

Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников новорожденных мышей.

I. Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды

UDC 57.043:612.45.018.1.085.23:547.569.2

I.V. TAMARINA, G.A. BOZHOK*, T.M. GURINA, N.F. GUBINA, T.P. BONDARENKO

Cryopreservation of Newborn Mice Adrenal Cell Suspension:

1. Effect of DMSO Concentration as a Component of Cryoprotective Medium

Изучали влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды на показатели жизнеспособности, сохранности и функциональной активности клеток надпочечников новорожденных мышей после замораживания-оттаивания. Максимальные значения жизнеспособности (63,7; 66,7%) и сохранности (78,3; 95,7%) наблюдаются при замораживании суспензии клеток надпочечников (СКН) новорожденных мышей в средах с содержанием ДМСО 15 и 20%. Несмотря на высокие показатели жизнеспособности и сохранности в СКН после замораживания-оттаивания ни одна из использованных концентраций ДМСО не смогла обеспечить сохранения пролиферативной и гормонопродуцирующей функций клеток.

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

Досліджували вплив концентрації ДМСО у складі криозахисного середовища на показники життєздатності, збереження та функціональної активності клітин наднирників новонароджених мишей після заморожування-відтаювання. Максимальні значення життєздатності (63,7; 66,7%) та збереження (78,3; 95,7%) спостерігається при заморожуванні суспензії клітин наднирників (СКН) новонароджених мишей у середовищах із вмістом ДМСО 15 та 20%. Незважаючи на високі показники життєздатності та збереження у СКН після заморожування-відтаювання, жодна з використаних концентрацій ДМСО не змогла забезпечити збереження проліферативної та гормонопродукуючої функцій клітин.

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

Influence of DMSO concentrations as a component of cryopreservative medium on viability, survival and functional activity of the newborn mice adrenal cells after freeze-thawing cycle has been established in this study. Maximal values of viability (63.7; 66.7%) and survival (78.3; 95.7%) are observed after freezing of newborn mice adrenal cell suspension (ACS) in the medium with 15 and 20% DMSO. Regardless the high values of ACS viability and survival after freeze-thawing cycle, none of the DMSO concentrations being used was not capable to preserve proper post-thaw cell proliferation and hormone production.

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

На сегодняшний день мыши являются классическим объектом для изучения молекулярно-генетических процессов [16], особенностей тех или иных видов клеток либо сложных патологических состояний [2, 14], так как их геном полностью расшифрован для 17 линий [16, 20]. До 90% генов, причастных к возникновению различных заболеваний человека и мыши, идентичны [8]. У всех незрелорожденных видов, к которым относятся мыши, становление гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы происходит в первый месяц постнатального развития. Надпочечники новорожденных животных имеют значительную часть клеток-производных нервного гребня [11, 15, 25], что очень важно при изучении вопросов органогенеза и свойств стволовых/прогениторных клеток.

For today mice are popular research subjects to investigate molecular genetic processes [16], peculiarities of cell types or complicated pathological states [2, 14], since their genome has been completely decoded for 17 lines [16, 20]. Up to 90% genes involved into the appearance of different diseases in human and mice are identical [8]. In all immature born species to which the mice are referred to, the establishing of hypothalamus-pituitary-adrenal system occurs during the first month of postnatal development. Newborn animal adrenal glands have a significant part of the neural crest-derivative cells [11, 15, 25], which is very important when studying the questions of organ genesis and properties of stem/progenitor cells.

Cryopreservation is the most optimal and widely used method of long-term storage of cell suspensions

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* 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

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 30
07, fax: +380 57 373 3084, e-mail: bozhokgaru@mail.ru

Криоконсервирование – наиболее оптимальный и широко применяемый способ долгосрочного хранения суспензий и культур клеток. Протоколы криоконсервирования были разработаны для суспензии клеток надпочечников новорожденных поросят [4] и взрослых крыс [1]. Установлено, что наибольшее количество жизнеспособных клеток (50–55%) получали при использовании концентрации ДМСО 7% и скорости охлаждения 1 град/мин. Успешное замораживание кластеров из клеток медулы надпочечников человека в присутствии 10% ДМСО обсуждается V. Silvani и соавт. [22]. Эффективность трансплантации фетальной ткани надпочечников после замораживания-оттаивания отмечалась Н. Till и соавт. [26] без детализации режима криоконсервирования. Работы [15, 27, 28] посвящены исследованию хромоаффинных клеток надпочечников мышей и их предшественников, а также аспектов их дифференцировки.

