

## Влияние криоконсервирования на функциональные характеристики органных культур щитовидной железы кроликов и новорожденных поросят

Н.А. Волкова, Н.М. Алабедалькарим, Г.А. Божок, Т.П. Бондаренко  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryopreservation Effect on Functional Characteristics of Thyroid Gland's Organ Cultures of Rabbits and Newborn Piglets

VOLKOVA N.A., ALABEDALKARIM N.M., BOZHOK G.A., BONDARENKO T.P.  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследованы биохимические и морфологические характеристики нативных и криоконсервированных органных культур щитовидной железы кроликов и новорожденных поросят (ОКЩЖК и ОКЩЖНП). Показано, что клетки ОКЩЖК более чувствительны к влиянию низкотемпературного консервирования. Установлено, что ОКЩЖНП после криоконсервирования сохраняет способность к репаративным процессам.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, органные культуры щитовидных желез, морфофункциональные характеристики.

Досліджено біохімічні та морфологічні характеристики нативних і криоконсервованих органичних культур щитовидних залоз кроликів і новонароджених поросят (ОКЖЗК і ОКЩЗНП). Показано, що клітини ОКЩЗК більш чутливі до впливу низькотемпературного консервування. Встановлено, що ОКЩЗНП після криоконсервування зберігає здатність до репаративних процесів.

**Ключові слова:** криоконсервування, органічні культури щитовидних залоз, морфофункціональні характеристики.

Biochemical and morphological properties of native and cryopreserved organ cultures of thyroid gland of rabbits (OCThGR) and newborn piglets (OCThGNP) were investigated. The OCThGR cells were shown to be more sensitive to the effect of low temperature preservation. It was established, that the OCThGNP kept the capability to reparative processes after cryopreservation.

**Key words:** cryopreservation, thyroid glands' organ cultures, morphofunctional characteristics.

Алло- и ксенотрансплантации криоконсервированного эндокринного материала являются перспективным направлением в лечении гормональных недостаточностей различной этиологии [3,10,11]. Однако вопрос влияния низкотемпературного консервирования на органный культуру щитовидной железы (ОКЩЖ) доноров разного возраста и отдаленного филогенетического родства изучен недостаточно.

Как известно, при криоконсервировании могут повреждаться внутриклеточные структуры, что вызывает изменение функциональных характеристик биологических объектов. Сохранившиеся после замораживания-отогрева клетки обладают всем спектром свойств, присущим им до криовоздействия [2,9]. Хранение биообъектов при низких положительных температурах приводит к активизации внутриклеточных процессов [2,3,11].

Поскольку вопрос о функциональном состоянии криоконсервированного материала перед трансплантацией экспериментальным животным является актуальным, нами были проведены исследования по изучению влияния режимов

Allo- and xenotransplantations of cryopreserved endocrine material are a perspective direction in treating the hormonal insufficiencies of different etiology [3, 10, 11]. However the question about the effect of low temperature preservation on organ culture of thyroid gland (OCThG) of donors of different age and phylogenetic affinity is poorly studied.

As it is known, the intracellular structures can be damaged during cryopreservation, that results in a change of functional characteristics of biological objects. The cells, being kept after freeze-thawing have all the spectrum of properties, inherent to them before cryoeffect [2, 9]. The storage of bioobjects under low positive temperatures results in the activation of intracellular processes [2, 3, 11].

Since the question on functional state of cryopreserved material before transplantation to experimental animals is actual, we have carried-out the investigations on studying the effect of freeze-thawing regimens on OCThG functional characteristics of mature (3 months') rabbits and newborn (one day) piglets.

**Адрес для корреспонденции:** Волкова Н.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7722007, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Volkova N.A. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722007, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

деконсервирования на функциональные характеристики ОКЩЖ половозрелых (3-месячных) кроликов и новорожденных (однодневных) поросят.

