

## Влияние инкубации в гипертонических растворах хлорида натрия на изменения объема адренокортикоцитов и расположение в них липидных капель

UDC 57.043:612.018:577.3

T.A. YURCHUK<sup>1</sup>, N.A. CHERNOBAY<sup>2</sup>, G.A. BOZHOK<sup>2\*</sup>,  
I.F. KOVALENKO<sup>2</sup>, T.P. BONDARENKO<sup>2</sup>, L.F. ROZANOV<sup>2</sup>

## Effect of Incubation in NaCl Hypertonic Solutions on Changes of Adrenocorticytes' Volume and Arrangement of Lipid Droplets

Методами флюоресцентной и световой микроскопии изучали изменение клеточного объема и объема внутриклеточного пространства адренокортикоцитов (АК), в пределах которого располагаются липидные капли (ЛК), после воздействия гипертонических растворов NaCl. При регидратации из растворов NaCl с концентрациями 0,75 и 1 М в течение 20 мин объем клеток восстанавливался в среднем до 85% от исходного, а объем, занимаемый ЛК, – на 77 и 80% соответственно, т. е. наблюдалось запаздывание восстановления объема, занимаемого ЛК в АК. Предполагается, что приближение ЛК (депо холестерина) к месту синтеза гормонов в результате объемных изменений АК приводит к повышению уровня базального стероидогенеза после гипертонического воздействия.

**Ключевые слова:** адренокортикоциты, липидные капли, нильский красный, регидратация, дегидратация, стероидные гормоны.

Методами флуоресцентної та світлової мікроскопії вивчали зміни клітинного об'єму та об'єму внутрішньоклітинного простору адренокортикоцитів (АК), у межах якого розташовані ліпідні краплі (ЛК), після інкубації у гіпертонічних розчинах NaCl. При регідратації із розчинів NaCl з концентраціями 0,75 та 1М протягом 20 хв клітинний об'єм відновлювався в середньому на 85% від початкового, тоді як об'єм, який займають ЛК, – на 77 та 80 % відповідно. Спостерігалось запізнення відновлення об'єму, який займають ЛК в АК. Вірогідно, що наближення ЛК (депо холестерину) до місця синтезу гормонів у результаті об'ємних змін АК приводить до підвищення базального стероїдогенезу після гіпертонічного впливу.

**Ключові слова:** адренокортикоцити, ліпідні краплі, нільський червоний, регідратація, дегідратація, стероїдні гормони.

Volumetric changes of cells and adrenocorticytes' (AC) intracellular space, within the range of which lipid droplets (LD) located, after the effect of NaCl hypertonic solutions were studied by the fluorescence and light microscopy. Under re-hydration after effect of 0.75 and 1M NaCl solutions the cell volume recovered in average up to 85% of the initial one during 20 min, and the volume of the space, occupied with LD increased up to 77 and 80%, correspondingly, i. e. the delayed recovery of space, occupied with LD and AC was observed. It is suggested that approaching of LD (depot of cholesterol) to the site of hormone synthesis due to volumetric changes of AC results in the increase of basal steroidogenesis rate after hypertonic effect.

**Key words:** adrenocorticytes, lipid droplets, Nile red, re-hydration, dehydration, steroid hormones.

Криоконсервирование является способом хранения биологического материала для последующей коррекции патологических состояний путем трансплантации [1, 2], однако может приводить к изменению его функционального состояния и более выраженному компенсаторному эффекту в организме реципиента [1, 5].

Показано, что после размораживания криоконсервированных фрагментов органотипической культуры надпочечников повышается базальный уровень секреции стероидных гормонов адрено-

Cryopreservation is the method of biological material storage for further correction of pathological states by transplantation [1, 2], however, it may cause the change of its functional state and more expressed compensatory effect in the recipient organism [1, 5].

It has been shown that after freeze-thawing of cryopreserved fragments of adrenal organotypic culture the basal rate of steroid hormone secretion by adrenocorticytes (AC) increased [1]. This effect was also observed during incubation of AC suspension in NaCl hypertonic solutions [3, 5]. Whereas during cryo-

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: bozhokgaru@mail.ru

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: bozhokgaru@mail.ru

кортикоцитами (АК) [1]. Данный эффект также наблюдали при инкубации суспензии АК в гипертонических растворах NaCl [3, 5]. Поскольку в процессе криоконсервирования клетки подвергаются воздействию гиперосмотических растворов солей и криопротекторов, это может спровоцировать изменение формы и объема клеток, а также повлиять на гормоносинтезирующую функцию АК. Таким образом, дегидратация-регидратация клеток в гипертонических растворах NaCl может быть использована для моделирования влияния замораживания-отогрева на стероидогенный потенциал АК [3].