Критериями для определения жизнеспособности клеток после цикла замораживания-оттаивания могут служить такие показатели их функционального состояния, как гормоносекреция, расплывание и деление при культивировании.

Целью данной работы было изучить влияние различных концентраций ДМСО в составе криозащитной среды на жизнеспособность и основные морфофункциональные свойства клеток надпочечников новорожденных мышей после криоконсервирования.

Материалы и методы

Исследования проведены 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 возрастом от 1 до 4 суток обоих полов линий c57Black и СВН. Органы выделяли и помещали в раствор охлажденной на льду среды 199 (с L-глутамином и HEPES; «PAA», Австрия). Клетки получали ферментативным способом, для чего их инкубировали при температуре 37°C и постоянном помешивании в растворе коллагеназы типа V или IA («Sigma», США) в концентрации 1 мг/мл. Надпочечники 3 раза подвергали действию ферментативного раствора, время экспозиции с ферментом составило последовательно 20, 10 и 10 мин. Полученную суспензию свежеработанных клеток отмывали от ферментного раствора охлажденной на

and cultures. Cryopreservation protocols were designed for adrenal cell suspension of newborn piglets [4] and adult rats [1]. It has been found that the highest number of viable cells (50–55%) was obtained when using 7% DMSO and 1 grad/min cooling rate. Successful freezing of clusters from human adrenal medullar cells in 10% DMSO presence is discussed by V. Silvani *et al.* [22]. Efficiency of adrenal fetal tissue transplantation after freeze-thawing was reported by H. Till *et al.* [26] without details about the cryopreservation regimen utilized. The publications [15, 27, 28] describe the chromaffin cells of mice adrenal glands and their progenitors, as well as the aspects of their differentiation.

Such indices of cells' functional state as viability, hormone secretion, flattening and expansion in culture could serve as the criteria to examine the cell viability during culturing.

The research aim was to study the effect of different DMSO concentrations as a component of cryoprotective medium on viability and preservation of main morphofunctional properties of newborn mice adrenal cells after cryopreservation.

Materials and methods

The studies were performed in compliance with General principles of experiments in animals approved by the 3rd National Congress on Bioethics (2007, Kiev) and coordinated with the statements of European convention on the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986). Research objects were ACS of newborn c57Black and CBH mice aged from 1 to 4 days of both sexes. The organs were isolated and placed into the cooled on ice medium 199 solution supplemented with L-glutamine and HEPES (PAA, Austria). The cells were isolated by enzyme method, *i.e.* they were incubated at 37°C and constant stirring in the solution of collagenase V or IA (Sigma, USA) in concentration of 1 mg/ml. The adrenal glands were thrice subjected to the effect of enzyme solution, the exposure time with enzyme made consequently 20, 10 and 10 min. The resulted cells suspension (hereinafter fresh suspension) was washed free of enzyme solution with cooled on ice medium 199. The cells were cultured either in DMEM/F-12 or medium 199 (PAA) containing Amphotericin (PAA), Gentamicin (Zdorovyie, Ukraine), 10% FBS (PAA) in atmosphere with 5% CO₂ at constant humidity and temperature of 37°C. The cells were cultured in 24-well plates (Sarstedt, Germany), and 35 mm Petri dishes (Sarstedt). Seeding density of cells per well of 24-well plate made 5×10⁵; for Petri dish it was 1×10⁶. Culturing medium was completely changed once each 3–4 days.

