

УДК 57.043:612.45.018.1.085.23:547.569.2

И.В. Тамирина*, Г.А. Божок, Т.М. Гурина, Н.Ф. Губина, Т.П. Бондаренко

Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников новорожденных мышей.

II. Влияние концентраций сыворотки в составе криозащитной среды

UDC 611.651.1.018:57.043:616.089

I.V. Tamarina*, G.A. Bozhok, T.M. Gurina, N.F. Gubina, T.P. Bondarenko

Cryopreservation of Newborn Mice Adrenal Cell Suspension.

II. Effect Caused by Concentration of Serum as Component of Cryoprotective Medium

Реферат. Изучали влияние концентраций фетальной телячьей сыворотки (ФТС) и диметилсульфоксида (ДМСО) в составе криозащитной среды на показатели жизнеспособности по исключению трипанового синего, сохранности количества и гормональной активности клеток надпочечников новорожденных мышей после замораживания-оттаивания. Использование сыворотки в концентрации 10 и 25% позволило увеличить количество жизнеспособных клеток надпочечников новорожденных мышей по сравнению с бессывороточными средами. Наибольшие показатели жизнеспособности (от 71,4 до 76,0%) и сохранности (99,0%) наблюдались после замораживания-оттаивания клеток надпочечников в средах, содержащих 10, 15, 20% ДМСО и 25% ФТС. Однако гормональная и пролиферативная активности оказались снижены по сравнению с контрольной культурой.

Ключевые слова: криоконсервирование, надпочечники, новорожденные мыши, ДМСО.

Реферат. Вивчали вплив концентрацій фетальної телячої сироватки (ФТС) та диметилсульфоксиду (ДМСО) у складі криозахисного середовища на показники життєздатності за виключенням трипанового синього, збереження та гормональної активності клітин наднирників новонароджених мишей після заморожування-відтавання. Використання сироватки у концентрації 10 або 25% дозволяє підвищити кількість життєздатних клітин наднирників новонароджених мишей у порівнянні з криозахисними середовищами, які не містили сироватки. Найбільші показники життєздатності (від 71,4 до 76,0%) та збереження (99,0%) кількості клітин спостерігались після заморожування-відтавання суспензії клітин наднирників новонароджених мишей у середовищах із вмістом 10, 15, 20 ДМСО та 25% ФТС. Проте гормональна та проліферативна активності були нижчими у порівнянні з контрольною культурою.

Ключові слова: криоконсервування, наднирники, новонароджені миші, ДМСО.

Abstract. The effect of fetal bovine serum (FBS) and dimethylsulfoxide (DMSO) concentrations within cryoprotective medium on the viability indices by exclusion of trypan blue, survival and hormonal activity of adrenal cells of newborn mice after freeze-thawing has been studied. Application of 10 and 25% serum enabled to increase a number of viable adrenal cells of newborn rats if compared with serum-free media. The highest indices of viability (from 71.4 upto 76.0%) and survival (99.0%) were observed after freeze-thawing of adrenal cells in the media, containing 10, 15, 20% DMSO and 25% FBS. However, hormonal and proliferative activities were reduced if compared with the control culture.

Key words: cryopreservation, adrenal glands, newborn mice, DMSO.

Для патологического состояния надпочечников характерны первичная, хроническая надпочечниковая недостаточность, феохромоцитоз, синдром Кушинга, гемохроматоз, гиперальдостеронизм. Вследствие распространенности генетических нарушений и заболеваний адреналовой системы необходимо изучение надпочечников как в физиологических условиях [20, 21], так и при пато-

Primary and chronic adrenal failure, pheochromocytosis, Cushing syndrome, hemochromatosis, hyperaldosteronism are characteristic for pathological states of adrenal glands. Due to prevalence of genetic disorders and diseases of adrenal system it is necessary to study adrenal glands both in physiological [20, 21] and pathological conditions [17, 22]. Tissue or cell culturing is one of the widespread methods to research organ

Отдел криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Cryobiochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

***Адрес для корреспонденции:**

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: tamarinai@mail.ru

*** Address for correspondence:**

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: tamarinai@mail.ru

Поступила 27.11.2012

Принята в печать 30.01.2013

Received November, 27, 2012

Accepted January, 30, 2013

логии [17, 22]. Одним из широко распространенных методов исследования особенностей развития и функционирования органа, а также влияния на него внешних факторов является культивирование ткани или клеток. При необходимости сохранения суспензии клеток надпочечников в течение времени, превышающего максимальный срок гипотермического хранения, важна разработка способа ее долгосрочного низкотемпературного хранения. В настоящее время описаны режимы замораживания органотипической культуры надпочечников новорожденных поросят [3], клеток взрослых крыс [1, 19] и новорожденных мышей [2]. Однако показатели жизнеспособности клеток надпочечников, отмеченные в этих работах, составили 50–65% от их жизнеспособности в незамороженных образцах, что обусловило актуальность поиска новых режимов замораживания, включая разработку новых составов криопротекторных сред.

В наших предыдущих исследованиях установлено, что в условиях криоконсервирования клеток надпочечников с ДМСО в широком диапазоне концентраций (от 5 до 30%) наивысшие показатели жизнеспособности были при использовании 10, 15 и 20%-х растворов криопротектора [2].

Общепринято, что ДМСО в высоких концентрациях оказывает негативные эффекты на многие клеточные функции. Ранее установлено [11], что культивирование клеток почки макаки Резус в присутствии 7,5–15% ДМСО в течение 10–60 мин приводит к аккумуляции липидов, увеличению числа лизосом, дегрануляции шероховатого ЭПР, набуханию и повреждению митохондриальных мембран. Qi W. и соавт. [15] показали, что при инкубации кохлеарной органотипической культуры в течение суток в присутствии 0,5–6% ДМСО наблюдаются набухание и уменьшение количества клеток волосяных фолликулов.