Для стероидпродуцирующих клеток не свойственно накопление стероидных гормонов, скорость секреции которых целиком определяется механизмами регуляции скорости биосинтеза [11]. Этапом, лимитирующим скорость биосинтеза стероидных гормонов, является превращение холестерина в прегненолон с участием фермента P450scc [10]. Под действием аденокортикотропного гормона запускается процесс переноса холестерина, который находится в липидных каплях (ЛК), к внутренней мембране митохондрий, где и происходят ферментативные превращения (рис. 1). Ключевым этапом стероидогенеза является сближение ЛК и митохондрий, при этом важную роль играют компоненты цитоскелета, в частности актиновые нити и микрофиламенты [6, 8, 9].

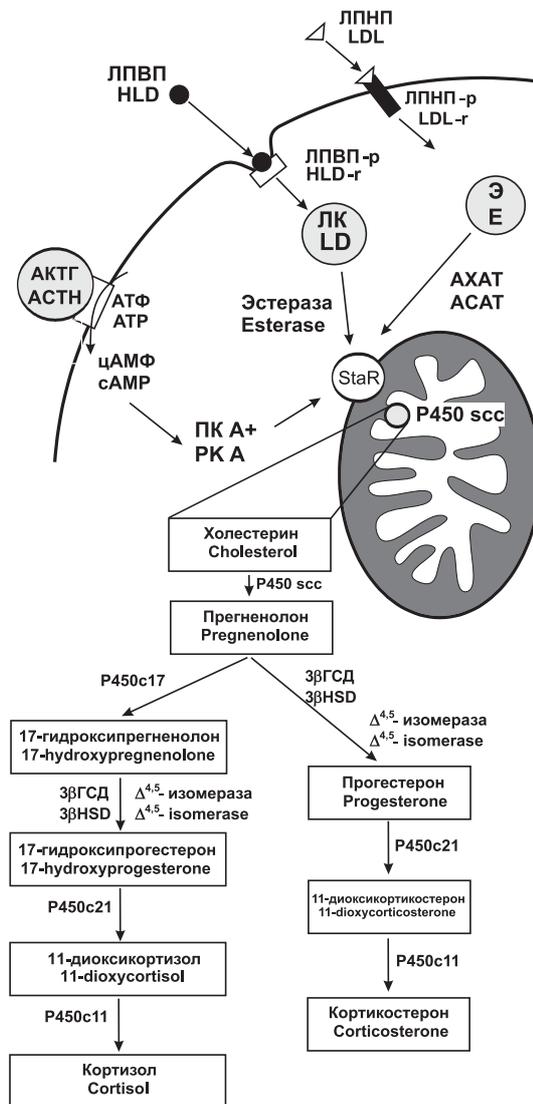
Вероятно, объемные изменения в АК, вызванные факторами криоконсервирования, а именно дегидратацией и регидратацией, влияют на структурно-функциональные свойства цитоскелета, и соответственно на расположение ЛК и транспорт холестерина к месту синтеза гормонов. Это может приводить к неспецифическому повышению базального стероидогенеза после криоконсервирования.

Цель работы – изучение влияния объемных изменений АК, вызванных гипертоническими растворами хлорида натрия и последующей регидратацией, на пространственное расположение ЛК в клетках.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями "Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1985).

В работе использовали суспензию клеток АК 3-месячных половозрелых крыс, полученную ферментативным способом. Для этого из извлеченных надпочечников под микроскопом отделяли корковый слой от медуллярного. Кортикальную ткань



**Рис. 1.** Схема синтеза стероидных гормонов в клетках надпочечников: ЛК – липидные капли; Э – эндосома; АХАТ – ацетилкоэнзим-А-холестеринацилтрансфераза.

**Fig. 1.** Diagram of synthesis of hormones in adrenal gland cells: LD – lipid droplets; E – endosome, ACAT – acetylcoenzyme-A-cholesterol acyltransferase.

preservation the cells are exposed to hyperosmotic salines and cryoprotectant solutions, this may cause the changes of cell shape and volume and affect hormone-synthesizing function of AC as well. Thus, dehydration and re-hydration of cells in NaCl hypertonic solutions may be used for modeling of freeze-thawing effect on steroidogenic potential of AC [3].

