участии клеток Лейдига в стероидогенезе [6].

В работе [21] показана способность к сперматогенезу после ксенотрансплантации криоконсервированных фрагментов семенников неполовозрелых

приматов. Криоконсервирование фрагментов в случае использования 10% ДМСО со скоростью 0,5°С/мин. Высокие показатели жизнеспособности были получены и при использовании в качестве криопротектора ДМСО в его 10%-ой концентрации при замораживании фрагментов семенников, полученных из новорожденных крыс и телят [15]. Замораживание осуществлялось со скоростью 1°С/мин. Использование быстрого отогрева при данном режиме охлаждения показало высокую функциональную активность препаратов. В работе [23] показано, что использование в качестве криопротектора ДМСО концентрации 5% сохраняет морфологию клеток Лейдига и их способность к синтезу тестостерона в культуре после криоконсервирования. В ряде работ [14, 34] показана возможность криоконсервирования клеток Лейдига крыс при использовании в качестве криопротектора разные концентрации ДМСО и скорости 1°С/мин до -70°С. Была показана способность клеток к синтезу тестостерона *in vitro* в ответ на ЛГ [14] и ХГ [34].

Овариальная ткань. Яичник окружен белочной оболочкой. Под капсулой расположены корковая и мозговая слои. В корковом слое у женщин детородного возраста содержатся фолликулы разной степени зрелости – примордиальных фолликулов, представляющих собой яйцеклетку, окруженную плоскими эпителиальными клетками и соединительнотканной оболочкой, до зрелых преовуляторных фолликулов, крупных фолликулов диам. 20-22 мм, имеющих полость, заполненную и высланную изнутри гранулезными клетками. Функциональная единица яичника – фолликул, состоящий из нескольких типов соматических клеток – клеток гранулы, кумулюса, теки и половой клетки – ооцита, отличающиеся между собой объемом, размером и проницаемостью мембраны [6].

В работе Госден с соавт. [16] обсуждается протокол низкотемпературного консервирования под защитой ДМСО для овариальной ткани овцы. Забор ткани проводили лапароскопически, после чего ткань измельчалась на фрагменты размером целого яичника или его кортикального слоя 1 мм<sup>2</sup>. Эквilibрация фрагментов в физиологическом растворе в присутствии 10% ДМСО и 10% ФТС производили в течение 15 мин при 4°С. Программное замораживание осуществляли со следующими скоростями охлаждения: до -9°С со скоростью 2°С/мин, затем до -40°С со скоростью 0,3°С/мин и со скоростью 10°С/мин до -140°С с последующим погружением в жидкий азот. Последующая аутоотрансплантация данной

криоконсервированной овариальной ткани привела к рождению потомства. Окай и соавт. [28] для криоконсервирования овариальной ткани человека в среду криоконсервирования (10% ДМСО) вводили 0,1 М концентрацию сахарозы и увеличивали время эквilibрации до 30 мин при 4°С. Такой подход позволил получить лишь незначительное число первичных фолликулов. Для яйцеклеток, как правило, используют витрифицирующие растворы, высокие скорости размораживания и отогрева.

Заключение. Подводя итог выше сказанному, можно сделать вывод о том, что ДМСО является наиболее эффективным криопротектором для тканей и клеток эндокринных желез. Для каждой эндокринной ткани существуют свои оптимальные концентрации, которые в значительной мере определяются особенностями их структуры. Так, например, ткани, содержащие многоклеточные структуры (щитовидная, поджелудочная железы) хорошо переносят высокие концентрации ДМСО (15-20%) [1;25] при использовании низких скоростях охлаждения (0,3 – 1°С/мин). В то время, как для клеточных суспензий щитовидной, парашитовидной желез, надпочечников, семенников используются более низкие концентрации криопротектора, порядка 5-10% [1,7,14,22] что связано с более быстрым насыщением одноклеточных структур во время их эквilibрации с криопротектором. Скорости замораживания и в этом случае низкие и составляют 0,5-1°С/мин до -70-80°С. Исключением из этого являются паратироциты и овоциты, для которых, как правило, используют протоколы витрификации. Использование этапного замораживания с различными скоростями охлаждения в различных температурных интервалах может повысить эффективность криоконсервирования, что было показано на клетках семенников в работе [10]. Однако использование метода ограничено доступностью программных замораживателей, позволяющих изменять режимы охлаждения на этапе замораживания.