### Материалы и методы

ОКЩЖ получали методом органотипического культивирования [4]. Кримоконсервирование ОКЩЖ проводили по 2-этапной программе с использованием в качестве криопротектора 7%-го ДМСО [1]. Кримоконсервированный материал отогревали на водяной бане при 37°C с последующим отмывом от ДМСО средой 199. Часть образцов инкубировали в среде 199 на водяной бане при 37°C в течение часа (кримоконсервированная ОКЩЖ). Вторая часть образцов была подвергнута повторному культивированию (рекультивированная ОКЩЖ) при 37°C в течение 48 ч в условиях стерильного бокса с ежедневной сменой питательной среды (среда 199, содержащая 10%-ю эмбриональную телячью сыворотку). В полученных нативных и деконсервированных образцах ОКЩЖ методом суправитального окрашивания с использованием трипанового синего определяли уровень жизнеспособности. В гомогенатах нативных и деконсервированных культур определяли: с помощью наборов РИА-Т3, Т4-СТ содержание тиреоидных гормонов радиоиммунологическим методом; количество нуклеиновых кислот – методом фракционирования с последующей спектрофотометрией [7]; содержание белка – по методу Бредфорда [6]. Также был проведен гистологический анализ исследуемых образцов [5].

### Результаты и обсуждение

Морфологический анализ фрагментов ОКЩЖК и ОКЩЖНП показывает, что на 5-е сутки культивирования фрагменты обеих культур характеризуются однотипной морфоструктурой (рис. 1 и 2), отмечается сохранность гистоструктуры паренхимы фрагментов желез. Фолликулы в основном выстланы высоким кубическим эпителием и содержат бледноокрашенный коллоид, что свидетельствует об активном секреторном состоянии.

После кримоконсервирования отмечается сохранность морфологии паренхимы фрагментов ОКЩЖНП (рис. 3), однако содержащиеся в ней фолликулы были значительно уменьшены в размерах. При этом межфолликулярные пространства были расширены за счет клеточной дегидратации. Хуже переносят влияние низких температур фрагменты ОКЩЖК (рис. 4). Сохранившиеся в процессе кримоконсервирования фолликулы в центральной зоне фрагмента значительно уменьшены в объеме, содержат светло-

### Materials and methods

OCThG was procured using the method of organotypical culturing [4]. The OCThG cryopreservation was performed by two-stage program using 7% DMSO as a cryoprotectant [1]. Cryopreserved material was thawed on water bath at 37°C with following washing-out of DMSO with the medium 199. A part of samples was incubated in the medium 199 on water bath at 37°C during 1 hour (cryopreserved OCThG). The second part of samples was subjected to a repeated culturing (recultured OCThG) at 37°C during 48 hrs under sterile box conditions with daily change of nutrient medium (medium 199, containing 10% embryonic calf serum). In obtained native and frozen-thawed OCThG samples there was determined the level of viability using the method of trypan blue supravital staining. In homogenates of native and frozen-thawed cultures using the RIA-T3, T4-CT sets there were determined the content of thyroid hormones by radioimmunological method; the number of nucleic acids using the method of fractionation with following spectrophotometry [7]; the protein content was examined by the Bredford's method [6]. Histological analysis of studied samples was performed as well [5].

### Results and Discussion

Morphological analysis of OCThGR and OCThGNP fragments shows, that by the 5<sup>th</sup> day of culturing the fragments of both cultures are characterised by similar morphostructure (Fig. 1 and 2), the keeping of parenchyma histostructure of glands' fragments is noted. Follicles are mostly covered with a high cubical epithelium and contain a pale-stained colloid, what testifies to an active secretory state.

After cryopreservation the integrity of parenchyma morphology of OCThGNP fragments is observed (Fig. 3), however, the follicles, it comprises, were considerably decreased in their sizes. At the same time

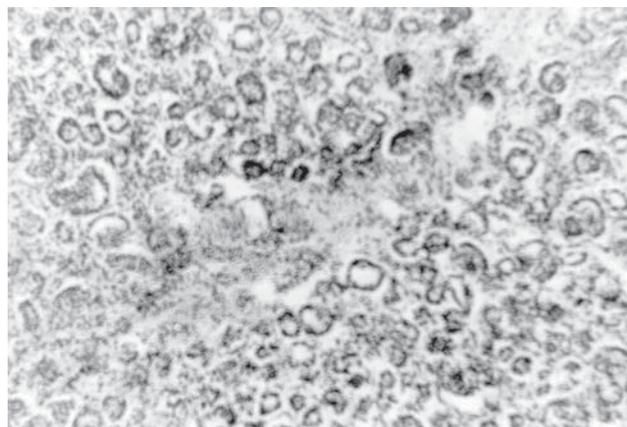
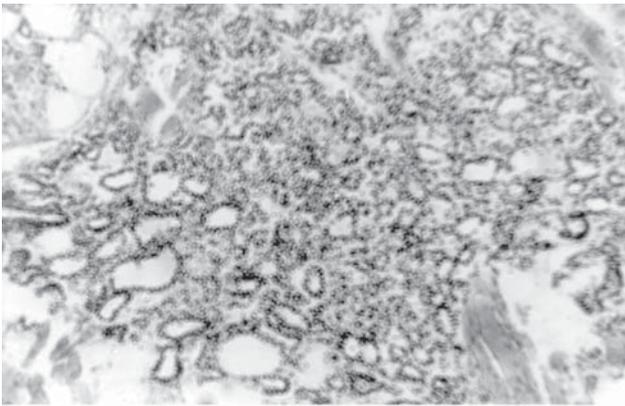


