

УДК 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

Т.А. Юрчук*, Г.А. Божок, Н.М. Алабедалькарим, Т.П. Бондаренко

Функциональная активность адренокортикоцитов крыс после инкубации в криозащитных средах на основе ДМСО, содержащих эмбриональную телячью сыворотку

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

T. A. Yurchuk*, G. A. Bozhok, N. M. Alabedalkarim, T. P. Bondarenko

Functional Activity of Rat Adrenocorticocytes after Incubation in Dimethyl Sulfoxide Based Cryoprotective Media Supplemented with Fetal Bovine Serum

Реферат: Изучение функционального состояния клеток на различных этапах криоконсервирования необходимо для создания и усовершенствования протоколов замораживания эндокринных клеток. В работе оценивали влияние инкубации в средах с 5, 7, 10 и 15% диметилсульфоксида (ДМСО), а также в средах с ДМСО и 25% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) на показатели суспензии клеток коры надпочечников: жизнеспособность (МТТ-тест), содержание клеток с активной 3 β -гидроксистероиддегидрогеназой, функционально активными митохондриями (тест с JC-1), а также уровень базальной и стимулированной секреции альдостерона. Показано, что присутствие ЭТС в составе криозащитной среды приводило к снижению токсического действия ДМСО на адренокортикоциты во время инкубации, более того, в некоторых случаях после инкубации в средах с ДМСО и ЭТС наблюдалось увеличение содержания клеток с функционально активными митохондриями и клеток с активным стероидогенезом по сравнению с суспензией клеток, не подвергавшихся воздействию криопротектора.

Ключевые слова: адренокортикоциты, диметилсульфоксид, эмбриональная телячья сыворотка, альдостерон, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа, JC-1.

Реферат: Вивчення функціонального стану клітин на різних етапах криоконсервування є важливим для створення та удосконалення протоколів заморожування ендокринних клітин. У роботі оцінювали вплив інкубації в середовищах з 5, 7, 10 та 15% диметилсульфоксиду (ДМСО), а також у середовищах з ДМСО та 25% ембріональної телячої сироватки (ЕТС) на показники суспензії клітин кори наднирників: життєздатність (МТТ-тест), вміст клітин з активною 3 β -гидроксистероїддегідрогеназою, функціонально активними мітохондріями (тест з JC-1), а також рівень базальної та стимульованої секреції альдостерону. Показано, що присутність ЕТС у складі криозахисного середовища призводила до зниження токсичної дії ДМСО на адренокортикоцити під час інкубації, більш того, в деяких випадках після інкубації в середовищах із ДМСО й ЕТС спостерігалось збільшення вмісту клітин з функціонально активними мітохондріями та клітин з активним стероїдогенезом у порівнянні з суспензією клітин, що не піддавалися впливу криопротектора.

Ключові слова: адренокортикоцити, диметилсульфоксид, ембріональна теляча сироватка, альдостерон, 3 β -гидроксистероїддегідрогеназа, JC-1.

Abstract: Investigation of functional state of cells at various stages of cryopreservation is important for the development and improvement of freezing protocols of endocrine cells. This study assessed the effect of incubation in media with 5, 7, 10, and 15% dimethyl sulfoxide (DMSO), as well as the media with DMSO and 25% fetal bovine serum (FBS) on some indices of adrenal cortex cell suspension: viability (MTT-test), content of cells with active 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, functionally active mitochondria (JC-1 test), as well as the level of basal and stimulated aldosterone secretion. It was shown that presence of FBS in a cryoprotective medium reduced the toxic effect of DMSO on adrenocorticocytes during incubation, furthermore in some cases incubation in media with DMSO and FBS led to the increase in the number of cells with functionally active mitochondria and cells with active steroidogenesis if compared with the suspensions with cells not exposed to cryoprotectant solution.

Key words: adrenal cortex cells, dimethyl sulfoxide, fetal bovine serum, aldosterone, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, JC-1.

В настоящее время альтернативой применения синтетических препаратов кортикостероидов при гипокортицизме является трансплантация суспензии клеток или фрагментов ткани надпочечников [1, 15]. Преимущества этого метода состоят в том, что трансплантат способен «регламентировать»

Current alternative for synthetic drugs administration at hypocorticism is transplantation of adrenal cell suspension or tissue fragments [5, 11]. Advantage of such an approach is that the graft is able to trigger the synthesis of glucocorticoids in response to the production of tropic hormones of the hypothalamic-pituitary system

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

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: tais_jazz@mail.ru

Поступила 26.11.2013
Принята в печать 10.02.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 47–56.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Biochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems, 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 3737435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: tais_jazz@mail.ru

Received November 26, 2013
Accepted February 10, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(1): 47–56.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

синтез глюкокортикоидов в ответ на выработку тропных гормонов гипоталамо-гипофизарной системой и не вызывает вторичной надпочечниковой недостаточности, которая развивается вследствие угнетения функции собственных желез больных. Если от момента получения до применения трансплантационный материал хранить в гипотермических условиях, в тканях развиваются ишемические повреждения и срок хранения ограничен несколькими часами [4, 16, 26]. Применение сверхнизких температур позволяет увеличить срок хранения материала и его использование в подходящий для пациента момент.

Разрабатываемые протоколы криоконсервирования клеток и тканей надпочечников должны обеспечивать сохранение их структурно-функциональных свойств, и, прежде всего, стероидогенной активности. Решение данной задачи возможно путем минимизации повреждающих факторов на всех этапах криоконсервирования. Этап инкубации клеток в криозащитных растворах может сопровождаться изменением их объема, механическими напряжениями на мембране, нарушениями ее проницаемости, трансформацией структуры.

Для криоконсервирования эндокринных клеток в качестве криопротектора широко применяется раствор диметилсульфоксида (ДМСО) в различных концентрациях [8, 13, 14, 22, 24]. Установлено, что добавление эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в криозащитную среду позволяет сохранить больше жизнеспособных клеток после замораживания-отогрева [5, 27]. Однако до сих пор не установлено, на каком этапе криоконсервирования реализуется положительный эффект ЭТС, и как в него вовлечен гормонопоз – специфическая функция эндокринных клеток.