Что касается режимов криоконсервирования для органотипических культур, то наблюдается тенденция к использованию для фрагментов тканей 10% концентрации ДМСО [8,9,15,16,24] и скоростей охлаждения 0,3-5°С/мин [10,35], с 1°С/мин, [15,16,24], особенно в интервалах температур от 0 до -40°С, где происходит кристаллизация большей части воды в образцах. Использование сравнительно низких скоростей охлаждения оправдано для криоконсервирования фрагментов ткани, так как вызвано необходимостью сохранить структуру.

### Література

1. Билявская С. Б. Криоконсервирование первичной культуры тироцитов новорожденных поросят/ С. Б. Билявская, В. Д. Устиченко, Г. А. Божок [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 1 – С. 68-74.
2. Волкова О. В. Эмбриогенез и возрастная гистология внутренних органов человека / О. В. Волкова, М. И. Пекарский. – М.: «Медицина», 1972. – 472 с.
3. Волкова Н. О. Криоконсервовані органи культури щитовидної залози при ало- та ксенотрансплантації : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня к. біол. н.: спец. 03. 00. 09 «Криобіологія» / Н. О. Волкова. – Харків, 2004. – 25 с.
4. Дудецкая Г. В. Влияние скорости охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс / Г. В. Дудецкая, Г. А. Божок, Т. П. Бондаренко // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 379-387.