льду средой 199. Клетки культивировали в средах DMEM/F-12 («РАА») либо 199, содержащих амфотерицин («РАА»), гентамицин («Здоровье», Украина), 10% ЭТС («РАА»), в атмосфере с 5% CO₂ при постоянной влажности и температуре 37°C. Клетки культивировали в 24-луночном планшете («Sarstedt», Германия), чашках Петри диаметром 35 мм («Sarstedt»). Посадочная плотность клеток на лунку 24-луночного планшета составила 5×10⁵; чашку Петри – 1×10⁶. Полностью среду культивирования заменяли раз в 3–4 дня.

Суспензию клеток надпочечников в концентрации 5×10⁵ замораживали в криозащитных средах с конечной концентрацией ДМСО 5; 7,5; 10; 15; 20 и 30%. Насыщение клеток криопротектором осуществляли в течение 5 мин при комнатной температуре. Образцы СКН замораживали со скоростью 1 град/мин до –40°C на программном замораживателе «Cryoson» (Германия) и затем погружали в жидкий азот.

Клетки размораживали на водяной бане при температуре 40°C и ступенчато отмывали от раствора криопротектора средой с амфотерицином и гентамицином.

Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием трипановым синим, рассчитывали как отношение живых (неокрашенных) клеток к общему количеству клеток в образце и выражали в процентах. Сохранность клеток в суспензии после криоконсервирования рассчитывали как количество клеток после оттаивания по отношению к количеству клеток до замораживания и выражали в процентах. Количество распластанных 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.

Альдостерон измеряли радиоиммунологическим методом с помощью тест-набора «RIA Aldosterone» («Immunotech», Франция). Для определения содержания альдостерона среду отбирали ежедневно.

При оценке данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, данные выражали как $M \pm m$ ($n = 3$). Достоверными считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что эффективность криозащитного действия ДМСО возрастает с увеличением концентрации, но в то же время повышается его токсическое и осмотическое влияние на клетки [19]. Чтобы установить наилучшую концентрацию ДМСО

Adrenal cell suspension in concentration of 5×10⁵ was frozen in cryoprotective media with final DMSO concentration of 5; 7.5; 10; 15; 20 and 30%. Cells were exposed to cryoprotectant for 5 min at room temperature. The samples of ACS were frozen with the rate of 1 deg/min down to –40°C using programmable freezer Cryoson (Germany) and then plunged into liquid nitrogen.

The cells were thawed in water bath at 40°C and stepwise washed from cryoprotectant by the medium with Amphotericin and Gentamicin.

Cell viability was assessed with Trypan blue staining and counted as the ratio of live (unstained) cells to total number of the cells in a sample and expressed in percentage. The cell survival in suspension after cryopreservation was calculated as the ratio of cell number after thawing to the one prior to freezing and expressed in percentage. The number of flattened and adhered cells was calculated in 5 vision fields after a complete change of the medium and expressed in percentage in respect to the number of flattened and adhered cells in culture, which was not subjected to cryopreservation.

Aldosterone in culturing medium of ACS was measured with radio immune assay by means of RIA Aldosterone test kit (Immunotech, France). To examine the hormone content the medium was taken daily.

When estimating the data there was used non-parametric Mann-Whitney criterion, the data were expressed as $M \pm m$ ($n = 3$). The differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

It is known that efficiency of cryoprotective effect of DMSO enhances with the rise of concentration, but at the same time its toxic and osmotic effect on cells increases [19]. To select the best concentration of DMSO for cryopreservation of newborn mice ACS we have studied the cell response to freezing using wide range of DMSO concentrations (5–30%). Previously it has been established [1, 4] that cryopreservation of rat and piglet adrenal cells using low cooling rate, in particular 1 deg/min under 7% DMSO protection enabled the obtaining of 50–55% viable cells after thawing.

In this research the maximum values of viability (63.7 ± 6.4 to $66.7 \pm 7.3\%$) were achieved after freeze-thawing of ACS in the media with DMSO concentration of 15 and 20% (Fig. 1). When using the cryoprotectant concentrations of 5; 7.5; 10 and 30% there was observed statistically significant lessening of ACS viability if compared with the control (fresh cell suspension).