По данным предыдущих исследований одним из дополнительных компонентов сред, используемых для криоконсервирования клеток, могут выступать белковые добавки, обладающие криозащитными свойствами [6, 9–11]. Например, в работе Устиченко В.Д. [3] показано, что использование фетальной телячьей сыворотки (ФТС) в составе криозащитной среды повышает жизнеспособность и гормональную активность клеток надпочечников новорожденных поросят после замораживания-оттаивания. Концентрации ФТС 10% [1] и 25% [4] используются в составе криозащитных сред для криоконсервирования надпочечников новорожденных поросят и взрослых крыс.

Dimasi L. и соавт. [6] установили, что показатель жизнеспособности клеток линий CHO и Sp2/0, замороженных-оттаянных в присутствии альбумина,

developmental and functional peculiarities, as well as effect of external factors on it. If preserving adrenal cell suspension is required for the time exceeding maximum term provided by hypothermic storage it is important to develop the method of its long-term low-temperature storage. Nowadays, the freezing regimens of organotypic culture of adrenal glands of newborn piglets [3], cells of adult rats [1, 19] and newborn mice [2] have been described. However, the indices of adrenal cell viability presented in these papers made 50–65% of their viability in non-frozen samples, that made searching the new freezing regimens relevant, including the development of new compositions of cryoprotective media.

In our previous research we established that under freeze-thawing of adrenal cells in solutions of DMSO of wide concentration range (from 5 to 30%) the highest indices of viability were observed when using 10, 15 and 20% solutions of cryoprotectant [2].

It is commonly accepted that DMSO of high concentrations negatively affects many cell functions. It was found previously [11] that culturing of cells of Rhesus monkey kidney in the presence of 7.5–15% DMSO for 10–60 min resulted in accumulation of lipids, the increasing of lysosomes number, degranulation of rough endoplasmic reticulum, swelling and damage of mitochondrial membranes. Qi W. *et al.* [15] showed that incubation of cochlear organotypic culture for 24 hrs in the presence of 0.5–6% DMSO resulted in swelling and reducing of hair follicle cell number.

According to the previously reported data [6, 9, 11] as additional components of cell cryopreservation media could serve the protein additives, possessing cryoprotective properties. For example, Ustichenko V.D. [3] reported that using fetal calf serum (FCS) as a component of cryoprotective medium resulted in an increase of post-thaw viability and hormonal activity of adrenal cells of newborn piglets. FCS concentrations of 10 [1] and 25% [4] were used as a component of cryoprotective media for cryopreservation of adrenal glands of newborn piglets and adult rats.

Dimasi L. *et al.* [6] established that viability of CHO and Sp2/0 cells frozen-thawed in the presence of albumin was not significantly differed from the index found in the case of using FCS. Freeze-thawing of bone marrow hemopoietic cells performed in DMSO rich medium (20%) supplemented with homologous serum resulted in preservation of colony-forming units [9]. Sericine, a protein of silk, has been successfully used for cryopreservation of cells of different lines [18].

The research aim was to study the effect of different concentrations of fetal calf serum, as a component of cryoprotective medium based on DMSO, on post-thaw viability and morphofunctional properties of adrenal cells of newborn mice.



достоверно не отличается от таковых в ФТС. При криоконсервировании гемопоэтических клеток костного мозга добавление гомологической сыворотки в среду с высоким содержанием ДМСО (20%) способствовало сохранению колониеобразующих единиц [9]. Серицин – белок, входящий в состав шелка, с успехом был использован при криоконсервировании клеток различных линий [18].

Целью нашей работы было изучить влияние различных концентраций фетальной телячьей сыворотки в составе криозащитной среды, включающей ДМСО, на жизнеспособность и морфофункциональные свойства клеток надпочечников новорожденных мышей после замораживания-оттаивания.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (2007, Киев) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Объектом исследования была суспензия клеток надпочечников (СКН) новорожденных мышей от 1 до 4 суток обоих полов линий c57Black и СВН. Клетки получали ферментативным способом с использованием коллагеназы типа V или IA («Sigma», США) в концентрации 1 мг/мл [2] и культивировали в среде 199 с L-глутамином и HEPES («PAA», Австрия) в присутствии 10% ФТС («PAA») и атмосфере, обогащенной 5% CO₂, при постоянной влажности и температуре 37°C. Клетки культивировали в 24-луночных планшетах («Sarstedt», Германия) и чашках Петри диаметром 35 мм («Sarstedt»). Посадочная плотность составляла 5×10⁵ клеток на лунку планшета и 1×10⁶ на чашку Петри. Полностью среду культивирования заменяли раз в 3–4 дня.

Суспензию клеток надпочечников замораживали в криозащитных средах с конечной концентрацией ДМСО 5; 7,5; 10; 15; 20 и 30% в присутствии 10 и 25% ФТС («PAA») со скоростью охлаждения 1 град/мин до –40°C при последующем погружении контейнеров в жидкий азот. Отогревали образцы на водяной бане при температуре 40°C, а затем пошагово отмывали от криопротектора: каждые 60 с к 1 мл размороженной пробы добавляли последовательно 0,5; 0,5; 1 и 2 мл среды.

Жизнеспособность суспензии оценивали по количеству клеток, которые исключали трипановый синий, и выражали в процентном отношении к общему количеству клеток. Сохранность вычисляли как соотношение общего количества клеток после оттаивания к количеству клеток до замораживания, выраженное в процентах. Количество расплас-

Materials and methods

The experiments were performed according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3rd National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The research object was adrenal cell suspension (ACS) of c57Black and CBH newborn mice of 1–4 days of both genders. The cells were obtained by enzyme method using type V or IA collagenase (Sigma, USA) of 1 mg/ml [2] and cultured in medium 199 with L-glutamine and HEPES (PAA, Austria) with 10% FCS (PAA) in atmosphere with 5% CO₂, constant humidity and 37°C. The cells were cultured on 24-well plate (Sarstedt, Germany) and 35 mm Petri dish (Sarstedt). Seeding density made 5×10⁵ cells per well of plate and 1×10⁶ cells per Petri dish. Culturing medium was completely changed each 3–4 days.