## ОГЛЯДИ ЛІТЕРАТУРИ

5. Мирский М. Б. Трансплантация и искусственные органы / М. Б. Мирский. – М., 1984. – С. 45-48.
6. Хэм А. Гистология: В 5-ти т. / А. Хэм, Д. Кормак // Пер. с англ. под ред. Афанасьева Ю. И., Ченцова Ю. С. – М.: Мир, 1983.
7. Патент № 34848 А Украина, МПК<sup>6</sup> С12N5/02 Способ криоконсервирования культуры клеток адренокортикальной ткани / Т. П. Бондаренко, Е. И. Легач; заявитель и патентообладатель Харьковский ИПКиК НАН Украины. – №99073996; заявл. 09. 12. 99;опубл 15. 03. 01, Бюл. № 2.
8. Патент № 4567, МПК<sup>7</sup>. №12N5/08 A01N1/02. Спосіб криоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят. Заявл. 07. 06. 2004. Опубл. 17. 01. 05. Бюл. №1 / Gurina T. M., Alabedal'karim N. M., Ustichenko V. D., Bondarenko T. P. Patent Ukrainy № 4567, МПК<sup>7</sup>, №12N5/08 A01N1/02. Sposib kriokonservuvannya organnoi kul'tury nadnyrkovykh zaloz novonarodzhenykh porosyat. Zayavl. 07. 06. 2004. Opubl. 17. 01. 05. Byul. №1/4. – 464 s.
9. Патент № 9367 А Украина, МПК<sup>7</sup> A01N1/02. Способ криоконсервирования органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят / Бондаренко Т. П., Легач Е. И., Божок Г. А., Алабедалькарим Н. М., заявитель и патентообладатель Харьковский ИПКиК НАН Украины. – №200502813; заявл. 28. 03. 05;опубл 15. 09. 05, Бюл. № 9].
10. Патент № 80497 А Украина, МПК<sup>7</sup> A01N1/02. Способ криоконсервирования орган отипической культуры семенников новорожденных поросят / Божок Г. А., Легач Е. И., Гурина Т. М., Губина Н. Ф., Бондаренко Т. П., заявитель и патентообладатель Харьковский ИПКиК НАН Украины. – №200604455; заявл. 20. 04. 06;опубл 25. 09. 07, Бюл № 15.
11. Borot S. Results of cryopreserved parathyroid autografts: a retrospective multicenter study / S. Borot, V. Lapiere, B. Carnaille [et al.] // Surgery. – 2010. – Vol. 147, № 4. – P. 529–535.
12. Brennan M. Human parathyroid cryopreservation: in vitro testing of function by parathyroid hormone release / M. Brennan, E. Brown, H. Sears [et al.] // Annals of Surgery. – 1978. – Vol. 187, №. 1. – P. 87–90.
13. Cohen M. Long-term functionality of cryopreserved parathyroid autografts: a 13-year prospective analysis / M. Cohen, W. Dilley, S. Wells Jr [et al.] //Surgery. – 2005. – Vol. 138, № 6. – P. 1033–1041.
14. Chen G. Development of a cryopreservation protocol for Leydig cell / G. Chen, R. Ge , H. Lin // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22, № 8. – P. 2160- 2168.
15. Donahoe P. The preservation of Mullerian inhibiting substance during long-term freezing of testicular fragments / P. Donahoe, Y. Ito, W. Hendren // Cryobiology. – 1977. – Vol. 14, № 5. – P. 534-542.
16. Gosden R. G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue / R. G. Gosden // Mol. Cell. Endocrinol. – 2000. – Vol. 163. – P. 125–129.
17. Guerrero M. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated / M. Guerrero, D. Evans, J. Lee [et al.] // World Journal of Surgery. – 2008. – Vol. 32, № 5. – P. 836–839.
18. Herrera M. Parathyroid autotransplantation / M. Herrera, C. Grant, J. Van Heerden [et al.] // Archives of Surgery. – 1992. – Vol. 127, № 7. – P. 825–830.
19. Herrera M. The effect of cryopreservation on cell viability and hormone secretion in human parathyroid tissue / M. Herrera, C. Grant, J. Van Heerden [et al.] // Surgery. – 1992. – Vol. 112, № 6. – P. 1096–1102.
20. Hullett D. Successful long-term cryopreservation and transplantation of human fetal pancreas / D. Hullett, K. Bethke, A. Landry [et al.] // Diabetes. – 1989. -- Vol. 38, № 4. – P. 448-453.
21. Jahnukainen K. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts / K. Jahnukainen, J. Ehmcke, S. Hergenrother // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22, № 4. – P. 1060-1067.
22. Kemp J. Recovery and function of human fetal pancreas frozen to -196°C / J. Kemp, S. Hurt, J. Brown // Transplantation. – 1981. – Vol. 32. – P. 10-15.
23. Keros V. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment / V. Keros, K. Hultenby, B. Borgstrum // Hum. Reprod. – 2007. – Vol 22, № 5. – P. 1384- 1395.
24. Kitamura Y. Cryopreservation of thyroid pieces--optimal freezing condition and recovery / Y. Kitamura, K. Shimizu, M. Nagahama // Nihon Geka Gakkai Zasshi. – 1994. – Vol. 95, № 1. – P. 14-20.
25. Mazur P. Principles of Cryobiology. In: Fuller B. J., Lane N., Benson E., editors / P. Mazur // Life in the Frozen State. – Boca Raton : CRC Press; 2004. – P. 3–65.
26. Mazur P. // Permeability of the 17-day fetal rat pancreas to glycerol and dimethyl-sulfoxide / P. Mazur, R. Rajotte // Cryobiology. – 1981. – Vol. 18. – P. 1-16.
27. McHenry C. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function / C. McHenry, D. Stenger, N. Calandro // American Journal of Surgery. – 1997. – Vol. 174, №. 5. – P. 481–484.
28. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients / K. Oktay // Hum. Reprod. Update. – 2001. –Vol. 7, №6. – P. 526–534.
29. Rall W. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification / W. Rall // Cryobiology. – 1987. – Vol. 24, № 387. – P. 402-408.
30. Rajotte R. Transplantation of cryopreserved and fresh rat islets and canine pancreatic fragments: comparison of cryopreservation protocols / R. Rajotte, G. Warnock, L. Bruch [et al.] // Cryobiology. – 1983. – Vol. 20. – P. 169-184.
31. Saxe A. Deferred parathyroid autografts with cryopreserved tissue after reoperative parathyroid surgery / A. Saxe, A. Spiegel, S. Marx // Archives of Surgery. – 1982. – Vol. 117, №. 5. – P. 538–543.
32. Silani V. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells / V. Silani, A. Pizzuti, O. Strada [et al.] // Brain Res. – 1988. – Vol. 28, №454 (1–2). – P. 383–386.
33. Shiogama T. Improved cryopreservation procedure for human fetal pancreas tissues / T. Shiogama, Y. Mullen, H. Klandorf [et al.] // Transplantation. – 1987. – Vol. 44. – P. 602-607.
34. Tai J. Cryopresrvation of rat Leydig cells for in vitro and in vivo studies / J. Tai, W. Tze, H. Johnson // Horm. Metab. Res. – 1994. – Vol. 26, № 3. – P. 146-147.
35. Taylor M. Review of vitreous islet cryopreservation / M. Taylor, S. Baicu // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 155-166.
36. Wagner P. Replantation of cryopreserved human parathyroid tissue / P. Wagner, H. Seesko, M. Rothmund //World Journal of Surgery. – 1991. – Vol. 15, № 6. – P. 751–755.

УДК 57. 043:612. 4

### КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТКАНИН ТА КЛІТИН ЕНДОКРИННИХ ОРГАНІВ

Тамарина І. В., Бондаренко Т. П.