For steroid-producing cells the accumulation of steroid hormones, the secretion rate of which is absolutely determined with the mechanisms of regulation of biosynthesis rate, is not characteristic [11]. The stage, limiting biosynthesis rate of steroid hormones is a transformation of cholesterol to pregnenolone mediated by P450scc enzyme [10]. Adrenocorticotrophic hormone triggers the transfer of cholesterol, being situated in lipid droplets (LD) towards an interior membrane of

надпочечников помещали в среду 199 (“Биолот”, Россия) с ферментативным коктейлем, содержащим коллагеназу (1 мг/мл), DNase (0,1 мг/мл), на 15 мин при 37°C и постоянном встряхивании, диспергировали с помощью пастеровской пипетки и трижды отмывали от ферментативного раствора в среде 199 с 0,2%-м бычьим сывороточным альбумином путем центрифугирования в течение 3 мин при 1500 об/мин. Жизнеспособность определяли методом окрашивания клеток трипановым синим, в среднем в экспериментах она составила 75–80%.

Для изучения объема внутриклеточного пространства, в пределах которого располагаются ЛК, использовали флуоресцентный краситель нильский красный [7] с длиной волны возбуждения 488 нм, эмиссии – 530 нм (желто-зеленая область) и 590 нм (красная область). Нильский красный является липидным зондом и флуоресцирует в желто-зеленой области, когда растворен в ЛК, и красной области, связываясь с липидами цитоплазмы и мембраны. Для выявления мертвых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии использовали пропидий йодид. Окрашенные (мертвые) клетки исключили из анализа объемных изменений.

Клетки окрашивали нильским красным (10 мкг/мл) 15 мин при 37°C, отмывали, после чего окрашивали пропидий йодидом.

Суспензию АК помещали в 96-луночные планшеты (“Sarstedt”, Германия) с подложкой для прикрепления клеток. Клетки инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C и 5%-м содержании CO<sub>2</sub> в атмосфере. В эксперименте применяли растворы NaCl с концентрациями 0,5, 0,75 и 1 М. При микроскопических исследованиях использовали флуоресцентный микроскоп Axio Observer Z1 (“Carl Zeiss”, Германия). Клетки фотографировали при дегидратации и регидратации в фиксированных полях (для отслеживания изменений в одних и тех же клетках). Изменение клеточного объема и объема, занимаемого ЛК, измеряли с помощью приложения “Axio Vision Rel. 4.7” (“Carl Zeiss”, Германия). Осмотически неактивный объем определяли по методу [4].

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью t-теста Стьюдента и приложения Microsoft Excel. При  $p < 0,05$  отличия считали достоверными.

## Результаты и обсуждение

Окрашенные нильским красным ЛК были четко различимы внутри АК в желто-красном спектре флуоресценции (рис. 2).

Поскольку популяция клеток гетерогенна по размеру, то, построив кривую распределения Гаусса, мы определили, что диаметр основной части клеток составляет 13–18,5 мкм (рис. 3). Клетки данного размера использовали для дальнейшего анализа.

mitochondria, where enzymatic transformations take place (Fig. 1). The essential stage of steroidogenesis is the approaching of LD to mitochondria, herewith the components of cytoskeleton play an important role, particularly, actin filaments and microfilaments [6, 8, 9].

Seemingly, volumetric changes in AC due to cryopreservation factors such as dehydration and re-hydration change structural-functional properties of cytoskeleton, and correspondingly affect the location of lipid droplets and cholesterol transport to the site of hormone synthesis. It may result in non-specific increase of basal steroidogenesis after cryopreservation.

The research aim is to study the effect of volumetric changes of AC, induced by NaCl hypertonic solutions and further re-hydration on spatial arrangement of LD in the cells.