Adrenal cell suspension was frozen in cryoprotective media with final concentration of DMSO of 5; 7.5; 10; 15; 20 and 30% with 10 and 25% FCS (PAA) with the cooling rate of 1 degree/min down to –40°C, thereafter the containers were plunged into liquid nitrogen. The specimens were thawed in water bath at 40°C and thereafter stepwise washed from cryoprotectant: 1 ml of frozen-thawed sample was gradually supplemented with 0.5; 1 and 2 ml medium with 60 sec intervals.

Suspension viability was assessed by the number of cells, excluded Trypan blue, and expressed in percents of total cell number. Survival was evaluated as a ratio of post-thaw number of cells and cell number prior to freezing and expressed in percentage. A number of flattened and attached cells was calculated in 5 vision fields after a complete change of medium and expressed in percents to the number of flattened and attached cells in culture which was not exposed to cryopreservation. Aldosterone secretion was measured by radioimmune assay with RIA Aldosterone test-kit (Immunotech, France) in culturing media to the days 2, 4, 6, 8, 12 for the control culture and to the 2nd day for thawed samples. Cell proliferation was visually assessed by the area occupied by monolayer in respect to the total surface of the well.

The data were processed with non-parametric Mann-Whitney criterion. The data were expressed as $M \pm m$ ($n = 3$). The results were considered as significantly differing at $p < 0.05$.

Results and discussion

The experiments were performed with 10 and 25% concentrations of FCS, widely used during freezing of various cells, including adrenal cells [3, 4, 10]. It has been established that the presence of FCS in cryo-



танных и прикрепленных клеток подсчитывали в 5 полях зрения после полной замены среды и выражали в процентном отношении к количеству распластанных и прикрепленных клеток в культуре, которая не подвергалась криоконсервированию. Секрецию альдостерона измеряли радиоиммунологическим методом с помощью тест-набора «RIA Aldosterone» («Immunotech», Франция) в средах культивирования на 2, 4, 6, 8, 12-е сутки для контроля и на 2-е сутки для проб после замораживания-оттаивания. Пролиферацию клеток оценивали визуально по площади монослоя относительно общей площади лунки.

При обработке данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, данные выражали в виде $M \pm m$ ($n = 3$). Достоверно отличающиеся считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В экспериментах использовали 10 и 25%-е концентрации ФТС, наиболее часто применяемые при замораживании различных клеток, включая клетки надпочечников [3, 4, 10]. Установлено, что присутствие ФТС в криозащитной среде недостоверно увеличивало сохранность деконсервированных СКН по сравнению с клетками, замороженными в бессывороточной среде (рис. 1, А), кроме проб, замороженных в присутствии 30% ДМСО. Сохранность достоверно уменьшалась относительно

protective medium insignificantly increased survival of frozen-thawed ACS if compared with the cells, frozen-thawed in serum-free medium (Fig. 1A), except the case of 30% DMSO. The survival was significantly reduced comparing to the control for the samples frozen-thawed without FCS in 5 and 7.5% DMSO and for all the cases with 30% DMSO. The viabilities of ACS frozen in serum-free media and with FCS were significantly different (Fig. 1B). For the cells frozen-thawed in serum-free media the maximum indices of viability made from 63.7 ± 6.4 upto $66.7 \pm 7.3\%$, while for the media, containing 10 and 25% FCS and 10, 15 and 20% DMSO they made from 71.4 ± 6.8 upto $76.0 \pm 7.2\%$ for the samples. No significant differences were found in post-thaw viabilities between the media, containing 10 and 25% FCS.

An important index of functional activity of ACS is aldosterone secretion level. In the culture obtained from freshly isolated ACS, aldosterone level to the 2–4th day of culturing was 2155.27 ± 473.21 pg/ml/mln (Table), starting from the 6th day of culturing there was observed a sharp decrease of its secretion down to 34.94 ± 26.80 pg/ml/mln. It may be likely associated with the reduced aldosterone secretion, as well as proliferation of adrenocortical cells in culture without the required components of the medium, for example endothelial factors [5], or ACTH [13].

Significant reduction of aldosterone secretion of post-thaw ACS irrespective of composition of cryo-