Известно, что основной этап синтеза стероидных гормонов в клетках коры надпочечников (ККН) происходит в митохондриях и для его реализации важно сохранение митохондриями мембранного потенциала. Показано, что после замораживания-отогрева адренокортикоцитов (АК) в средах на основе ДМСО и ЭТС увеличивалось количество клеток с высоким потенциалом на мембране митохондрий [6]. При этом вклад этапа инкубации с криозащитными растворами в эти изменения не определен.

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось изучение некоторых функциональных показателей клеток коры надпочечников крыс после их инкубации в бессывороточных и сывороткосодержащих криозащитных средах с разной концентрацией ДМСО.

and does not causes a secondary adrenal insufficiency, which develops due to inhibition of patient's own glands function. If the storage of the samples from their procurement till the transplantation is performed in hypothermic conditions, the tissue will suffer from ischemic damage and the storage period can not exceed few hours [12, 19, 25]. Application of ultra-low temperatures may prolong the period of graft storage and allows its use in the time appropriate for the patient.

Protocols developed for cryopreservation of adrenal gland cells and tissues should ensure the preservation of their structural and functional properties, and above all, steroidogenic activity. The solution to this problem is possible by minimizing the damaging effects at all steps of cryopreservation. Actually, the step of cells incubation in the cryoprotective solutions may be accompanied by a change in their volume, mechanical stresses on the membrane, its permeability disorders, transformations in cell structure.

Cryopreservation of endocrine cells involves widely as cryoprotectant the solution of dimethyl sulfoxide (DMSO) in various concentrations [2, 9, 10, 21, 23]. The addition of fetal bovine serum (FBS) in cryoprotective media was shown to preserve more viable cells following freeze-thawing [20, 26]. However, it has been not been established so far, which step of cryopreservation is a point of application of FBS positive effects and how these effects are associated with hormonopoiesis, as a specific function of endocrine cells.

It is known that the main step of steroid hormones synthesis inside the adrenal cortex cells (ACCs) occurs in mitochondria, and its implementation is coupled tightly with mitochondrial membrane potential. Following freeze-thawing of adrenocorticoocytes (ACs) in the media based on DMSO and supplemented with FBS an increased number of cells with a high mitochondrial membrane potential was found [27]. However, the contribution of the step of incubation in cryoprotectant solutions to these changes is not clear.

In view of the aforesaid, the aim of this work was to study the functional parameters of rat adrenal cortex cells following incubation in serum-free and serum-containing cryoprotective media with different concentrations of DMSO.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).



Материалы и методы

Работу выполняли 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, 1986).

Для проведения исследований использовали суспензию ККН 3-месячных половозрелых крыс, полученную ферментативным способом. Под микроскопом МБС-10 отделяли кортекс надпочечников от медулы и помещали в среду ДМЕМ («РАА», Австрия) с трипсином («Sigma», США), инкубировали 15 мин (37°C) при постоянном встряхивании. Далее биообъект диспергировали с помощью пастеровской пипетки и трижды отмывали от ферментативного раствора в среде ДМЕМ с 0,2%-м бычьим сывороточным альбумином («Sigma») путем центрифугирования в течение 3 мин при 1000g.

В экспериментах использовали криозащитные среды, приготовленные на основе ДМЕМ, содержащие ДМСО, а в некоторых случаях ЭТС. Криозащитные среды добавляли в 5 этапов, а именно: к 500 мкл суспензии клеток надпочечников добавляли по 100 мкл раствора ДМСО с интервалом 1 мин, затем инкубировали 20 мин при 22°C. Конечная концентрация ДМСО в суспензии составляла 5, 7, 10 и 15%, а ЭТС – 25% [5, 6]. Контролем служила свежeweделенная суспензия АК, которую разбавляли в 2 раза ДМЕМ без криопротектора. Для удаления криозащитных сред последовательно добавляли аликвоты отмывочного раствора на основе ДМЕМ с 10% ЭТС, по 500, 500, 1000, 2000 мкл с интервалом 1 мин, затем центрифугировали в течение 3 мин при 1000g.

Метаболическую активность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [10, 12]. Для этого к 500 мкл суспензии клеток с концентрацией 2×10^6 кл/мл добавляли 50 мкл МТТ-реактива – диметилтиазолдифенилтетразолиумбромид («Sigma») с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали 3 ч при 37°C. Далее клетки центрифугировали 3 мин при 1000g, осадок ресуспендировали в 500 мкл ДМСО, тщательно пипетировали и инкубировали еще 15 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью колориметра КФК-2-УХЛ4.2 (СССР) при длине волны 540 нм.

Активность фермента 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -ГСД) в суспензии ККН определяли с помощью гистохимического окрашивания [7]. Для этого суспензию клеток инкубировали в 2,5 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2), содержащего 0,2 мг/мл нитротетразолиевого синего («Chemapol», Чехия), 1 мг/мл НАД («Fluka», Индия) и

The research involved ACC suspension of 3-month adult rats obtained by enzymatic technique. Using the MBS-10 microscope to control the operation the adrenal cortex was separated from medulla and placed in DMEM medium (PAA, Austria) supplemented with trypsin (Sigma, USA) and incubated for 15 min (37°C) with constant agitation. Thereafter the specimen was dispersed using a Pasteur pipette and thrice washed free of the enzymatic solution with DMEM with 0.2% bovine serum albumin (Sigma) using centrifugation for 3 minutes at 1000g.

The experiments involved cryoprotective medium prepared on the basis of DMEM containing DMSO and in some cases supplemented with FBS. Cryoprotective medium was added to the cells in 5 steps, *i. e.* to 500 μ l of adrenal cell suspension DMSO solution was added 5 times by 100 μ l with 1 min interval and then incubated for 20 min at 22°C. The final DMSO concentrations in the suspension were 5, 7, 10 and 15%, and FBS content made 25% [20, 27]. As the control served fresh AC suspension diluted twice with DMEM without any cryoprotectant. To remove the cryoprotective media the samples were sequentially diluted with aliquots of wash solution based on DMEM supplemented with 10% FBS: 500, 500, 1000, and 2000 μ l, with 1 min interval in between, and then centrifuged for 3 min at 1000g.