Generally, the cell survival was high after freeze-thawing in all the used media, except the medium with

для криоконсервирования СКН новорожденных мышей нами была исследована реакция клеток на замораживание в широком ряду концентраций ДМСО (5–30%). Ранее было установлено [1, 4], что криоконсервирование клеток надпочечников крыс и поросят с низкой скоростью охлаждения, в частности 1 град/мин под защитой 7% ДМСО, позволяет получить 50–55% жизнеспособных клеток после размораживания.

В данном исследовании максимальные значения жизнеспособности (от $63,7 \pm 6,4$ до $66,7 \pm 7,3\%$) достигались после замораживания-отогрева СКН в средах с концентрацией ДМСО 15 и 20% (рис. 1). При использовании концентраций криопротектора 5; 7,5; 10 и 30% наблюдалось достоверное уменьшение жизнеспособности СКН по сравнению с контролем (свежевыделенными клетками).

В целом сохранность клеток была высокой при замораживании во всех используемых средах, кроме среды с содержанием ДМСО 30% (рис.1). Наивысшие значения сохранности установлены для сред с концентрацией ДМСО 10, 15 и 20% (73–95%), показатели сохранности в образцах, замороженных в присутствии 5; 7,5 и 30% ДМСО, достоверно отличались от образца с 20% ДМСО. Минимальные значения сохранности (48%) были характерны для среды с концентрацией ДМСО 30%.

Способность клеток к прикреплению и расплыванию на субстрате является физиологической реакцией и связана с необходимостью реализации клеточного деления, секреции биологически активных веществ [12]. Эта способность реализуется посредством пространственного перераспределения клеточных органелл и формирования внутриклеточных компартментов [3], что происходит при взаимодействии компонентов цитоскелета, в частности актиновых микрофиламентов, и является энергозависимым процессом [5]. В связи с этим функциональное состояние СКН после криоконсервирования оценивали по количеству прикрепленных и распластанных клеток при культивировании. В культуре, полученной из свежевыделенных клеток на 2–3-и сутки культивирования, наблюдалось значительное количество прикрепившихся и распластанных клеток, формируемый ими монослой достигал конfluence на 5–6-е сутки культивирования при посевной дозе клеток 5×10^5 на лунку 24-луночного планшета, либо 1×10^6 на чашку Петри 35 мм. Культура была представлена фибробластоподобными, эпителиоидными и округлыми клетками (рис. 2, А), а после замораживания-оттаивания – единичными округлыми и фибробластоподобными клетками, эпителиоидных клеток не наблюдалось (рис. 2, В).

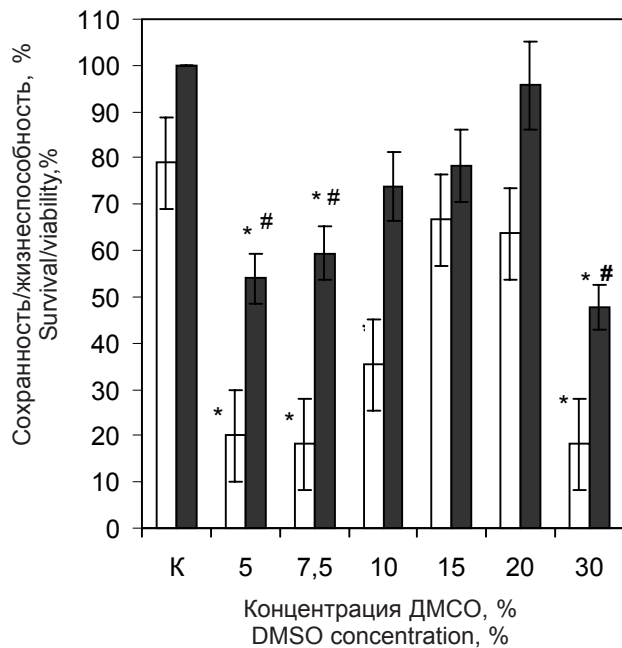


Рис. 1. Жизнеспособность и сохранность СКН новорожденных мышей после замораживания-отогрева в средах с различным содержанием ДМСО: □ – жизнеспособность; ■ – сохранность; К – контроль (свежевыделенная суспензия); * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$; # – различия достоверны по отношению к концентрации ДМСО 20%, $p < 0,05$.