**Резюме.** У статті розглянуто режими кріоконсервування для тканин та клітин щитоподібної, паращитоподібної, підшлункової залоз, наднирників, оваріальної тканини та сім'яників з використанням ДМСО. Різниця в оптимальних концентраціях ДМСО та швидкостях охолодження для різних ендокринних тканин обумовлена морфологічними особливостями будови цих тканин та біохімічним складом їх клітин. Використання програм ступінчатого заморожування дозволяє знизити необхідну концентрацію кріопротектора, яка дозволяє зберегти морфологічні та функціональні характеристики кріоконсервованого матеріалу.

**Ключові слова:** ендокринні тканини, кріопротектори, режими кріоконсервування.

УДК 57. 043:612. 4

### КРІОКОНСЕРВИРОВАНИЕ КЛЕТКИ И ТКАНЕЙ ЭНДОКРИННЫХ ОРГАНОВ

Тамарина И. В., Бондаренко Т. П.

**Резюме.** В статье рассмотрены режимы криоконсервирования для тканей и клеток щитовидной, паращитовидной, поджелудочной желез, надпочечников, овариальной ткани и семенников с использованием ДМСО. Различия в оптимальных концентрациях ДМСО и скоростях охлаждения для разных эндокринных тканей обусловлены морфологическими особенностями строения этих тканей и биохимическим составом их клеток. Использование программ ступенчатого замораживания позволяет снизить необходимую концентрацию криопротектора, обеспечивающего сохранение морфологических и функциональных характеристик криоконсервированного эндокринного материала.

**Ключевые слова:** эндокринные ткани, криопротекторы, режимы замораживания.

UDC 57. 043:612. 4

### Endocrine Tissue and Cell Cryopreservation

Tamarina I. V., Bondarenko T. P.

**Abstract.** Endocrine gland transplantation in order to cure endocrine insufficiencies of different origins is still up to date, because loss of these organs function leads to range of severe malignant states. Application of hormonal therapy is limited by narrow range of biological effects on the organism.

Technology for low temperature preservation, as a method for long termed storage, provides us with sufficient quantity of disposable, functionally active material for transplantation. Endocrine glands might be transplanted as tissue fragments or cell suspension.

For these reasons development of the cryopreservation protocols for endocrine cells and tissues cryopreservation which ensures accessible transplantation material with high meanings for functional activity and recovery. Optimization of protocols allows minimizing cell injuries, conducted with changes in osmotic pressure, crystals growing, ischemia and is one of the most fundamental subjects in present-day cryobiology and cryomedicine.

Cryopreservation process effectiveness depends on optimization of the cooling and heating rates, composition of the cryoprotective media; time used for equilibration with cryoprotector agent, which correlates with tissue architecture, cell types in its structure.

Cryopreservation effectiveness is also affected by size of the cell, its biochemical compounds; density and quantity of cell-cell contacts in tissue fragments are being preserved. Cryopreservation regimens for thyroid, parathyroid, pancreatic, adrenal glands, ovarian and testicular tissues and cells including DMSO in different concentrations and different cooling rates are an object of current work.

DMSO is known as most widely used and effective cryoprotectants for different organs including endocrine organs. For every endocrine tissue there are specific concentrations of DMSO which are defined mostly by their morphology features. Differences in optimal DMSO concentrations and cooling rates for different endocrine glands explained by differences in their morphology and cells biochemical composition. As an example, a tissue, which contains multicellular structures (thyroid, pancreatic glands) might be cryopreserved in media, containing high DMSO concentrations, such as 15-20% under slow cooling rates 0,3 – 1°C/min. At the same time for cell suspensions of thyroid, parathyroid, adrenal glands and testis lower and more commonly used DMSO concentrations 5-10% are allied, which relates to single cell increased accessibility for cryoprotector agent during their equilibration. Cooling rates seem to stay low for these endocrine tissue cell suspensions and are 0,5 to 1°C/min up to -70-80°C. Exceptions are parathyroids and ovary cells, these are usually cryopreserved by vitrification with much higher cryoprotector agents' concentrations and cooling rates.

Different freezing speeds for different temperature intervals, also known as step freezing protocols, used for cryopreservation of testis cell suspension, proved to be effective. Step freezing protocols allows to lower cryoprotectant concentration but provides preservation of endocrine materials morphological and functional characteristics. But pervasiveness of this method is limited by accessibility of programmable freezers, and their expensiveness.

**Key words:** endocrine tissue, cryoprotector agents, cryopreservation regimens.

*Рецензент – проф. Шепітько В. І.*

*Стаття надійшла 10. 10. 2013 р.*