Metabolic activity of the cells was evaluated by MTT assay [4, 8]. To do this, 500 μ l cell suspension with a concentration of 2×10^6 cells/ml were mixed with 50 μ l of MTT reagent, dimethylthiazole difenyltetrazolium bromide (Sigma) at a concentration of 5 mg/ml and incubated for 3 h at 37°C. The cells were then centrifuged for 3 min at 1000g, the sediment was resuspended in 500 μ l DMSO, carefully pipetted and incubated for another 15 min at room temperature. The absorbance of samples was measured using a colorimeter KFK-2-UHL4.2 (USSR) at 540 nm.

Activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) enzyme in ACC suspension was assessed histochemically [1]. The cell suspension was incubated in 2.5 ml phosphate buffer solution (pH 7.2) containing 0.2 mg/ml nitro blue tetrazolium (Chemapol, Czech Republic), 1 mg/ml NAD (Fluka, India), 0.12 mg/ml dehydroepiandrosterone (Sigma) for 90 min at 37°C. Nitro blue tetrazolium is reduced in the presence of equivalents, the reaction substrate and active 3 β -HSD. As a result, positively stained cells acquire a violet color. Calculation of 3 β -HSD⁺ cells in each case was carried out in 10 vision fields using XYL-403 microscope (AmScope, China) at $\times 400$, and expressed as a percentage of total cell number. Average number of cells in the vision field was 30.

To assess mitochondrial potential the ACCs were stained for 30 min with a potential dependent fluores-



0,12 мг/мл дегидроэпиандростерона («Sigma») в течение 90 мин при 37°C. Нитротетразолиевый синий восстанавливается в присутствии эквивалентов и субстрата реакции, а также активной 3β-ГСД. В результате позитивно окрашенные клетки приобретали фиолетовую окраску. Подсчет 3β-ГСД⁺-клеток в каждом случае осуществляли в 10 полях зрения с помощью микроскопа XYL-403 («AmScope», Китай) при ×400 и выражали в процентном соотношении к общему количеству клеток. Среднее количество клеток в поле зрения составляло 30.

Для оценки митохондриального потенциала ККН окрашивали в течение 30 мин потенциалзависимым флуоресцентным катионным красителем JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид) (10 мкг/мл) при 37°C в среде ДМЕМ без фенолового красного («Sigma») [9], затем дважды отмывали этой же средой. Флуоресценцию ККН, окрашенных JC-1, исследовали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Полученные данные анализировали с помощью программы WinMDI.

Для краткосрочного культивирования суспензию клеток помещали на коллагеновую подложку в среду ДМЕМ с 10% ЭТС. Каждый из образцов делили на две части, к одной из которых в качестве стимулятора стероидогенеза добавляли 1мМ дбцАМФ (дибутирил производного цАМФ «Sigma»), далее их культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 24 ч собирали надосадок и оценивали базальный и стимулированный уровень секреции альдостерона. Содержание гормона измеряли в инкубационной среде радиоиммунологическим методом с помощью тест-набора «RIA Aldosterone» («Immunotech», Чехия) и нормировали на количество клеток в пробе.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение. Различия между данными считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Инкубация суспензии ККН в 15%-м растворе ДМСО сопровождалась снижением уровня восстановления МТТ, что может косвенно свидетельствовать об уменьшении количества функционально активных клеток (рис. 1). В остальных средах показатель оставался на уровне контрольных значений. Если в криозащитных средах присутствовал ЭТС, то статистически значимых изменений уровня восстановления МТТ-реактива по сравнению с контролем после инкубации во всех исследуемых образцах не наблюдали.

cent cationic dye JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazol carbocyanine iodide, 10 μg/ml) at 37°C in phenol red free DMEM (Sigma) [3], and then washed twice with this same medium. Fluorescence of ACCs stained with JC-1 was examined by FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA). The data obtained were analyzed using WinMDI.

For short-term culture the cell suspension was placed on a collagen bed with DMEM supplemented with 10% FBS. Each sample was divided into two portions, in one half a steroidogenesis stimulating agent 1mM dbcAMF (dibutyl cAMP derivative, Sigma) was introduced, then all samples were cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. After 24 hrs the medium was collected and basal and stimulated secretion of aldosterone was evaluated. Hormone content in the incubation medium was measured by radioimmune assay using RIA Aldosterone test kit (Immunotech, Czech Republic) and normalized to the number of cells in the sample.

Statistical analysis was performed using ANOVA and Student t-test. Data are presented as mean ± standard deviation. Differences between the data were considered significant if $p < 0.05$.

Results and discussion

Incubation of ACC suspension in 15% DMSO solution resulted in a decreased MTT recovery level, which might indirectly indicate a smaller number of functionally active cells (Fig. 1). In other media the index remained at the control level. If cryoprotective media contained FBS, no significant changes in the MTT recovery were found in all the tested samples following incubation as compared to the control.

Functional status of steroidogenic cells could also be determined by estimating the amount of 3β-HSD⁺ cells [7]. It can be seen that the amount of 3β-HSD⁺ cells depended on the composition of the medium in which incubation occurred (Fig. 2). For instance, following the incubation in 7% DMSO solution the analyzed index was higher than the control, and reached 65% on average, in the case of 15% DMSO it decreased to almost 35%, and at 10% concentration it was not significantly different from the control group. In the samples incubated in the presence of FBS the amount of 3β-HSD⁺ cells in the media containing 10 and 15% DMSO was significantly higher both than the values obtained in a corresponding serum free media, and than the level control. In other media the numbers of 3β-HSD⁺ cells was not significantly higher than the control ones.

Since the main step of steroid hormone synthesis occurs in mitochondria [14, 16], their membrane potential ($\Delta\psi_m$) may also serve as indicator of steroidogenic cells function. Presence of $\Delta\psi_m$ could be established



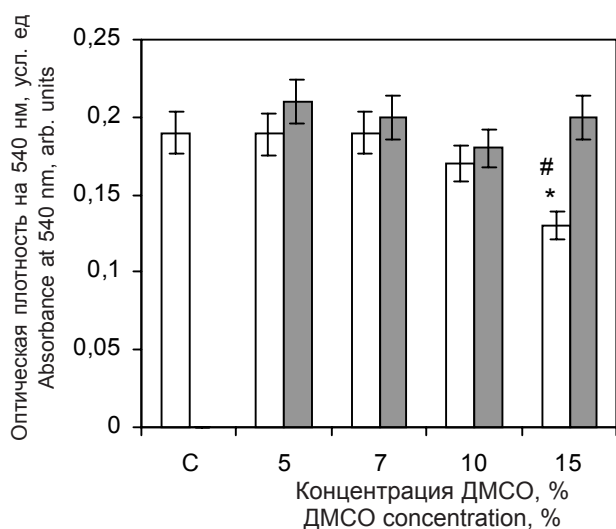


Рис. 1. Функциональная активность (оптическая плотность на длине волны 540 нм после реакции с МТТ) в суспензиях клеток коры надпочечников, подвергнутых 20-минутной инкубации в средах с ДМСО и ЭТС: □ – без ЭТС; ■ – с 25% ЭТС; С – контроль, свежевыведенная суспензия ККН; * – отличия статистически значимы относительно контрольных значений, $p < 0,05$; # – относительно показателей в среде с ЭТС и равной концентрацией ДМСО, $p < 0,05$.