Fig. 1. Viability and survival of newborn mice ACS after freeze-thawing in media with different DMSO concentration: □ – viability; ■ – survival; K – control (fresh cell suspension); * – differences are statistically significant vs. the control; $p < 0.05$; # – differences are statistically significant vs data for 20% DMSO concentration, $p < 0.05$.

30% DMSO content (Fig. 1). The highest survival values were found for the media with DMSO concentration of 10, 15 and 20% (73–95%), survival indices in the samples frozen-thawed in the presence of 5; 7.5 and 30% DMSO statistically and significantly differed from the sample with 20% DMSO. Minimal survival values (48%) were characteristic for the medium with 30% DMSO concentration.

Ability of cells to adhesion and flattening on a substrate is a physiological reaction and is related to the need to implement the cell division and secretion of biologically active substances [12]. This ability is implemented by means of spatial redistribution of cell organelles and formation of intracellular compartments [3], occurring at interaction of cytoskeletal components, in particular actin microfilaments, and is energy-dependent process [5]. In this connection, the functional state of ACS after cryopreservation was assessed on the number of adhered and flattened cells during culturing. In the culture obtained from fresh cell suspension to the 2–3rd day of culturing there was ob-

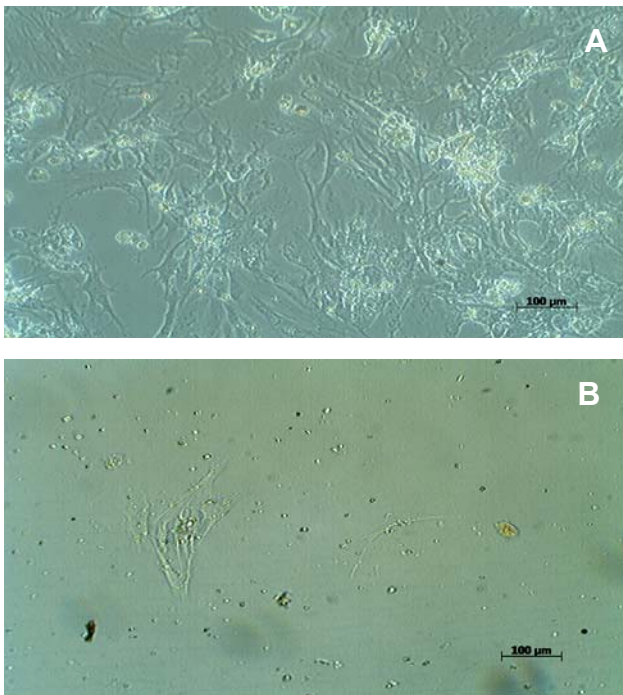


Рис. 2. Культура клеток надпочечников новорожденных мышей из свежевыведенных клеток (А) и клеток, подвергнутых криоконсервированию в присутствии 5% ДМСО (В).

Fig. 2. Cell culture of newborn mice adrenal glands from fresh cell suspension (A) and cells frozen-thawed in 5% DMSO presence (B).