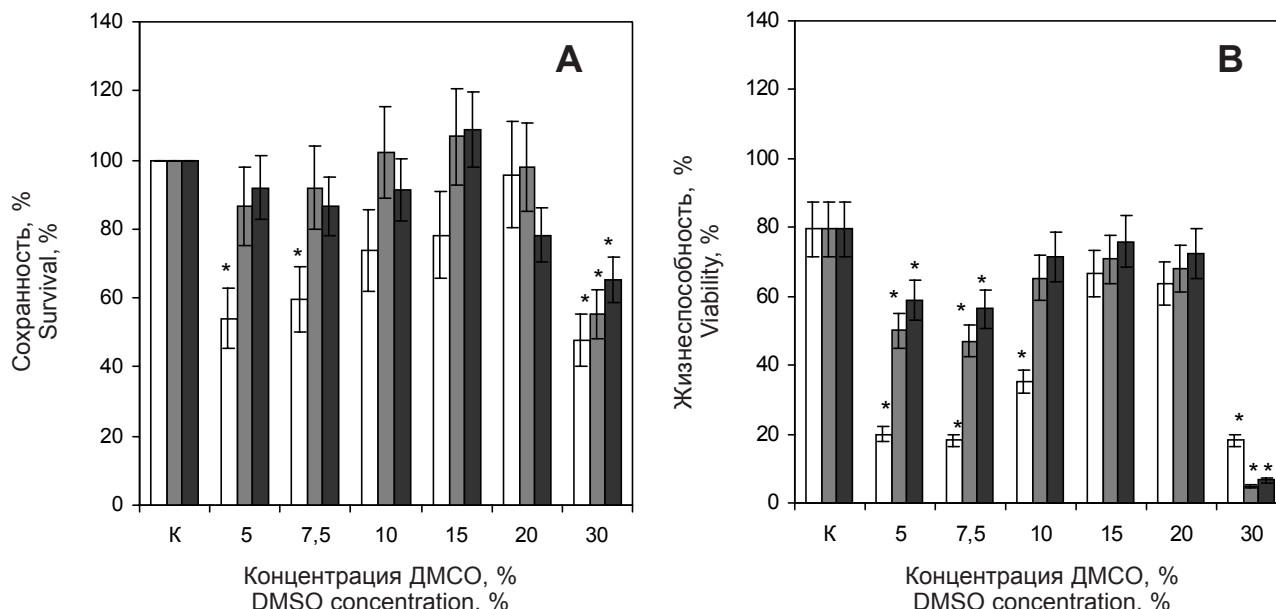


Рис. 1. Сохранность (А) и жизнеспособность (В) СКН новорожденных мышей после замораживания-оттаивания в средах с различным содержанием ДМСО и ФТС: □ – без ФТС; ■ – с 10% ФТС; ■ – с 25% ФТС; К – контроль, клетки, не подвергавшиеся замораживанию-оттаиванию, * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Fig. 1. Survival (A) and viability (B) of ACS of newborn mice after freeze-thawing in the media with different content of DMSO and FCS: □ – FCS-free; ■ – with 10% FCS; ■ – with 25% FCS; K – control, the cells not exposed to freeze-thawing; * – differences are significant relative to the control, $p < 0.05$.

контроля для проб, замороженных-оттаянных без ФТС в 5 и 7,5% ДМСО, и для всех проб, замороженных-оттаянных с 30% ДМСО. Достоверные различия имели показатели жизнеспособности СКН, замороженных в бессывороточных средах и в присутствии ФТС (рис. 1, В). Для клеток, замороженных-оттаянных в бессывороточных средах, максимальные показатели жизнеспособности составляли от $63,7 \pm 6,4$ до $66,7 \pm 7,3\%$, для сред с 10 и 25% ФТС с содержанием ДМСО 10, 15 и 20% – от $71,4 \pm 6,8$ до $76,0 \pm 7,2\%$. Достоверных различий в уровне жизнеспособности после замораживания-оттаивания между средами, содержащими 10 и 25% ФТС, отмечено не было.

Важным показателем функциональной активности СКН является уровень секреции альдостерона. В культуре, полученной из свежeweыделенной СКН, уровень альдостерона на 2–4-е сутки культивирования составлял $2155,27 \pm 473,21$ пг/мл/млн (таблица), начиная с 6-х суток культивирования наблюдалось резкое снижение его секреции до $34,94 \pm 26,80$ пг/мл/млн. Возможно, это связано со снижением секреции альдостерона, а также пролиферации адренокортикальных клеток в культуре при отсутствии необходимых компонентов среды, например эндотелиальных факторов [5], АКТГ [13].

Независимо от состава криозащитных сред после криоконсервирования наблюдалось значительное снижение секреции альдостерона СКН в процессе их культивирования (таблица). При этом достоверно увеличивался уровень гормона после замораживания-отогрева в ФТС-содержащих средах по сравнению с бессывороточными. Кроме того, установлено, что с повышением концентрации криопротектора увеличивалось содержание альдостерона в среде культивирования. В образцах, замороженных в присутствии 5 и 7,5% ДМСО, содержание альдостерона в среде на 2-е и 3-и сутки культивирования было ниже 10 пг/мл/млн клеток, тогда как наивысший его уровень ($326,49 \pm 47,7$ и $245,63 \pm 39,1$ пг/мл/млн клеток соответственно) был характерен для СКН, замороженной-оттаянной в присутствии 20% ДМСО и 25% ФТС.

Способность СКН к прикреплению и пролиферации в процессе культивирования оценивали до и после криоконсервирования и выражали в процентном отношении к культуре, не подвергавшейся замораживанию-оттаиванию. Как видно из рис. 2, А, наибольшее количество прикрепленных клеток характерно для СКН, замороженной-оттаянной в ФТС-содержащих средах с 10, 15 и 20% ДМСО. Наибольший процент распластанных клеток ($51 \pm 3,1\%$) установлен в культуре СКН, замороженной-оттаянной в присутствии 20% ДМСО и 25% ФТС (рис. 2, В). В остальных случаях количество распластанных клеток было достоверно ниже и сос-

Содержание альдостерона в среде культивирования СКН новорожденных мышей после замораживания-отогрева в средах с различным содержанием ДМСО и ФТС ($M \pm m$)

Content of aldosterone in medium during culturing of ACS of newborn mice frozen-thawed in media with different content of DMSO and FCS ($M \pm m$)

Концентрация ДМСО, % (наличие/отсутствие ФТС) DMSO concentration, % (presence/absence of FCS)	Содержание альдостерона, пг/мл/млн клеток Aldosterone content, pg/ml/mln of cells	
	2-е сутки 2 nd day	3-и сутки 3 rd day
5 (без ФТС/no FCS)	$3,46 \pm 2,86$	$1,97 \pm 4,56$
5 (25% ФТС/25% FCS)	$21,67 \pm 9,14$	$24,02 \pm 13,13$
7,50 (без ФТС/no FCS)	$0,16 \pm 1,08$	$0,39 \pm 2,40$
7,50 (25% ФТС/25% FCS)	$11,29 \pm 6,83$	$3,61 \pm 6,72$
10 (без ФТС/no FCS)	$0,06 \pm 2,3$	$0,07 \pm 1,88$
10 (25% ФТС/25% FCS)	$143,28 \pm 20,37$	$63,89 \pm 12,81$
15 (без ФТС/no FCS)	$0,03 \pm 1,17$	$0,19 \pm 2,07$
15 (25% ФТС/25% FCS)	$54,70 \pm 23,64$	$74,10 \pm 17,03$
20 (без ФТС/no FCS)	$0,06 \pm 2,01$	$0,16 \pm 1,69$
20 (25% ФТС)/25% FCS	$326,49 \pm 47,71$	$245,63 \pm 39,10$
30 (без ФТС/no FCS)	$0,02 \pm 0,98$	$0,05 \pm 2,04$
30 (25% ФТС/25% FCS)	$1,15 \pm 10,13$	$0,06 \pm 2,01$

protective media was observed during their culturing (Table). Herewith a hormone level after freeze-thawing in FCS-containing media if compared with serum-free ones is significantly increased. Moreover, it has been established that with the rise in cryoprotectant concentration the aldosterone content in culturing medium was also increased. In the samples frozen-thawed in the presence of 5 and 7.5% DMSO the aldosterone content in the medium to the 2nd and 3rd day of culturing was lower than 10 pg/ml/mln of cells, whereas its maximum level (326.49 ± 47.7 and 245.63 ± 39.1 pg/ml/mln of cells, correspondingly) was characteristic for ACS frozen-thawed with 20% DMSO and 25% FCS.