## Materials and methods

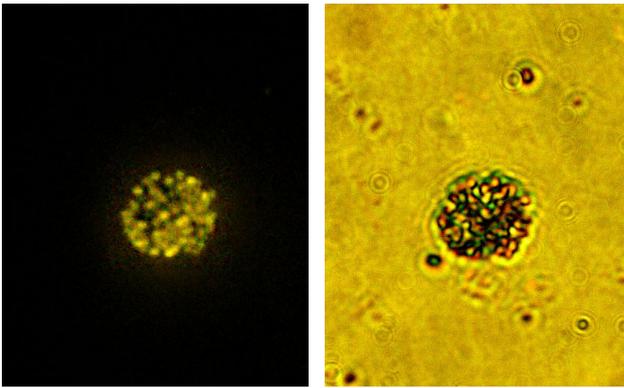
The experiments were performed according to the "General ethical principles of experiments in animals", approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2010) and agreed with the statements of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985).

In the work the AC cell suspension of 3 month-old mature rats, isolated by enzyme method was used. Herewith a cortical layer was isolated from medullar one from isolated adrenal glands under microscopic control. Adrenal cortical tissue was placed into medium 199 (Biolog, Russia) supplemented with enzyme cocktail with collagenase (1 mg/ml) and DNase (0,1 mg/ml) for 15 min at 37°C and constant shaking, then dispersed with Pasteur pipette and thrice washed-out from enzyme solution by medium 199 supplemented with 0.2% bovine serum albumin using centrifugation for 3 min at 1500 rpm. Viability was examined by cell staining with trypan blue, in average it made 75–80%.

For studying the volume of intracellular space, within the range of which the LD located the Nile red fluorescent dye was used [7]; the dye has excitation maximum of 488 nm, and two emission maxima of 530 nm (yellow-green zone) and 590 nm (red zone). Nile red is a lipid probe and fluoresces in yellow-green zone, when dissolved in LD and red zone, when bound with lipids of cytoplasm and membrane. Propidium iodide was used for revealing dead cells under fluorescent microscopy control. The stained (dead) cells were excluded from the further analysis of volumetric changes.

The cells were stained with Nile red (10 µg/ml) for 15 min at 37°C, washed-out, thereafter stained with propidium iodide.

AC suspension was placed into the 96 well plates (Sarstedt, Germany) with the substrate for cell adhesion. The cells were incubated for 1.5 hrs at 37°C and under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. 0.5, 0.75 and 1 M NaCl solutions were used in the experiment. During micro-



**Рис. 2.** Окрашивание суспензии АК нильским красным: флуоресцентная микроскопия(а); в проходящем свете (б). Ок. 10, об. 40.

**Fig. 2.** Staining of AC suspension with Nile red: fluorescent microscopy (a); in transmitted light (b); oc. 10, ob. 40

Полученную суспензию АК подвергали воздействию гипертонических растворов 0,5; 0,75 и 1 М NaCl. Минимальный объем АК в растворе 0,5 М NaCl составлял 62,2, в 0,75 М – 60,9, а в 1 М – 57,6% от первоначального. Время достижения минимального объема для раствора с концентрацией 0,5 М достигало  $80 \pm 3$  с; 0,75 М –  $19 \pm 2$  с; 1 М –  $13 \pm 2$  с. Объем, занимаемый ЛК, уменьшался до 65,7; 64 и 62% в соответствующих гипертонических растворах. Таким образом, тенденция изменения объема клеток и объема, занимаемого ЛК, в гипертоническом ряду была одинакова (рис. 4, а).

Через 20 мин после возвращения клеток в изотоническую среду из раствора 0,5 М NaCl объем клеток и объем, занимаемый ЛК, восстанавливались до 85,8% от первоначального. При переносе АК из 0,75 М раствора NaCl в изотонию объем клеток составил 86,4%, а объем, занимаемый ЛК, – 80,7%; при переносе из 1 М раствора NaCl объем клеток составил 85%, а объем, занимаемый ЛК, – 77,6% от первоначального (рис. 4, б).

Таким образом, восстановление объема, занимаемого ЛК, запаздывало по отношению к объему клеток при регидратации из гипертонических растворов NaCl с концентрациями 0,75 и 1 М.

Ранее было показано [3], что при инкубации суспензии АК в растворе 0,8 М NaCl происходит повышение уровня базальной секреции стероидных гормонов. При анализе изменения клеточного объема и объема, занимаемого ЛК (при наблюдении за единичной клеткой), отмечено, что при регидратации АК в течение определенного времени объем клетки восстанавливается быстрее по сравнению с восстановлением объема, занимаемого ЛК. Предположительно пространственное сближение ЛК и митохондрий (место синтеза стероидных гормонов) при дегидратации и замедленная реакция

scopic studies the Observer Z1 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany) was used. The cells were imaged in the fixed visual field (to trace the single cells) under re-hydration and dehydration. Volumetric changes in cells and space, occupied with LD were measured with AxioVision Rel.4.7 (Carl Zeiss, Germany). Osmotically inactive volume was established by the method [4].