На вторые сутки культивирования после замораживания-оттаивания обнаружено, что в СКН сохраняется способность клеток к прикреплению (рис. 3), также в культуре наблюдались единичные случаи расплывания клеток. Однако оба эти показателя после замораживания-оттаивания достоверно уменьшались относительно контроля. Наибольшее количество распластанных клеток было установлено для СКН, криоконсервированной в средах с концентрацией ДМСО 5 и 10 ($5,5 \pm 0,6$ и $6,7 \pm 0,8\%$ от контроля). Наибольший процент прикрепленных клеток ($33,2 \pm 10,15$ и $36,5 \pm 12,5\%$) наблюдался в СКН после криоконсервирования в среде, содержащей 10 и 15% ДМСО. Формирования монослоя не наблюдалось, хотя отмечались небольшие участки пролиферации в культурах, полученных из всех образцов, кроме замороженной-отогретой в присутствии 30% ДМСО. Достаточно высокие показатели сохранности клеток и их жизнеспособности во всех образцах при относительно небольшом количестве распластанных и прикрепленных клеток (рис. 3) могут свидетельствовать о том, что повреждения, полученные клетками, привели к снижению функциональной активности, способности к расплыванию и прикреплению, однако сохранили целостность клеточной мембраны. В культуре, не подвергавшейся замораживанию, количество распластанных клеток относительно прикрепленных составляло 50%, в то время как в образцах после замораживания-оттаивания –

served a significant number of adhered and flattened cells, formed by them monolayer reached the confluence to the 5–6th culturing day with cell inoculum of 5×10^5 per well of the 24-well-plate, or 1×10^6 per 35 mm Petri dish. The culture was represented by fibroblast-like, epithelioid and roundish cells (Fig. 2A) and after freeze-thawing we observed only single roundish and fibroblast-like cells, and no epithelioid cells were found (Fig. 2B).

To the second culturing day post thaw it has been found that in ACS the ability of cells to adhesion was preserved (Fig. 3) as well we observed single cases of cell flattening in the culture. However, both these indices after freeze-thawing were statistically and significantly reduced if compared to the control. The highest number of flattened cells was found for ACS, frozen-thawed in the media with 5 and 10% DMSO concentration (5.5 ± 0.6 and $6.7 \pm 0.8\%$ of the fresh suspension). The highest percent of adhered cells (33.2 ± 10.15 and $36.5 \pm 12.5\%$) was observed in ACS after freeze-thawing in the medium containing 10 and 15% DMSO. No formation of monolayer was found, though there were noted small sites of proliferated cells in the cultures, obtained in all the samples, except the one frozen-thawed in 30% DMSO presence. Quite high indices of cell survival and viability in all the samples together with relatively small amount of flattened and adhered cells (Fig. 3) may testify to the fact that cell damages resulted in a decreased functional activity, *i. e.* ability to flattening and adhesion, whereas the cell membrane integrity was preserved. In the culture of non-frozen-thawed cells the number of flattened cells in respect to the adhered ones made 50%, meanwhile in the samples after freeze-thawing it was 25 (5% DMSO) down to 10% and even less (7.5; 10; 15; 20 and 30% DMSO). These data testify to insufficient efficiency of the used cryoprotective media and the need of further studies.

We have studied the ability of ACS to synthesize aldosterone during culturing. For cell culture of fresh suspension the content of aldosterone in the medium to the 2nd and 3rd culturing days made 3,748 and 3,734 pg/ml/mln cells. Thereafter the aldosterone secretion reduced to the 5–6th culturing days and made 174.3 pg/ml/mln cells.

от 25 (5% ДМСО) до 10% и менее (7,5; 10; 15; 20 и 30% ДМСО). Эти данные свидетельствуют о недостаточной эффективности использованных криозащитных сред и необходимости дальнейших исследований.

Нами была изучена способность СКН синтезировать альдостерон при помещении в условия культивирования. Для нативной культуры на 2-е и 3-и сутки культивирования содержание альдостерона в среде составляло 3748 и 3734 пг/мл/млн клеток. В динамике секреция альдостерона уменьшалась на 5–6-е сутки культивирования и составляла 174,3 пг/мл/млн клеток.

После замораживания-оттаивания наблюдалось резкое падение способности культивируемых клеток к секреции стероидов. Уровень синтеза альдостерона клетками, замороженными в присутствии всех концентраций ДМСО, находился в пределах 0,1–0,3% от контроля.