Рис. 1. Нативная 5-дневная ОКЩЖНП. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

Fig. 1. Native 5-days' OCThGNP. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .



**Рис. 2.** Нативная 5-дневная ОКЩЖК. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

**Fig. 2.** Native 5-days' OThGR. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .

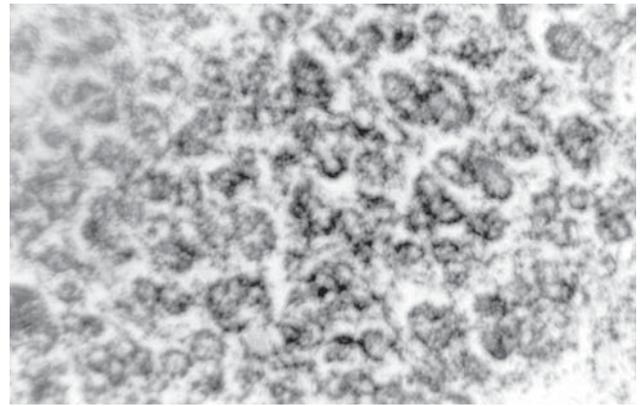
окрашенный коллоид, тогда как по краям фрагмента отмечаются пустоты, за счет чего и происходит сжатие центральной части фрагмента.

Таким образом, морфологические исследования деконсервированных образцов ОКЩЖК и ОКЩЖНП показали, что криоконсервирование по-разному влияет на морфологические характеристики исследуемых образцов.

Как видно из табл. 1, рекультивированная ОКЩЖ имеет более высокий процент жизнеспособных клеток по сравнению с криоконсервированными культурами. Клетки ОКЩЖНП характеризовались более высоким уровнем жизнеспособности по сравнению с клетками ОКЩЖК.

Анализ количественного изменения содержания белка в гомогенатах клеток нативных и криоконсервированных ОКЩЖ показал, что после отогрева и последующего рекультивирования в ОКЩЖК отмечается достоверное снижение содержания общего белка относительно нативного контроля на 57 и 69% соответственно. В криоконсервированной ОКЩЖНП после отогрева содержание белка увеличивалось на 16% относительно нативной ОКЩЖНП.

Содержание тиреоидных гормонов в гомогенатах криоконсервированной ОКЩЖК свидетельствовало о снижении уровня  $T_3$  и  $T_4$  на 65 и 40% соответственно относительно нативной ОКЩЖК. Последующее рекультивирование приводит к некоторой нормализации рассматриваемых показателей, увеличению уровня  $T_3$  на 33% и  $T_4$  на 25%, при этом данные показатели не достигали соответствующего нативного контроля. В криоконсервированной ОКЩЖНП наблюдается увеличение содержания  $T_3$  на 40%, а уровень  $T_4$  достоверно не отличался относительно нативной ОКЩЖНП. При этом последующее рекультивирование приводит к увеличению уровня  $T_3$  на 12% относительно нативной ОКЩЖНП.



**Рис. 3.** Криоконсервированная 5-дневная ОКЩЖНП. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

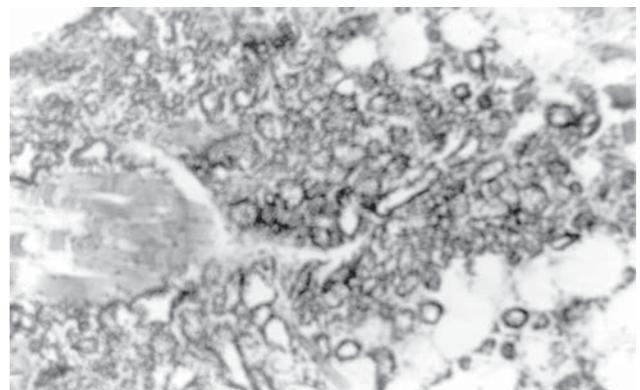
**Fig. 3.** Cryopreserved 5-days' OThGNP. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .

the interfollicular spaces were extended due to a cellular dehydration. The OThGR fragments endure worse the low temperature effect (Fig. 4). The follicles, being kept during cryopreservation in the fragment's central zone are considerably reduced in volume, contain a lightly-stained colloid, meanwhile at the fragment's edges the large emptiness are noted, due to which the compression of the fragment's central part occurs.