Fig. 1. Functional activity (absorbance at 540 nm following reaction with MTT) in suspension of adrenal cortex cells, subjected to 20-minute-long incubation in media with DMSO and FBS: □ – without FBS; ■ – with 25% FBS; C – control, fresh ACC suspension; * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$; # – if compared with the data of medium with FBS and equal concentration of DMSO, $p < 0.05$.

Функциональное состояние стероидпродуцирующих клеток можно определить также с помощью оценки количества 3β -ГСД⁺-клеток [11]. Видно, что количество 3β -ГСД⁺-клеток зависело от состава среды, в которой происходила инкубация (рис. 2). Так, после инкубации в растворе с 7% ДМСО исследуемый показатель был выше, чем в контроле, и достигал в среднем 65%, в случае 15% ДМСО – снижался почти до 35%, а при концентрации 10% достоверно не отличался от контрольной группы. В образцах, инкубированных в присутствии ЭТС, количество 3β -ГСД⁺-клеток в средах с 10 и 15% ДМСО значимо превышало показатель, полученный как в бессывороточных средах, так и контрольный. В других средах количество 3β -ГСД⁺-клеток значимо не превышало контрольные показатели.

Поскольку основной этап синтеза стероидных гормонов происходит в митохондриях [18, 20], их мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) также может служить функциональным показателем стероидогенных клеток. Наличие $\Delta\psi_m$ можно установить с помощью окрашивания JC-1 [9]. Функционально

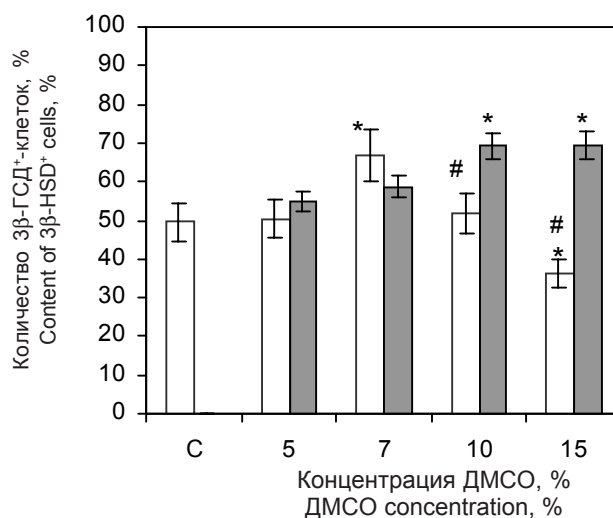


Рис. 2. Содержание 3β -ГСД⁺-клеток в суспензиях клеток коры надпочечников, подвергнутых 20-минутной инкубации в средах с ДМСО и ЭТС: □ – без ЭТС; ■ – с 25% ЭТС; С – контроль, свежевыведенная суспензия ККН; * – отличия статистически значимы относительно контрольных значений, $p < 0,05$; # – относительно показателей в среде с ЭТС и равной концентрацией ДМСО, $p < 0,05$.

Fig. 2. Content of 3β -HSD⁺ cells in suspension of adrenal cortex cells, subjected to 20-minute-long incubation in media with DMSO and FBS: □ – without FBS; ■ – with 25% FBS; C – control, fresh ACC suspension; * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$; # – if compared with the data of medium with FBS and equal concentration of DMSO, $p < 0.05$.

using JC-1 staining [3]. Functionally active cells would have double (green and orange) fluorescence [22, 24].

The data presented in Fig. 3 show that incubation in medium containing 7% DMSO led to an increase of the amount of cells with double fluorescence if compared to the control, and to reduction in case of 15% DMSO concentration. In other two cases, the number of cells with double JC-1 fluorescence was not significantly different from the control group. After incubation in the presence of FBS the number of cells with double fluorescence in case of 10 and 15% DMSO was significantly higher both than the control, and than corresponding serum-free media; in the other two cases it remained at the level shown for FBS free media.

Another important index of ACC functional activity is the level of basal and stimulated hormone production. As an indicator of hormone production in the present study we determined the secretion of aldosterone, the main mineralocorticoid hormone of the adrenal cortex. Basal secretion of aldosterone in ACCs decreased significantly after incubation in all serum-free cryoprotective media, except the one with 10% DMSO (Fig. 4A). The presence of FBS in the incubation me-

активные клетки будут иметь двойную (зеленую и красно-оранжевую) флуоресценцию [23, 25].

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что после инкубации в среде, содержащей 7% ДМСО, количество клеток с двойной флуоресценцией по сравнению с контролем увеличивалось, а при повышении концентрации ДМСО до 15% – снижалось. В двух других случаях количество клеток с двойной флуоресценцией JS-1 не отличалось от показателей контрольной группы. После инкубации в присутствии ЭТС количество клеток с двойной флуоресценцией в средах с 10 и 15% ДМСО значительно превышало как контрольный уровень, так и значения, определенные в бессывороточных средах, в двух других вариантах оно оставалось на уровне, установленном для сред без ЭТС.

Еще одним немаловажным показателем функциональной активности ККН является уровень базальной и стимулированной гормонопродукции. В качестве показателя гормонопродукции в данной работе определяли секрецию альдостерона – основного минералокортикоидного гормона коры надпочечников. Базальный уровень секреции альдостерона ККН статистически значимо снизился после инкубации во всех бессывороточных криозащитных средах, за исключением среды с концентрацией ДМСО 10% (рис. 4, А). Присутствие ЭТС в инкубационных средах с концентрацией ДМСО 7 и 15% приводило к последующему повышению уровня базальной секреции гормона в ходе культивирования. В двух других случаях изменения уровня базальной секреции были такими же, как и в соответствующих бессывороточных средах.