ДМСО широко используется для криоконсервирования тканей эндокринных желез [1, 4, 17, 18, 19]. Вопрос о допустимых концентрациях ДМСО активно обсуждается на протяжении многих лет. Известно, что цитотоксичность криопротектора зависит от типа клеток, в которые он проникает, и оказываемый эффект может быть разным. Во многих работах по криоконсервированию клеток эндокринных желез используют достаточно высокие концентрации ДМСО [17, 18, 19]. По данным Т. Keane и соавт. [16] и J.R. Lakey и соавт. [17] ДМСО является необходимым компонентом криозащитных сред при замораживании островков поджелудочной железы, причем оптимальной являлась концентрация 2 М (15,6%). Для замораживания островков поджелудочной железы человека использовали 2 М ДМСО при скорости охлаждения 0,3 и 1 град/мин, что позволило получить структуры, эффективные при трансплантации с показателями жизнеспособности после размораживания более 50 и 65% соответственно [10]. В. Vasir и соавт. установили, что для островков поджелудочной железы крыс концентрация ДМСО 20% является наиболее эффективной [29]. Концентрация ДМСО 15% является оптимальной при замораживании клеток Лейдига, позволяя сохранить после размораживания жизнеспособность клеток (в среднем 75–85%) как и их способность к секреции тестостерона [6, 24]. После замораживания-отогрева фолликулов овариальной ткани овцы под защитой ДМСО количество жизнеспособных фолликулов составило 81,4%, что было выше по сравнению с другими криопротекторами [9].

В наших исследованиях увеличение концентрации ДМСО до 15–20% повышало значения жизне-

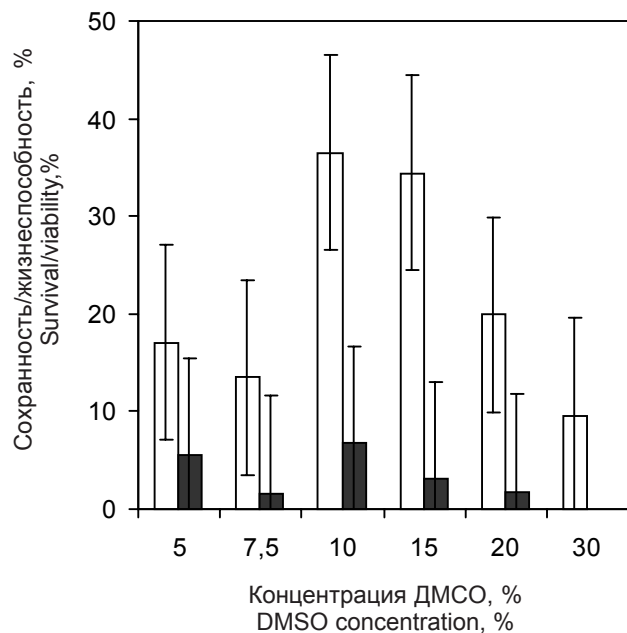


Рис. 3. Количество расплывчатых клеток в СКН новорожденных мышей после замораживания-оттаивания в криозащитных средах с различным содержанием ДМСО на 2-е сутки культивирования: □ – общее количество клеток; ■ – количество расплывчатых клеток. Данные представлены в процентном отношении от показателей свежeweделенных клеток.

Fig. 3. Number of flattened cells in ACS of newborn mice after freeze-thawing in cryoprotective media with different DMSO concentration to the 2nd culturing day; □ – total cell number, ■ – number of flattened cells. The data are presented in percentage to the indices of fresh cell suspension.

After freeze-thawing a sharp decrease of the ability of cultured cells to secrete the steroids was observed. The aldosterone synthesis level in cells frozen-thawed in the presence of all the concentrations of DMSO was within the ranges of 0.1–0.3% of the control.