Thus, the morphological studies of OThGR and OThGNP frozen-thawed samples show, that cryopreservation affects in a different way morphological characteristics of studied samples.

The Table 1 shows, that the recultured OThG has higher percentage of viable cells in comparison with the cryopreserved cultures. The OThGNP cells were characterised by a higher level of viability in comparison with the OThGR cells.

The analysis of a quantitative change of protein content in cell homogenates of native and cryopreserved OThG demonstrated, that after thawing and following reculturing, a considerable and true decrease by 57 and 69% correspondingly in total protein content in respect of the native control was noted in



**Рис. 4.** Криоконсервированная 5-дневная ОКЩЖК. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

**Fig. 4.** Cryopreserved 5-days' OThGR. Staining with hematoxylin and eosin,  $\times 100$ .

**Таблица 1.** Функциональные характеристики нативных и криоконсервированных органных культур, полученных из щитовидных желез кроликов и новорожденных поросят

**Table 1.** Functional characteristics of native and cryopreserved organ cultures, obtained from rabbits and newborn piglets' thyroid glands

Исследуемые группы Studied groups	Уровень жизнеспособности, % <sup>(#)</sup> Viability level, % <sup>(#)</sup>	Содержание белка, мг/г ткани Protein content, mg/g of tissue	Уровень T <sub>3</sub> , нмоль/мг белка T <sub>3</sub> level, nM/mg of protein	Уровень T <sub>4</sub> , нмоль/мг белка T <sub>4</sub> level, nM/mg of protein
Нативная ОКЩЖК Native OThGR	100	6,52±0,01	1,73±0,01	15,23±0,04
Криоконсервированная ОКЩЖК Cryopreserved OThGR	58,05±0,25*	2,84±0,02*	0,65±0,01*	9,75±0,07*
Рекультивированная ОКЩЖК Recultured OThGR	65,21±0,12*	2,05±0,06*	0,94±0,02*	12,17±0,02*
Нативная ОКЩЖНП Native OThGNP	100	5,84±0,13	1,52±0,07	17,35±0,18
Криоконсервированная ОКЩЖНП Cryopreserved OThGNP	64,11±0,32*	6,94±0,06*	2,53±0,06*	15,24±0,58
Рекультивированная ОКЩЖНП Recultured OThGNP	72,34±0,51*	5,67±0,02	1,72±0,01	13,04±0,02*

**Примечания.** # - цифры приведены в процентах к соответствующему нативному контролю; \* - p<0,05 –относительно соответствующего нативного контроля.

**Notes:** # - figures are presented in percentage to the corresponding native control; \* - p<0.05 in respect of the corresponding native control.

Как известно, в щитовидной железе при напряжении ее функционирования активизируются адаптационные механизмы, переводящие систему в экономный режим функционирования, вследствие чего преимущественно образуется наиболее активная форма тиреоидных гормонов T<sub>3</sub>, способная контролировать пролиферацию тиреоидных клеток [8]. Таким образом, увеличение концентрации T<sub>3</sub> и некоторое снижение T<sub>4</sub> в криоконсервированной ОКЩЖНП может быть связано с активацией репаративных процессов в клетках щитовидной железы новорожденных поросят после криоконсервирования.

В табл. 2 представлены данные о влиянии криоконсервирования и последующего рекультивирования на содержание нуклеиновых кислот в ОКЩЖК и ОКЩЖНП. В гомогенатах криоконсервированной ОКЩЖК количество РНК и ДНК снижается на 13 и 67% соответственно. Последующее рекультивирование, сопровождалось дальнейшим падением содержания РНК, что свидетельствует о нарушении процессов синтеза белка. Данный факт подтверждается изменением количества общего белка в криоконсервированных и рекультивированных ОКЩЖК (см. табл.1). Криоконсервирование ОКЩЖНП сопровождается увеличением содержания РНК на 44% и ДНК на 17%. В рекультивированной ОКЩЖНП наблюдается снижение содержания РНК и ДНК на 35 и

OThGR. In cryopreserved OThGNP after thawing there was an increase in protein content relative to the native OThGNP by 16%.