Statistical processing of the obtained results was carried-out with Student's t-criterion and Microsoft Excel software. The differences were significant at  $p < 0.05$ .

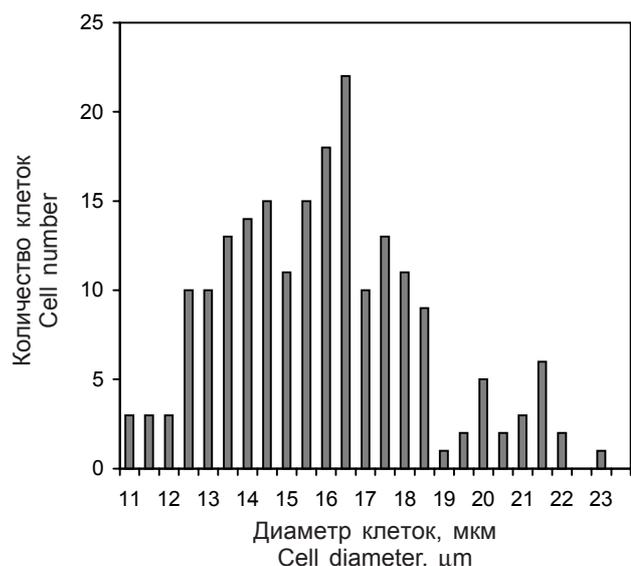
## Results and discussion

When staining with Nile red the LD in AC were clearly visualized in yellow-red bandwidth (Fig. 2).

The cell population is size heterogenic, and after plotting the Gauss distribution curve we marked the diameters of main part of cells (13–18.5 mm). The cells of these sizes were used for further analysis (Fig. 3).

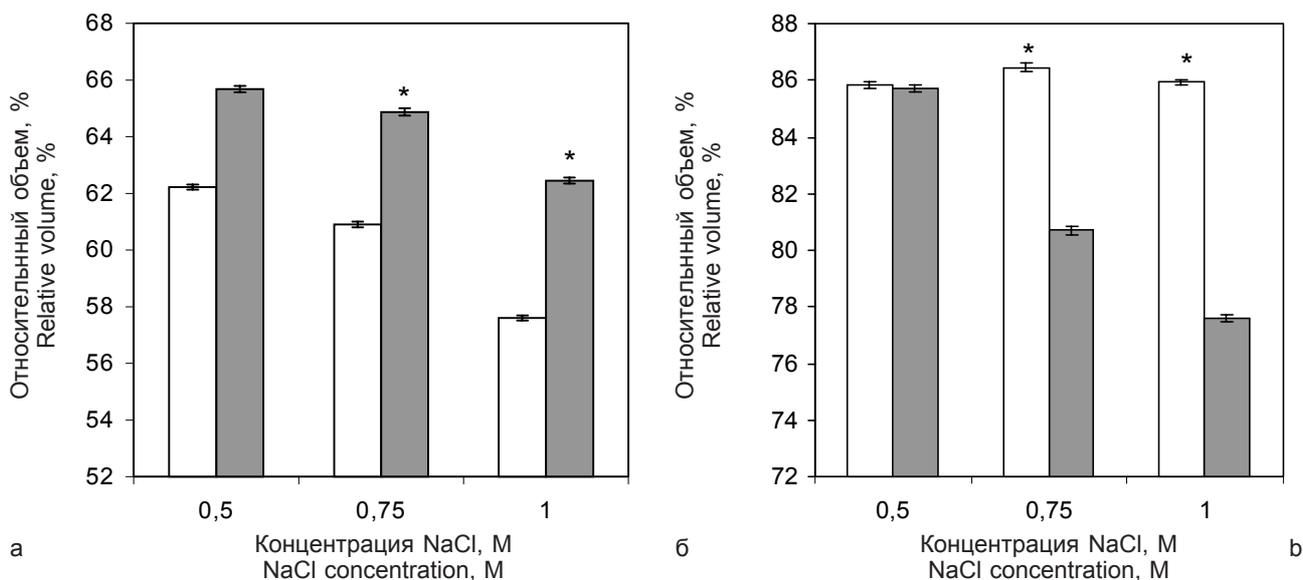
The derived suspension of AC was exposed to 0.5, 0.75 and 1 М NaCl hypertonic solutions. Minimum volume of AC in 0.5 М NaCl solution made 62.2, in 0.75 М did 60.9, and in 1 М did 57.6% of the initial volume. Time of reaching minimum volume in 0.5 М solution was  $80 \pm 3$  sec; in 0.75 М it was  $19 \pm 2$  sec; and in 1 М it was  $13 \pm 2$  sec. The space, occupied with LD shrank down to 65.7; 64; 62% in corresponding hypertonic solutions. Thus, the tendency of changes in cell volume and the volume of the space, occupied with LD in hypertonic series was similar (Fig. 4, a).