The ability of cultured ACS to attach and proliferate was assessed prior to and after freeze-thawing and expressed in percentage ratio to non-frozen-thawed culture. Fig. 2A shows that the highest number of attached cells is characteristic for ACS frozen-thawed in FCS-containing media with 10, 15 and 20% DMSO. The highest percentage of the flattened cells ($51 \pm 3.1\%$) was revealed in ACS culture frozen-thawed in the presence of 20% DMSO and 25% FCS (Fig. 2B).



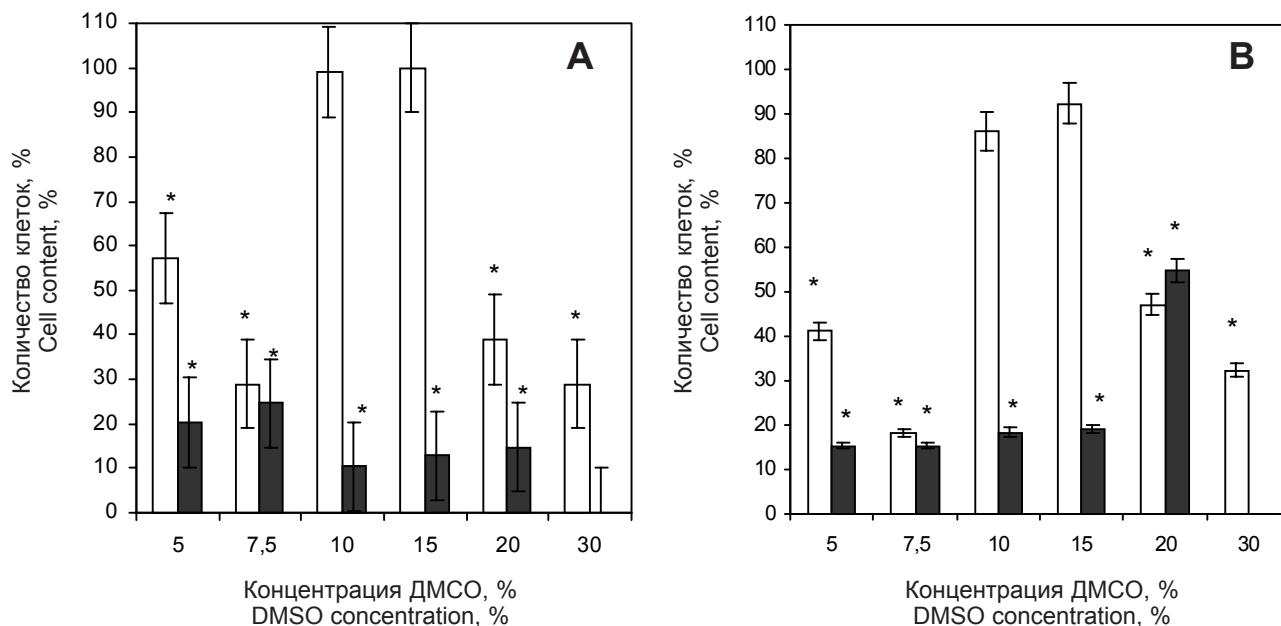


Рис. 2. Количество распластанных клеток в СКН новорожденных мышей после замораживания-отогрева в криозащитных средах с различным содержанием ДМСО, 10% ФТС (А) и 25% ФТС (В) на 2-е сутки культивирования: □ – общее количество клеток в поле зрения; ■ – количество распластанных клеток (* – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$. Данные представлены в процентном отношении от показателя свежеевыделенных клеток).

Fig. 2. Number of flattened cells in ACS of newborn mice after freeze-thawing in cryoprotective media with different content of DMSO, 10% FBS (A) and 25% FBS (B) to the 2nd day of culturing: □ – total number of cells in field of vision; ■ – content of flattened cells; * – differences are statistically significant comparing to the control, $p < 0.05$. The data are presented as percentage of indices observed in freshly isolated cells.

тавляло от 0 до $24 \pm 1,9\%$ (для для всех концентраций ДМСО, кроме 20%).

В культуре, полученной из свежеевыделенной суспензии клеток надпочечников, выявлено несколько основных морфологических типов клеток: фибробластоподобные и эпителиоидные, а также округлые, имеющие при световой микроскопии желто-коричневый цвет за счет многочисленных включений (рис. 3, А). На 4-е сутки культивирования наблюдается формирование монослоя, который в среднем составлял 40–50% от площади поверхности лунки. После криоконсервирования значительная пролиферативная активность клеток сохранялась в образцах, замороженных в средах при 25% ФТС и 10–20% ДМСО (рис. 3, В). В этих образцах на 4-е сутки культивирования выявлен монослой клеток, составляющий 10–15% от площади поверхности лунки. Единичные островки деления клеток наблюдались в образцах, замороженных с 10% ФТС и 10–20% ДМСО, а также при использовании 5 и 7,5% ДМСО с ФТС и без нее (рис. 3, С). В образцах, замороженных без сыворотки, наблюдались одиночные прикрепленные клетки, признаки формирования монослоя отсутствовали (рис. 3, D).

В целом было установлено позитивное влияние добавок сыворотки в концентрациях 10 и 25% в

In other cases a number of flattened cells was significantly lower and varied from 0 to $24 \pm 1.9\%$ (for all concentrations of DMSO, except 20%).