The content of thyroid hormones in homogenates of cryopreserved OThGR testified to a decrease in T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> level by 65 and 40%, correspondingly, in respect of the native OThGR. Further reculturing results in a certain normalisation of concerned indices and an increase in T<sub>3</sub> level by 33% and T<sub>4</sub> by 25%, at the same time these indices did not achieve the corresponding native control. In cryopreserved OThGNP an increase in T<sub>3</sub> content by 40% is observed, but the T<sub>4</sub> level did not considerably and truly differ in respect of the native OThGNP. At the same time the following reculturing results in an increase in T<sub>3</sub> level by 12% regarding to the native OThGNP.

As it is known in thyroid gland at the tension of its functioning there is the activation of adaptation mechanisms, shifting the system to economic regimen of functioning, due to that the most active form of thyroid hormones T<sub>3</sub>, capable to control the proliferation of thyroid cells, is formed [8]. Thus, an increase in T<sub>3</sub> concentration and a certain decrease of T<sub>4</sub> in cryopreserved OThGNP can be related to the activation of reparative processes in thyroid gland's cells of newborn piglets after cryopreservation.

The Table 2 demonstrates the data about the effect of cryopreservation and further reculturing on the

73% по сравнению с контрольными значениями. Следует отметить, что увеличение индекса РНК/ДНК в ОКЩЖНП носит ступенчатый характер: в криоконсервированной культуре имеет место его увеличение на 33%, что может свидетельствовать об активации белок-синтетических процессов. Дальнейшее увеличение данного индекса при рекультивировании на 58%, вероятно, связано с резким падением содержания ДНК.

### Выводы

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что ОКЩЖК и ОКЩЖНП устойчивы к экстремальным факторам криоконсервирования. Однако криоконсервированная ОКЩЖНП характеризуется более высокой активностью внутриклеточных процессов, что выражается в стимуляции гормонопоза, увеличении синтеза белка и содержания нуклеиновых кислот. Данное явление, вероятно, связано с тем, что клетки новорожденных доноров более устойчивы к влиянию низких температур и способны к репаративным процессам после деконсервирования.

### Литература

1. Бондаренко Т.П., Луговой С.В. Влияние димексида на секреторную способность тироцитов новорожденных поросят // Пробл. криобиологии. – 2001. – №1. – С. 48-51.
2. Грищенко В.И., Панков Е.Я., Обозная Э.И. Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования // Успехи совр. биол. – 1989. – 108, №2. – С. 299-309.
3. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – Киев: Наук. думка, 1993. – 241 с.
4. Грищенко В.И., Бондаренко Т.П., Бугайов В.М. та ін. Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят у лікуванні гіпотиреозів: Метод. рекомендації. – Харків, 2000. – 14 с.
5. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
6. Практическая химия белка: Пер. с англ. / Под ред. А. Дарбе. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
7. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 391 с.
8. Di Fulvio M., Coleoni A.H., Pellizas C.G., Massini-Repiso A.M. Tri-iodothyronine induces proliferation in bovine thyroid cells: evidence for the involvement of epidermal growth factor-associated tyrosine kinase activity // Endocrinol. – 2000. – 166. – P. 173-182.

**Таблица 2.** Содержание нуклеиновых кислот в нативных и криоконсервированных органах культурах, полученных из щитовидных желез кроликов и новорожденных поросят

**Table 2.** Nucleic acid content in native and cryopreserved organ cultures, obtained from rabbits and newborn piglets' thyroid glands

Исследуемые группы Studied groups	РНК, мг/г ткани RNA,mg/g	ДНК, мг/г ткани DNA,mg/g of tissue	РНК/ДНК RNA/DNA
Нативная ОКЩЖК Native OThGR	7,23±0,21	13,45±0,72	0,54±0,04
Криоконсервированная ОКЩЖК Cryopreserved OThGR	6,27±0,23	4,48±0,42*	1,39±0,07*
Рекультивированная ОКЩЖК Recultured OThGR	2,58±0,09*	1,72±0,52*	1,51±0,06*
Нативная ОКЩЖНП Native OThGNP	5,38±0,15	12,91±0,74	0,42±0,02
Криоконсервированная ОКЩЖНП Cryopreserved OThGNP	9,68±0,24*	15,51±1,52*	0,62±0,05*
Рекультивированная ОКЩЖНП Recultured OThGNP	3,51±0,42*	3,54±0,35*	0,99±0,08*