Стимулированная секреция альдостерона ККН была ниже контроля после инкубации во всех бессывороточных криозащитных средах (рис. 4, В). Во всех средах с ЭТС падение уровня стимулированной секреции было аналогичным, кроме среды с 15% ДМСО, в которой наблюдалось почти трехкратное снижение показателя.

Анализируя экспериментальные данные, можно утверждать, что инкубация в среде с относительно высокой концентрацией ДМСО (15%, без ЭТС) приводила к снижению функциональной активности клеток. При этом наблюдались уменьшение количества жизнеспособных клеток (по МТТ-тесту), 3β -ГСД⁺-клеток, клеток с функционально активными митохондриями (имевших двойную оранжево-зеленую флуоресценцию JS-1), а также снижение секреции альдостерона. В случае других концентраций большинство показателей оставалось на уровне клеток до обработки раствором криопротектора. После инкубации в среде с ЭТС такого снижения функциональных показателей не наблю-

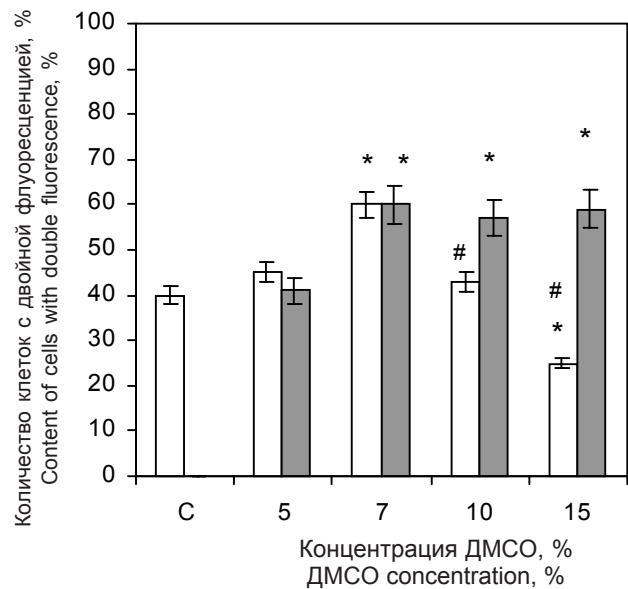


Рис. 3. Содержание клеток с двойной (оранжево-зеленой) флуоресценцией JS-1 в суспензиях клеток коры надпочечников, подвергнутых 20-минутной инкубации в средах с ДМСО и ЭТС: □ – без ЭТС; ■ – с 25% ЭТС; С – контроль, свежесывороточная суспензия ККН; * – отличия статистически значимы относительно контрольных значений, $p < 0,05$; # – относительно показателей в среде с ЭТС и равной концентрацией ДМСО, $p < 0,05$.

Fig. 3. Content of cells with double (green-orange) JC-1 fluorescence in suspension of adrenal cortex cells, subjected to 20-minute-long incubation in media with DMSO and FBS: □ – without FBS; ■ – with 25% FBS; C – control, fresh ACC suspension; * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$; # – if compared with the data of medium with FBS and equal concentration of DMSO, $p < 0.05$.

dium with 7 and 15% DMSO concentration led to a further increase in the basal level of hormone secretion during culture. In two other cases, the basal secretion level changes were the same as in the corresponding serum-free media.

Stimulated secretion of aldosterone by ACCs was below the control levels after incubation in all serum-free cryoprotective media (Fig. 4B). In the cases with ETS the decline in stimulated secretion was the same in all media except the one with 15% DMSO, where we observed almost a three-fold decline.

Analysis of the experimental data allowed to assume that incubation in a medium with a relatively high concentration of DMSO (15%, without ETS) led to a decrease in functional activity of cells. The reduction was observed in the number of viable cells (according MTT test), 3β -HSD⁺ cells, cells with functionally active mitochondria (with double orange-green JC-1 fluorescence), and aldosterone secretion. In the media with other concentrations of DMSO the most indices remained



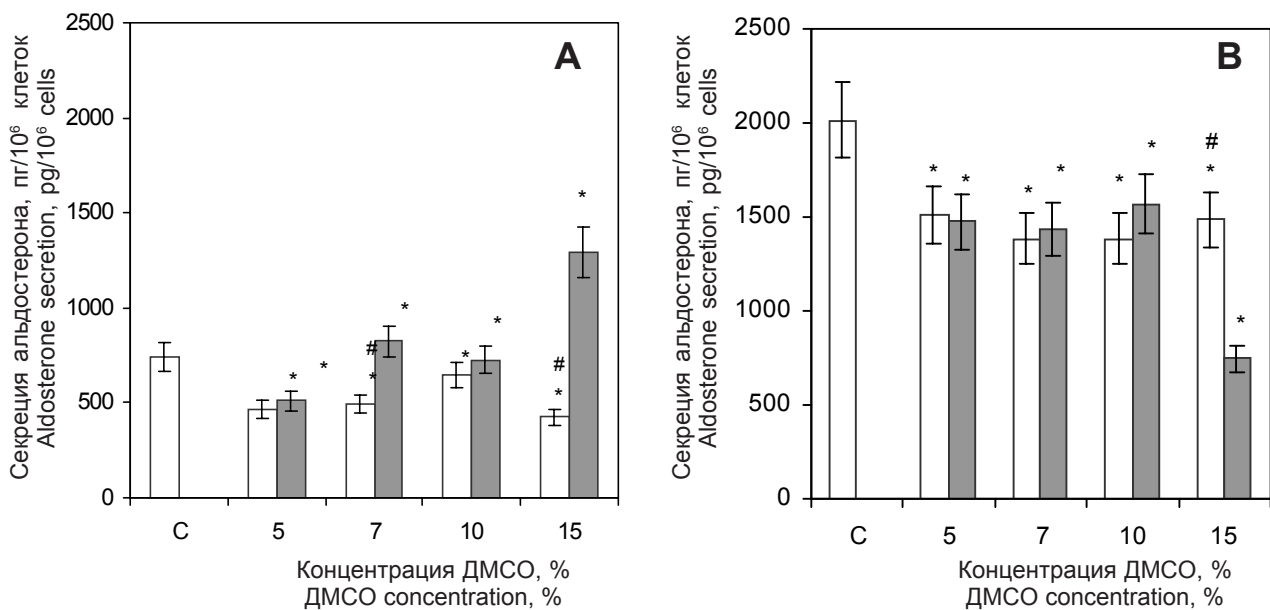


Рис. 4. Базальная (А) и dbcAMP-стимулированная (В) секреция альдостерона (за 24 ч культивирования) в суспензиях клеток коры надпочечников, подвергнутых 20-минутной инкубации в средах с ДМСО и ЭТС: □ – без ЭТС; ■ – с 25% ЭТС; контроль – свежесывороточная суспензия ККН; * – отличия статистически значимы относительно контрольных значений, $p < 0,05$; # – относительно показателей в среде с ЭТС и равной концентрацией ДМСО, $p < 0,05$.