In the culture obtained from freshly isolated suspension of adrenal cells we revealed some main morphological types of cells such as: fibroblastoid and epithelioid ones as well as round-shaped stained yellow-brown in transmission light microscopy due to multiple inclusions (Fig. 3A). By the 4th day of culturing there was observed monolayer formation, which occupied in average 40–50% of a well surface. A significant post-thaw proliferative activity of cells was found in the samples frozen-thawed in the media frozen-thawed in the presence of 25% FCS and 10–20% DMSO (Fig. 3B). To the 4th day of culturing these samples had the cell monolayer, occupied 10–15% of well surface. Single areas with dividing cells were observed in the samples frozen-thawed in the presence of 10% FCS and 10–20% DMSO, as well in the case of 5 and 7.5% DMSO with FCS and without it (Fig. 3C). In the samples frozen-thawed without serum we revealed only single attached cells, and no evidence of monolayer formation (Fig. 3D).

Generally we found a positive effect of serum supplements of 10 and 25% into composition of cryoprotective media on indices of viability, survival, ability

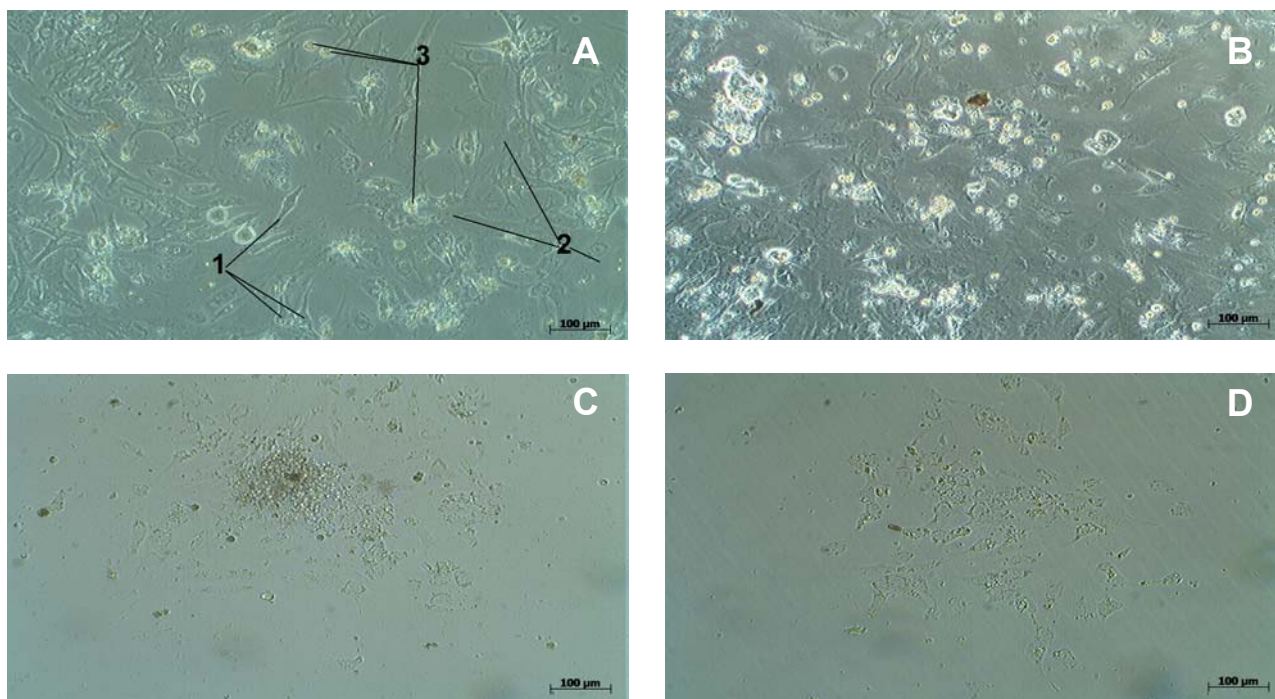


Рис. 3. Культуры клеток, полученные из свежеевыделенной и криоконсервированных СКН на 4-е сутки: А – культура из свежеевыделенных клеток (1 – фибробластоподобные клетки, 2 – эпителиодные клетки, 3 – хромаффинные клетки); В – СКН, замороженная-отогретая в присутствии 20% ДМСО и 25% ФТС; С – СКН, замороженная-отогретая в присутствии 20% ДМСО и 10% ФТС; D – СКН, замороженная-отогретая в присутствии 20% ДМСО.

Fig. 3. Cultures of cells, obtained from freshly isolated and frozen-thawed ACS to the 4th day: A – culture from freshly isolated cells: 1 – fibroblastoid cells; 2 – epithelioid cells; 3 – chromaffin cells; B – ACS frozen-thawed in the presence of 20% DMSO and 25% FCS; C – ACS frozen-thawed in the presence of 20% DMSO and 10% FCS; D – ACS frozen-thawed in the presence of 20% DMSO.

состав криозащитных сред на показатели жизнеспособности, сохранности, способности к прикреплению и росту, а также секреции альдостерона клетками надпочечников новорожденных мышей.

Способность эндокринных клеток к синтезу гормонов непосредственно связана с пространственной организацией и взаимодействием компонентов цитоскелета [8]. Для большинства клеток млекопитающих наиболее физиологичным состоянием являются прикрепление к субстрату и расплывание на нем. Поэтому данные о максимальном уровне альдостерона в среде культивирования согласуются с данными о максимальном количестве расплывшихся клеток и их высокой пролиферативной активностью для образца, замороженного под защитой 20% ДМСО и 25% ЭТС (рис. 2, В; таблица).

Известно, что криозащитные свойства ДМСО связаны с его способностью проникать через клеточную мембрану и связывать воду. Он также оказывает негативное влияние, приводящее к необратимым изменениям в клетках и их гибели. Такие эффекты обусловлены типом исследуемых клеток, концентрацией ДМСО и временем экспозиции с криопротектором. В частности, токсичность данного криопротектора для клетки заключается

to attach and proliferate as well as to secrete aldosterone in adrenal cells of newborn mice.

An ability of endocrine cells to synthesize hormones is directly associated with three-dimensional organization and interaction of cytoskeleton components [8]. For the majority of mammalian cells the most physiological state is to attach to a substrate and to flatten on it. Therefore the obtained data of maximum aldosterone level in culturing medium were correlated with maximum number of flattened cells and their high proliferative activity found in the samples frozen-thawed under the protection of 20% DMSO and 25% FCS (Fig. 2B, Table).