In 20 min after returning the cells into isotonic medium from 0.5 М NaCl solution the cell volume and the volume of the space, occupied with LD recovered up to 85.8% of the initial one. When transferring the AC



**Рис. 3.** Распределение диаметров АК.

**Fig. 3.** Distribution of AC diameters.



**Рис. 4.** Влияние дегидратации (а) и регидратации (б) на объемные изменения клеток (□) и объема, занимаемого ЛК (■); \* – отличия достоверны относительно объема, занимаемого ЛК при тех же условиях ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 4.** Effect of dehydration (a) and re-hydration (b) on volumetric changes of cells (□) and the volume, occupied with LD (■); \* – the differences are significant relative to volume, occupied with LD under the same conditions ( $p < 0.05$ ).

восстановления их первоначально занимаемого объема при регидратации, могут приводить к неспецифической активации базальной секреции гормонов.

### Выводы

1. Инкубация АК в гипертонических растворах NaCl влияет на объем клетки и объем, занимаемый ЛК.

2. При регидратации АК в течение 20 мин из растворов NaCl с концентрациями 0,5; 0,75 и 1 М объем клеток в среднем достигает 85% от исходного.

3. При регидратации АК в течение 20 мин из раствора NaCl с концентрацией 0,5 М объем, занимаемый ЛК, восстанавливается в среднем до 85% от первоначального, тогда как после инкубации в растворах 0,75 и 1 М NaCl восстановление запаздывает (80 и 77% от исходного соответственно).

4. Уменьшение объема, занимаемого ЛК, после дегидратации АК из растворов 0,75 и 1 М NaCl, возможно, оказывает неспецифический стимулирующий эффект на базальный синтез стероидных гормонов.

### Литература

1. Бондаренко Т.П., Самченко И.И., Божок Г.А., Алабедаль-карим Н.М. Гормоносекретирующая способность криоконсервированной органной культуры надпочечников новорожденных поросят *in vivo* и *in vitro* // Проблемы сучасної медичної науки та освіти.– 2002.– №3.– С. 35–37.

from 0.75 M NaCl solution into isotonic conditions the cell volume made 86.4%, and the volume of the space, occupied with LD did 80.7%; when transferring AC from 1 M NaCl solution the cell volume made 85%, and the volume of the space, occupied with LD did 77.6% of the initial one (Fig. 4, b).

Thus, volumetric recovery of the space, occupied with LD delayed in respect of cell volume under re-hydration after reversion from NaCl 0.75 and 1 M hypertonic solutions.

It was shown earlier [3] that during incubation of AC suspension in 0.8 M NaCl solution the increase of basal secretion level of steroid hormones was observed. When analyzing the data about volumetric changes for cells and the space occupied with LD there was noted that under re-hydration of AC during certain time the cell volume recovered faster if compared with the space, occupied with LD. Spatial approaching of LD to mitochondria (synthesis site of steroid hormones) during dehydration and slow reversion of their spatial distribution during re-hydration may likely lead to a non-specific activation of basal secretion of hormones.

### Conclusions

1. Incubation of AC in NaCl hypertonic solutions affects the volume of cells and the space occupied by LD.

2. During re-hydration of AC after reversion from NaCl solutions with the concentrations of 0.5; 0.75 and 1 M the cell volume in average reaches 85% of initial one in 20 min.