Fig. 4. Basal (A) and dbcAMP-stimulated (B) aldosterone secretion (after 24 hrs of culture) in suspension of adrenal cortex cells, subjected to 20-minute-long incubation in media with DMSO and FBS: □ – without FBS; ■ – with 25% FBS; control – fresh ACC suspension; * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$; # – if compared with the data of medium with FBS and equal concentration of DMSO, $p < 0.05$.

далось. Этот эффект можно объяснить связыванием ДМСО с альбумином сыворотки, показанным ранее [3]. В результате этого снижается концентрация свободного ДМСО в среде, а значит и его токсичность для клеток.

При анализе данных выявлен интересный факт: количество 3β -ГСД⁺-клеток и клеток с функционально активными митохондриями после инкубации в бессывороточных средах с концентрацией ДМСО 7% и в средах с ЭТС и 7, 10, 15%-м ДМСО увеличивается по сравнению с контролем. Схожие изменения наблюдали и в количестве клеток с двойной оранжево-зеленой флуоресценцией JC-1: увеличение в среде с 7%-м ДМСО как в присутствии ЭТС, так и в бессывороточной среде; увеличение в средах с ЭТС и 10 или 15% ДМСО [6].

Ранее нами было показано, что после криоконсервирования в среде с ДМСО (7%) наблюдалось увеличение количества клеток с двойной флуоресценцией JC-1 [6]. Данные, полученные в настоящем исследовании, позволяют предположить, что уже на этапе инкубации клеток в криозащитных средах происходят некоторые изменения в звеньях стероидогенеза. Среди таковых можно отметить установленный факт активации аденилатциклазы в присутствии ДМСО [1, 2]. Это, однако, не приводило к увеличению синтеза одного из гормонов

at the level established in the cells prior to treatment with a cryoprotectant solution. After incubation in a medium supplemented with FBS such a reduction in functional parameters was not observed. This effect could be explained by binding of serum albumin with DMSO shown previously [18]. This reduces the free DMSO concentration in the medium, and therefore its toxicity to cells.

Data analysis revealed an interesting fact: the number of 3β -HSD⁺ cells and cells with functionally active mitochondria after incubation in serum-free media with 7% DMSO concentration and media with FBS and 7, 10, 15% DMSO was increased if compared with the control. Similar changes were observed in the number of cells with double orange-green JC-1 fluorescence: increase in the medium with 7% DMSO both in the presence of FBS or in serum-free medium, and the increase of the index in a media with FBS, and 10 or 15% DMSO [27].

We have shown previously that cryopreservation in the medium with DMSO (7%), resulted in an increase of the number of cells with double JC-1 fluorescence [27]. The data obtained in the present study suggested that some changes in the steroidogenesis links occurs already at the stage of cells incubation in the cryoprotective media. Among these we could mention the established fact of activation of adenylate cyclase in

надпочечников – альдостерона. Причиной такого явления может быть ингибирование вторичного посредника синтеза минералокортикоидов – инозитол-3-фосфата, вызываемое повышением содержания цАМФ [19].

Инкубация ККН в среде с 15%-м ДМСО и ЭТС приводила к значимому увеличению уровня альдостерона в среде не только по сравнению с бессывороточной средой с такой же концентрацией криопротектора, но и по отношению к контролю. Возможно, такая неспецифическая активация базального стероидогенеза происходит в результате изменения проницаемости мембраны под действием ДМСО в высокой концентрации [17] и проникновения в клетку субстратов и/или стимуляторов гормонопоза, которые могут содержаться в ЭТС.

Таким образом, присутствие ЭТС в составе криозащитной среды приводило к снижению токсического действия ДМСО на адренокортикоциты во время инкубации, более того, в некоторых случаях после инкубации в средах с ДМСО и ЭТС наблюдалось увеличение содержания клеток с функционально активными митохондриями и клеток с активным стероидогенезом по сравнению с суспензией клеток, не подвергавшихся воздействию криопротектора.

Выводы

Инкубация ККН в криозащитной среде с 15% ДМСО приводила к снижению их жизнеспособности (по МТТ-тесту). В средах с 5, 7 и 10% ДМСО показатель не отличался от интактного контроля. Добавление ЭТС в среду с 15% ДМСО устраняло негативный эффект инкубации.

Количество 3β -ГСД⁺-клеток после инкубирования в средах с 5 и 7% ДМСО оставалось на уровне интактного контроля, в среде с 10% ДМСО значимо повышалось, а в среде с 15% ДМСО снижалось. Присутствие ЭТС в среде инкубации привело к увеличению содержания 3β -ГСД⁺-клеток в средах с 10 и 15% ДМСО, в остальных средах оно оставалось на уровне интактного контроля.

Количество клеток с функционально активными митохондриями (имевших двойную оранжево-зеленую флуоресценцию JC-1) оставалось на уровне интактного контроля после инкубации в средах с 5 и 10% ДМСО, повышалось в среде с 7% и снижалось в среде с 15% ДМСО. Введение ЭТС в среду инкубации не влияло на изменения данного показателя, отмеченные в бессывороточных средах с 5 и 7% ДМСО, и приводило к значительному увеличению количества клеток с двойной флуоресценцией в средах с 10 и 15% ДМСО.

Базальный уровень секреции альдостерона снизился после инкубации адренокортикоцитов в

the presence of DMSO [5, 6]. This, however, did not lead to an increase in the synthesis of one of the adrenal hormones, aldosterone. The reason for this phenomenon might be an inhibition of second messenger of mineralocorticoid synthesis, inositol-3-phosphate, caused by increased cAMP content [15].