Cryoprotective properties of DMSO are known to be associated with its ability to penetrate through cell membrane and bind water. Its negative effects result in irreversible changes in the cell and its death. These effects are pre-conditioned by the type of the studied cells, DMSO concentration and time of exposure with cryoprotectant. In particular, the toxicity of this cryoprotectant for a cell is expressed in the pore formation in cytoplasmic membrane when DMSO concentration exceeds 20% [12], as well as in replacement of water molecules in hydrate envelope of macromolecules, resulting in changing their properties [7, 14]. Despite



в том, что при его концентрации выше 20% в цитоплазматической мембране образуются поры [12], также замещаются молекулы воды в гидратной оболочке макромолекул, что приводит к изменению их свойств [7, 14]. Несмотря на цитотоксичность, ДМСО остается одним из самых распространенных криопротекторов, а его применение вместе с непроникающим криопротектором, например ФТС, позволяет улучшить функциональные показатели клеток после замораживания-оттаивания.

Использование сыворотки в качестве добавки к криозащитным средам имеет ряд недостатков, которые связаны с непостоянством состава, возможностью контаминации вирусами, присутствием в нем нежелательных биологически активных веществ [9, 16].

Поскольку альбумин составляет более 60% белков сыворотки крови млекопитающих, то именно с ним принято связывать криопротекторные свойства сыворотки [18]. Было показано [6, 10], что при замораживании овариальных клеток китайского хомяка и фолликулов овариальной ткани человека, в зависимости от использования в качестве добавки сыворотки или альбумина, жизнеспособность клеток и их пролиферативная активность достоверно не отличаются.

В следующей статье нами будет рассмотрена возможность использования бычьего сывороточного альбумина и ДМСО для криоконсервирования СКН.

Выводы

1. Использование 10 и 25% ФТС при криоконсервировании СКН новорожденных мышей позволяет увеличить количество жизнеспособных клеток надпочечников новорожденных мышей по сравнению с бессывороточными средами.

2. Наивысшие показатели жизнеспособности и сохранности были характерны для клеток, замороженных-оттаянных в присутствии 10, 15 и 20% ДМСО и ФТС, однако гормонопродукция, количество прикрепленных и распластанных клеток, их пролиферативная активность были достоверно ниже контрольных значений.

Литература

1. Дудецкая Г.В., Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Влияние скорости охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №4. – С. 379–387.
2. Тамарина И. В., Божок Г.А., Гурина Т.М. и др. Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников новорожденных мышей: I. Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №1. – С. 79–87.
3. Устиченко В.Д. Функціональні властивості надниркових залоз новонароджених поросят при дії різних режимів

of its cytotoxicity, DMSO has remained one of the most widespread cryoprotectants and its application with non-penetrating cryoprotectant, for example FCS enables to improve functional indices of cells after freeze-thawing.

Using of serum as a supplement to cryoprotective media has some disadvantages, associated with irregularity of its composition, possibility of viral contamination and the presence in it of undesirable biologically active substances [9,16].

Albumin comprises more than 60% proteins of mammalian blood serum, so namely it is associated usually provide cryoprotective properties of serum [18]. It has been shown [6, 10] that the outcome (cell viability and proliferative activity) of freeze-thawing of ovarian cells of Chinese hamster and follicles of human ovarian tissue was the same for the cases of using serum or albumin as the additives to cryopreservation media.

In the next paper we will consider a possibility of using bovine serum albumin and DMSO for cryopreservation of ACS.

Conclusions

1. Application of 10 and 25% FCS during freeze-thawing of ACS of newborn mice enabled to increase the number of viable adrenal cells of newborn mice if compared with the case of serum-free media.

2. The highest indices of viability and survival were characteristic for the cells frozen-thawed in the presence of 10, 15 and 20% DMSO and FCS, however hormone secretion, number of attached and flattened cells, their proliferative activity were significantly lower than the control indices.

References

1. Dudetskaya G.V., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Effect of cooling rate on integrity of zone-differentiated adrenal cell populations of rats // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N4. – P. 379–387.
2. Tamarina I.V., Bozhok G.A., Gurina T.M. et al. Cryopreservation of newborn mice adrenal cell suspension: I. Concentration effect of DMSO as cryoprotective medium component // Problems of Cryobiology. – Vol. 22, N1. – P. 79–87.
3. Ustichenko V.D. Functional properties of newborn piglets' adrenal glands during effect of different freezing regimens: Author's Abstract of the Thesis ... Candidate of Biological Sciences. – Kharkiv, 2008 – 20 p.
4. Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I. et al. Study of possibility to derive and cryopreserve adrenal cell primary culture of newborn piglets // Problems of Cryobiology. – 2011. – Vol. 21, N1. – P. 58–67.
5. Ansurudeen I., Kopprasch S., Ehrhart-Bornstein M. et al. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells // Mol. Cel. Endocr. – 2007. – Vol. 265, N3. – P. 150–156.
6. Dimasi L., Chirkova L., Malbasic M. et al. Recombinant albumin – its role in cryopreservation and cell recovery [Electronic document] // [web-site] <http://www.novofarma.biozymes.com/en/information-centre/posters-and-presentations/Documents/>