3. During re-hydration of AC after reversion from NaCl solution with the concentration of 0.5 M the vol-

2. Грищенко В.І., Бондаренко Т.П., Легач, Є.І. та ін. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування органної культури наднирників новонароджених поросят в лікуванні недостатності наднирників: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 12 с.
3. Дудецкая Г.В., Устиченко В.Д. Регидратированные адренортикоциты как модель кріоконсервированных стероидпродуцирующих клеток // Проблемы кріобиологии.– 2006.– Т. 16, №4.– С. 432.
4. Чернобай Н.А., Коваленко И.Ф., Божок Г.А. и др. Осмотическое поведение клеток интерстиция тестисов в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400 // Проблемы кріобиологии.– 2010.– Т. 20, №1.– С.83–87.
5. Устиченко В.Д. Морфофункціональні характеристики клітин надниркових залоз при дії різних режимів заморожування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 2006.– 20 с.
6. Cote M., Payet M. D., Gallo-Payet N. Association of s-subunit of the Gs protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells // Endocrinology.– 1997.– Vol. 138, N1.– P. 69–78.
7. Greenspan P., Mayer E.P. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets // J. Cell Biol.– 1985.– Vol. 100, N3.– P. 965–973.
8. Hall P.F., Almahbobi G. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis // Microsc. Res. Tech.– 1997.– Vol. 36, N6.– P. 463–479.
9. Hall P.F., Charpponier C. The role of microfilaments in the response of adrenal tumor cells to adrenocorticotropin hormone // J. Biol. Chem.– 1979.– Vol. 254, N18.– P. 9080–9084.
10. Jefcoate C. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex // J. Clin. Invest.– 2002.– Vol. 110, N7.– P. 881–890.
11. Kacsoh B. Endocrine physiology.– New York: McGraw-Hill, 2000.– 741 p.

Поступила 17.08.2010  
Рецензент И.В. Белочкина

ume of the space occupied by LD, recovers in average up to 85% of the initial value during 20 min, whilst after incubation in 0.75 and 1 M NaCl solutions the certain delay is observed (80 and 77%, correspondingly).

4. Shrinkage of the space occupied by LD after dehydration of AC in 0.75 and 1M NaCl solutions probably renders non-specific stimulating effect on basal synthesis of steroid hormones.

## References

1. Bondarenko T.P., Samchenko I.I., Bozhok G.A., Alabedalka-rim N.M. Hormone-secreting ability of cryopreserved organ culture of adrenal glands of newly born piglets *in vivo* and *in vitro* // Problemy Suchasnoi Medychnoi Nauky ta Osvity.– 2002.– N3.– P. 35–37.
2. Grischenko V.I., Bondarenko T.P., Legach E.I. et al. Procurement, cryopreservation and clinical use of organ culture of adrenal glands of newly born piglets in treatment of deficiency of adrenal glands: Methodical recommendations.– Kharkiv, 2000. – 12 p.
3. Dudetskaya G.V., Ustichenko V.D. Rehydrated adrenocortico-cytes as model of cryopreserved steroid-producing cells // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N4.– P. 432.
4. Chernobay N.A., Kovalenko I.F., Bozhok G.A. et al. Osmotic behavior of testes interstitium cells in hypertonic solutions of NaCl and PEO-400 // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N1.– P. 83–87.
5. Ustichenko V.D. Morphofunctional characteristics of cells of adrenal glands under the effect of different freezing regimens: Author's abstract of the thesis of cand. of biol. sciences.– Kharkiv, 2006.– 20 p.
6. Cote M., Payet M. D., Gallo-Payet N. Association of s-subunit of the Gs protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells // Endocrinology.– 1997.– Vol. 138, N1.– P. 69–78.
7. Greenspan P., Mayer E.P. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets // J. Cell Biol.– 1985.– Vol. 100, N3.– P. 965–973.
8. Hall P.F., Almahbobi G. Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis // Microsc. Res. Tech.– 1997.– Vol. 36, N6.– P. 463–479.
9. Hall P.F., Charpponier C. The role of microfilaments in the response of adrenal tumor cells to adrenocorticotropin hormone // J. Biol. Chem.– 1979.– Vol. 254, N18.– P. 9080–9084.
10. Jefcoate C. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex // J. Clin. Invest.– 2002.– Vol. 110, N7.– P. 881–890.
11. Kacsoh B. Endocrine physiology.– New York: McGraw-Hill, 2000.– 741 p.

Accepted in 17.08.2010