Incubation of ACCs in a medium with 15% DMSO and FBS resulted in a significant increase of aldosterone level in the medium, if compared not only with serum-free conditions and the same concentration of cryoprotectant, but in respect to the control as well. Probably, such a non-specific activation of basal steroidogenesis occurred as a result of changes in the permeability of the membrane under the action of a high DMSO concentration [13], and penetration into the cell of substrates and/or stimulators of hormoneogenesis, probably present in FBS.

Thus, the presence of FBS in a cryoprotective medium reduced the toxic effect of DMSO on adrenocorticytes during incubation, furthermore in some cases incubation in media with DMSO and FBS led to the increase in the number of cells with functionally active mitochondria and cells with active steroidogenesis if compared with the suspensions with cells not exposed to cryoprotectant solution

Conclusions

Incubation of ACCs in cryoprotective medium with 15% DMSO led to a decrease in their viability (according MTT-test). In media with 5, 7 and 10% DMSO the index did not differ from the intact control. Introduction of FBS to the medium with 15% DMSO eliminated a negative effect of incubation.

Number of 3β -HSD⁺ cells after incubation in a media with 5 or 7% DMSO remained on the level of the intact control, increased significantly in the medium with 10% DMSO and decreased in the medium with 15% DMSO. The presence of FBS in the incubation medium resulted in the growth in 3β -HSD⁺ cells content in the media containing 10 and 15% DMSO, in other media the index remained at the intact control level.

The number of cells with functionally active mitochondria (having double orange- green JC-1 fluorescence) remained at the level of the intact control after incubation in media with 5 and 10% DMSO, elevated in the medium with 7% and decreased in the medium with 15% DMSO. Introduction of FBS to the incubation medium did not change the pattern observed in the serum-free media with 5 or 7% DMSO, and significantly increased the number of cells with double fluorescence in 10 medium and 15% DMSO.

Basal secretion of aldosterone decreased after adrenocorticytes incubation in the media with 5, 7, and 15% DMSO, in 10% medium it remained at the control level. In the presence of FBS in media with 5 and



средах с 5, 7 и 15% ДМСО, в среде с 10% он оставался на уровне контроля. В присутствии ЭТС в средах с 5 и 10% ДМСО не обнаружено значимых отличий в содержании альдостерона по сравнению с инкубацией в бессывороточных средах, в средах с 7 и 15% ДМСО базальный уровень секреции гормона повысился: в первом случае он достиг значений интактного контроля, во втором – значительно его превысил.

Стимулированная dbcAMP секреция альдостерона после инкубации в средах с ДМСО значительно снизилась. В присутствии ЭТС данный показатель оставался на уровне такового в соответствующих бессывороточных средах с 5, 7 и 10% ДМСО. В среде с 15% ДМСО и ЭТС стимулированная секреция достигла значительно меньших значений, чем в соответствующем бессывороточном растворе ДМСО.

Литература

1. Грищенко В.И., Бондаренко Т.П., Легач Е.И. та ін. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування органної культури наднирників новонароджених поросят в лікуванні недостатності наднирників: Метод. рекомендації. – Харків, 2000. – 12 с.
2. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкар М.С. Кріоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. – К.: Наук. думка, 1993. – 244 с.
3. Погорельный В.К., Туров В.В., Туров А.В. Изучение взаимодействия сывороточного альбумина с диметилсульфоксидом по спектрам ПМР замороженных водных растворов // Теорет. и эксперим. химия. – 1989. – №1. – С. 104–108.
4. Пушкар Н.С., Чуйко В.А., Утевский А.М. и др. Консервация и трансплантация эндокринных органов и тканей. – Харьков, 1981. – 36 с.
5. Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И. и др. Изучение возможности получения и кріоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 58–67.
6. Юрчук Т.А., Божок Г.А., Боровой И.А. и др. Влияние условий кріоконсервирования в бессывороточных, сывороткосодержащих криозащитных средах на формирование j-агрегатов в клетках коры надпочечников крыс // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №4. – С. 408–415.
7. Benton L., Shan L.X., Hardy M.P. Differentiation of adult Leydig cells // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 1995. – Vol. 53, №1. – P. 61–68.
8. Chen G.-R., Ge R.-S., Lin H. et al. Development of a cryopreservation protocol for Leydig cells // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22, №8. – P. 2160–2168.
9. Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – Vol. 197, №1. – P. 40–45.
10. Ferrari M., Fornasiero M.F., Chiara M., Isetta A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 131. – P. 165–172.
11. Hafez M.M., Heidger P.M. Stereological study of Leydig cell density in the guinea pig testis // Jr. Arch. Androl. – 1986. – Vol. 17, №1. – P. 1–7.

10% DMSO we revealed no significant differences if compared with incubation in serum-free media, in the media with 7 and 15% DMSO the basal levels of hormone secretion increased: in the first case it has reached the level of intact controls, in the second one it exceeded significantly the control.

Stimulated with dbcAMP secretion of aldosterone after incubation in media with DMSO decreased significantly. In the presence of FBS the index remained at the level of corresponding serum-free medium with 5, 7, and 10% DMSO. In the medium with 15% DMSO and FBS the stimulated secretion reached significantly lower level if compared with respective serum-free solution of DMSO.