**Примечание.** \* -  $p < 0,05$  –относительно соответствующего нативного контроля.

**Note.** \* -  $p < 0.05$  in respect of the corresponding native control.

content of nucleic acids in OThGR and OThGNP. In homogenates of cryopreserved OThGR the RNA and DNA number decreases by 13 and 67%, correspondingly. The further reculturing was accompanied with following sharp decrease in RNA content, that testified to the disorder in protein synthesis processes. This fact is confirmed by the change in total protein quantity in cryopreserved and recultured OThGR (see Table 1). The OThGNP cryopreservation is accompanied with an increase in RNA content by 44% and DNA by 17%. In recultured OThGNP a decrease in RNA and DNA content by 35 and 73% in comparison to the control values is observed. It should be noted, that the augmentation of RNA/DNA index in OThGNP has a step-like character: in cryopreserved culture its augmentation by 33% occurs, that can testify to the activation of protein-synthetic processes. Following augmentation of this index by 58% at reculturing is probably related to a sharp decrease in DNA content.

### Conclusions

Thus, the results of the conducted investigations demonstrated, that OThGR and OThGNP were resistant to extreme factors of cryopreservation. However, the cryopreserved OThGNP is characterised by a higher activity of intracellular processes, manifesting in hormonopoiesis stimulation, augmentation of protein synthesis and nucleic acid content. This phenomenon

9. *Honda S., Weigel A.* Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2001.– 30.– P. 493-498.
10. *Hullett D.A., Landry A.S., Leonard D.K. et al.* Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture // *Transplantation.*– 1989.– Vol.47, №1.– P. 24-27.
11. *Kitamura Y., Shimizu K., Nagahama M., Shoji T.* Cryopreservation of thyroid pieces optimal freezing condition and recovery // *Nippon. Geka. Gakkaj. Zasshi.*– 1994.– 95.– P.14-20.

*Поступила 16.04.2003*

is probably related to the fact, that the newborn donors' cells are more resistant to low temperature effect and are capable to reparative processes after freeze-thawing.

## References

1. *Bondarenko T.P., Lugovoj S.V.* Dimethyl sulfoxide effect on thyrocyte secreting ability of newborn piglets // *Problems of Cryobiology.*– 2001.– N1.– P. 48-51.
2. *Grischenko V.I., Pankov E.Ya., Oboznaya E.I.* Qualitative renewal of cell properties after cryopreservation // *Uspekhi sovremennoj biologii.*– 1989.– 108, N2.– P. 299-309.
3. *Grischenko V.I., Chujko V.A., Pushkar N.S.* Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs.– Kiev: Naukova Dumka, 1993.– 241 p.
4. *Grischenko V.I., Bondarenko T.P., Bugaev V.M. et al.* Procurement, cryopreservation and clinical application of organ culture of newborn piglets' thyroid gland in hypothyrosis treatment: Method. Recommendations.– Kharkov, 2000.– 14 p.
5. *Lilli R.* Pathohistological technique and practical histochemistry.– Moscow: Mir, 1969.– 645 p.
6. *Practical chemistry of protein: Translated from English/ Ed. by Darbe A.*– Moscow: Mir, 1989.– 623 p.
7. *Current methods in biochemistry/ Ed. by V.N. Orekhovich.*– Moscow: Meditsina, 1997.– 391 p.
8. *Di Fulvio M., Coleoni A.H., Pellizas C.G., Massini-Repiso A.M.* Triiodothyronine induces proliferation in bovine thyroid cells: evidence for the involvement of epidermal growth factor-associated tyrosine kinase activity// *Endocrinol.*– 2000.– 166.– P. 173-182.
9. *Honda S., Weigel A.* Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2001.– 30.– P. 493-498.
10. *Hullett D.A., Landry A.S., Leonard D.K. et al.* Enhancement of thyroid allograft survival following organ culture // *Transplantation.*– 1989.– V.47, N1.– P. 24-27.
11. *Kitamura Y., Shimizu K., Nagahama M., Shoji T.* Cryopreservation of thyroid pieces optimal freezing condition and recovery // *Nippon. Geka. Gakkaj. Zasshi.*– 1994.– 95.– P.14-20.

*Accepted in 16.04.2003*