- заморожування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2008. – 20 с.
4. Сидоренко О.С., Божок Г.А., Лещак Е.И. и др. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т 21, №1. – С. 58–67.
 5. Ansurudeen I., Kopprasch S., Ehrhart-Bornstein M. et al. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells // *Mol. Cel. Endocr.* – 2007. – Vol. 265, №3. – P. 150–156.
 6. Dimasi L., Chirkova L., Malbasic M. et al. Recombinant albumin – its role in cryopreservation and cell recovery [Электронный документ] // [веб-сайт] [http://www.novofarma.biozymes.com/en/information-centre/posters-and-presentations/Documents/Recombinant_albumin_%E2%80%9393_role_in_cryopreservation_and_cell\[1\].pdf](http://www.novofarma.biozymes.com/en/information-centre/posters-and-presentations/Documents/Recombinant_albumin_%E2%80%9393_role_in_cryopreservation_and_cell[1].pdf) (18.11.2012).
 7. Fahy G., Lilley T., Lindsell H. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // *Cryobiology.* – 1990. – Vol. 27, №3. – P. 247–268.
 8. Flevaris P., Stojanovich A., Gong H. et al. A molecular switch that controls cell spreading and retraction // *JCB.* – 2007. – Vol. 179, №3. – P. 553–565.
 9. Grill G., Porcellini A., Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoetic stem cells // *Cryobiology.* – 1980. – Vol. 17, N5. – P. 516–520.
 10. Hreinsson J., Zhang P., Swahn M. et al. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18, №11. – P. 2420–2428.
 11. Malinin G. Cytotoxic effect of dimethylsulfoxide on the ultrastructure of cultured Rhesus kidney cells // *Cryobiology.* – 1973. – Vol. 10, №1. – P. 22–32.
 12. Menorval M., Mir M., Fernandez L. et al. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells // *PLoS.* – 2012. – Vol. 7. – e41733.
 13. O'Hare M., Neville A. Morphological responses to corticotrophin and cyclic AMP by adult rat adrenocortical cells in monolayer culture // *J. Endocrinol.* – 1973. – Vol. 56, №3. – P. 529–536.
 14. Pogorelyi V. K., Turov V. V., Turov A. V. et al. Reaction of serum albumin with dimethyl sulfoxide according to PMR spectra of frozen aqueous solutions // *Theor. Exp. Chem.* – 1989. – Vol. 25, N1. – P. 93–97.
 15. Qi W., Ding D., Salvi R., Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures // *Hear Res.* – 2008. – Vol. 236. – P. 52–60.
 16. Rossi C., Bridgman C., Kiesel G. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum // *Am J. Vet Res.* – 1980. – Vol. 41, N10. – P. 1680–1681.
 17. Santori C., Di Veroli C., Di Lazzaro F. et al. High prevalence of thyroid dysfunction in primary hyperaldosteronism // *Recenti Prog Med.* – 2005. – Vol. 96, N 7–8. – P. 352–356.
 18. Sasaki M., Kato Y., Yamada H. et al. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2005. – Vol. 42. – P. 183–188.
 19. Till H., Stachel D., Muller-Hocker J. et al. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1998. – Vol. 8, №4. – P. 240–243.
 20. Unsicker K., Allmendinger A., Stoeckel E. et al. Development of adrenal chromaffin cells is largely normal in mice lacking the receptor tyrosine kinase c-Ret // *Mech. Dev.* – 2003. – Vol. 120, №3. – P. 299–304.
 21. Unsicker K., Huber K., Schutz G. et al. The chromaffin cell and its development // *Neurochem Res.* – 2005. – Vol. 30, №6–7. – P. 921–925.
 22. Villa S., Schutz I., Mainini E. et al. Probable role of obesity on the adrenal response to acute stimulation with adrenocorticotrophic hormone in eumenorrheic and hirsute, non-eumenorrheic women // *Minerva Endocrinol.* – 1993. – Vol. 18, №1. – P. 9–13.
 - Recombinant_albumin_%E2%80%9393_role_in_cryopreservation_and_cell[1].pdf (18.11.2012).
 7. Fahy G., Lilley T., Lindsell H. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // *Cryobiology.* – 1990. – Vol. 27, N3. – P. 247–268.
 8. Flevaris P., Stojanovich A., Gong H. et al. A molecular switch that controls cell spreading and retraction // *JCB.* – 2007. – Vol. 179, N3. – P. 553–565.
 9. Grill G., Porcellini A., Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoetic stem cells // *Cryobiology.* – 1980. – Vol. 17, N5. – P. 516–520.
 10. Hreinsson J., Zhang P., Swahn M. et al. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18, N11. – P. 2420–2428.
 11. Malinin G. Cytotoxic effect of dimethylsulfoxide on the ultrastructure of cultured Rhesus kidney cells // *Cryobiology.* – 1973. – Vol. 10, N1. – P. 22–32.
 12. Menorval M., Mir M., Fernandez L. et al. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells // *PLoS.* – 2012. – Vol. 7. – e41733.
 13. O'Hare M., Neville A. Morphological responses to corticotrophin and cyclic AMP by adult rat adrenocortical cells in monolayer culture // *J. Endocrinol.* – 1973. – Vol. 56, N3. – P. 529–536.
 14. Pogorelyi V. K., Turov V. V., Turov A. V. et al. Reaction of serum albumin with dimethyl sulfoxide according to PMR spectra of frozen aqueous solutions // *Theor. Exp. Chem.* – 1989. – Vol. 25, N1. – P. 93–97.
 15. Qi W., Ding D., Salvi R., Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures // *Hear Res.* – 2008. – Vol. 236. – P. 52–60.
 16. Rossi C., Bridgman C., Kiesel G. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum // *Am J. Vet Res.* – 1980. – Vol. 41, N10. – P. 1680–1681.
 17. Santori C., Di Veroli C., Di Lazzaro F. et al. High prevalence of thyroid dysfunction in primary hyperaldosteronism // *Recenti Prog Med.* – 2005. – Vol. 96, N 7–8. – P. 352–356.
 18. Sasaki M., Kato Y., Yamada H. et al. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2005. – Vol. 42. – P. 183–188.
 19. Till H., Stachel D., Muller-Hocker J. et al. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1998. – Vol. 8, N4. – P. 240–243.
 20. Unsicker K., Allmendinger A., Stoeckel E. et al. Development of adrenal chromaffin cells is largely normal in mice lacking the receptor tyrosine kinase c-Ret // *Mech. Dev.* – 2003. – Vol. 120, N3. – P. 299–304.
 21. Unsicker K., Huber K., Schutz G. et al. The chromaffin cell and its development // *Neurochem Res.* – 2005. – Vol. 30, N6–7. – P. 921–925.
 22. Villa S., Schutz I., Mainini E. et al. Probable role of obesity on the adrenal response to acute stimulation with adrenocorticotrophic hormone in eumenorrheic and hirsute, non-eumenorrheic women // *Minerva Endocrinol.* – 1993. – Vol. 18, N1. – P. 9–13.