References

1. Benton L., Shan L.X., Hardy M.P. Differentiation of adult Leydig cells. J Steroid Biochem Mol Biol 1995; 53(1): 61–68.
2. Chen G.-R., Ge R.-S., Lin H. et al. Development of a cryopreservation protocol for Leydig cells. Hum Reprod 2007; 22(8): 2160–2168.
3. Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1). Biochem Biophys Res Commun 1993; 197(1): 40–45.
4. Ferrari M., Fornasiero M.F., Chiara M., Isetta A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. J Immunol Meth 1990; 131: 165–172.
5. Grischenko V.I., Bondarenko T.P., Legach Ye.I. et al. Procurement, cryopreservation and clinical application of newborn piglet adrenal gland organ culture in therapy of renal failure [Methodical recommendations]. Kharkiv; 2000.
6. Grischenko V.I., Chuyko V.A., Pushkar M.S. Cryopreservation of endocrine organ tissues and cells. Kyiv: Naukova Dumka; 1993.
7. Hafez M.M., Heidger P.M. Stereological study of Leydig cell density in the guinea pig testis. J Arch Androl 1986; 17(1): 1–7.
8. Huveneers-Oorsprong M.B., Hoogenboom L.A., Kuiper H.A. The use of the MTT test for determining the cytotoxicity of veterinary drugs in pig hepatocytes. Toxicol In Vitro 1997; 11(4): 385–392.
9. Kardak A., Leibo S.P., Devireddy R. Membrane transport properties of equine and macaque ovarian tissues frozen in mixtures of dimethylsulfoxide and ethylene glycol. J Biomech Eng 2007; 29(5): 688–694.
10. Karpenko L.G., Gubina N.F., Schirova V.A., Kaprelyants A.S. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex. CryoLetters 2001; 22(4): 229–234.
11. Legach E.I., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Cryopreserved organ culture of endocrine glands for hormonal insufficiency treatment. Endocr Abstracts 2010; 22: 190.
12. Lopesa C.A., Santos R.R., Celestino J.J. Short-term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time. Animal Reprod Science 2009; 115(1): 201–214.
13. Menorval M.-A., Lluís M.M., Fernandez M.L., Reigada R. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. PLoS One 2012; 7: e41733.
14. Midzak A.S., Chen H., Aon M.A. et al. ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells. Biol Reprod 2011; 84(5): 976–985.



12. Huveneers-Oorsprong M.B., Hoogenboom L.A., Kuiper H.A. The use of the MTT test for determining the cytotoxicity of veterinary drugs in pig hepatocytes // *Toxicol. In Vitro*. – 1997. – Vol. 11, №4. – P. 385–392.
13. Kardak A., Leibo S.P., Devireddy R. Membrane transport properties of equine and macaque ovarian tissues frozen in mixtures of dimethylsulfoxide and ethylene glycol // *J. Biomech. Eng.* – 2007. – Vol. 29, №5. – P. 688–694.
14. Karpenko L.G., Gubina N.F., Schirova V.A., Kaprelyants A.S. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex // *CryoLetters*. – 2001. – Vol. 22, №4. – P. 229–234.
15. Legach E.I., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Cryopreserved organ culture of endocrine glands for hormonal insufficiency treatment // *Endocr. Abstracts*. – 2010. – Vol. 22. – P. 190.
16. Lopesa C.A., Santos R.R., Celestino J.J. Short-term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time // *Animal Reprod. Science*. – 2009. – Vol. 115, №1. – P. 201–214.
17. Menorval M.-A., Lluís M.M., Fernandez M.L., Reigada R. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – e41733.
18. Midzak A.S., Chen H., Aon M.A. et al. ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 84, №5. – P. 976–985.
19. Murthy K.S. cAMP inhibits IP₃-dependent Ca²⁺ release by preferential activation of cGMP-primed PKG // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – Vol. 275, №5. – P. 1238–1245.
20. Novikova L.A., Faletrov Ya.V., Kovaleva I.E. et al. From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 74, №13. – P. 1482–1504.
21. Nuydens R., Novalbos J., Dispersyn G. et al. A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties // *J. Neurosci Methods*. – 1999. – Vol. 92, №1–2. – P. 153–159.
22. Silani V. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // *Brain Res*. – 1988. – Vol. 28, №454(1–2). – P. 383–386.
23. Smiley S.T., Reers M., Mottola-Hartshorn C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potential revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – Vol. 88. – P. 3671–3675.
24. Tze W.J., Tai J., Kardak A. Successful banking of pancreatic endocrine cells for transplantation // *Metabolism*. – 1990. – Vol. 39, №7. – P. 719–723.
25. Woollacott A.J., Simpson P.B. High throughput fluorescence assays for the measurement of mitochondrial activity in intact human neuroblastoma cells // *J. Biomol. Screen*. – 2001. – Vol. 6, №6. – P. 413–420.
26. Zhang W., Wang M., Xie H.Y. et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation // *Transplant Proc*. – 2007. – Vol. 39, №5. – P. 1332–1337.
27. Zhao J., Hao H.N., Thomas R.L. et al. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells // *Stem Cells*. – 2001. – Vol. 19, №3. – P. 118–121.
15. Murthy K.S. cAMP inhibits IP₃-dependent Ca²⁺ release by preferential activation of cGMP-primed PKG. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2001; 275(5): 1238–1245.
16. Novikova L.A., Faletrov Ya.V., Kovaleva I.E. et al. From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering. *Biochemistry* 2009; 74(13): 1482–1504.
- 17./ 21. Nuydens R., Novalbos J., Dispersyn G. et al. A rapid method for the evaluation of compounds with mitochondria-protective properties. *J Neurosci Methods* 1999; 92(1–2): 153–159.
18. Pogorelyy V.K., Turov V.V., Turov A.V. Investigation of interactions between serum albumin and dimethyl sulfoxide by PMR spectra of frozen aqueous solutions. *Teor Eksperim Khimiya* 1989; (1): 104–108.
19. Pushkar N.S., Chuyko V.A., Utevsky A.M. et al. Preservation and transplantation of endocrine organs and tissues. *Kharkov*; 1981.
20. Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I., Gurina T.M. Study of possibility to obtain and cryopreserve adrenal cell primary culture of newborn piglets. *Problems of Cryobiology* 2011; 21(1): 58–67.
21. Silani V. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells. *Brain Res* 1988; 28(454(1–2)): 383–386.
22. Smiley S.T., Reers M., Mottola-Hartshorn C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potential revealed by a j-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 3671–3675.
23. Tze W.J., Tai J., Kardak A. Successful banking of pancreatic endocrine cells for transplantation. *Metabolism* 1990; 39(7): 719–723.
24. Woollacott A.J., Simpson P.B. High throughput fluorescence assays for the measurement of mitochondrial activity in intact human neuroblastoma cells. *J Biomol Screen* 2001; 6(6): 413–420.
25. Zhang W., Wang M., Xie H.Y. et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39(5): 1332–1337.
26. Zhao J., Hao H.N., Thomas R.L. et al. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2001; 19(3): 118–121.
27. Yurchuk T.A., Bozhok G.A., Borovoy I.A. et al. Effect of cryopreservation in serum-free and serum-enriched cryoprotective media on formation of j-aggregates in rat adrenal cortex cells. *Problems of Cryobiology* 2011; 21(4): 408–415.