DMSO is widely used to cryopreserve the tissues of endocrine glands [1, 4, 17–19]. The question about admissible DMSO concentrations has been discussed during many years. It is known that cytotoxicity of cryoprotectants depends on a type of cells, wherein it penetrates and the rendered effect may be various. In many reports on adrenal cell cryopreservation high DMSO concentrations have been used [17–19]. According to T. Keane *et al.* [16] and J.R. Lakey *et al.* [17] DMSO is an essential component of cryoprotective media when freezing pancreas islets, moreover an optimal concentration was 2 M (15.6%). For freezing human pancreas islets there was used 2 M DMSO and cooling rate of 0.3 and 1 deg/min, correspondingly, enabling the obtaining of structures effective for transplantation with post-thaw viability indices above 50 and 65% [10]. B. Vasir *et al.* have established that for rat

способности и сохранности по сравнению с концентрацией 7% [1, 4] Однако, несмотря на увеличение показателя жизнеспособности, гормоносекретирующая функция, а также способность клеток к адгезии и пролиферации были низкими. Выраженное токсическое влияние ДМСО, которое выражалось в снижении жизнеспособности, сохранности, отсутствии секреции альдостерона, наблюдалось в концентрации 30%, для которой было показано уменьшение уровня всех исследованных показателей СКН.

В то же время установленные функциональные различия (снижение способности к секреции альдостерона, распластыванию и пролиферации) по сравнению с культурой свежесыведенных клеток, наблюдающиеся в СКН после замораживания-оттаивания в средах с концентрациями ДМСО 15 и 20%, могут быть связаны с тем, что на исследуемых сроках клетки не успели репарировать повреждения, полученные в результате замораживания-оттаивания. Исходя из представленных результатов, интересно провести дальнейшие исследования в данной области.

Выводы

1. Максимальные значения жизнеспособности по окрашиванию трипановым синим (63,7; 66,7%) и сохранности (78,3; 95,7%) наблюдаются после замораживания-оттаивания СКН новорожденных мышей в средах с содержанием ДМСО 15 и 20%.

2. Несмотря на высокие показатели жизнеспособности и сохранности в СКН после замораживания-оттаивания, ни одна из использованных концентраций ДМСО не смогла сохранить пролиферативную и стероидогенную функции клеток, поэтому необходимо дальнейшее изучение возможного состава криозащитных сред для данной суспензии.

pancreas islets the 20% concentration of DMSO is the most efficient [29], and 15% concentration is an optimal one when freezing Leydig cells, allowing to preserve their ability to testosterone secretion [6, 24]. When freezing the follicles of sheep ovarian tissue under DMSO protection the number of viable follicles made 81.4%, that was higher if compared with other cryoprotectants [9].

In our studies the rise in DMSO concentration up to 15–20% increased the viability and survival values if compared with 7% concentration [1, 4]. However, in spite of the rise in viability index, hormone-secreting function as well as cell ability to adhesion and proliferation were low. Toxic effect of DMSO manifested in reduced post-thaw viability, survival, and absence of aldosterone secretion in ACS were found in the case of using 30% concentration.

At the same time the revealed functional differences (decrease in aldosterone secretion ability, flattening and proliferation) if compared with fresh cell suspension observed in ACS after freeze-thawing in the media with DMSO concentration of 15 and 20% may be related to the fact that in the studied terms the cells were not able to repair the damages resulted from freeze-thawing. The presented results suggest the need of further investigations in this field.

Conclusions

1. Maximum viability values on Trypan blue staining (63.7, 66.7%) and survival (78.3, 95.7%) are observed after freeze-thawing of newborn mice ACS in the media with 15 and 20% DMSO.

2. Despite high indices of viability and survival in ACS after freeze-thawing none of the media with all the studied DMSO concentrations could preserve proliferative and steroidogenic functions of cells, therefore the further study of possible composition of cryoprotective media for this suspension is necessary.

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. 379-388.
2. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1983. – 383 с.
3. Кисурин-Евгеньева О.П. Распределение органелл при распластывании клеток СПЭВ в норме и при действии ингибиторов энергетического обмена: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2001. – 20 с.
4. Устиченко В.Д. Функціональні властивості надниркових залоз новонароджених поросят при дії різних режимів заморожування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків, 2008. – 20 с.

Литература

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. 379-388.
2. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A. et al. Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in experiment. – Kiev: Vysscha Shkola, 1983. – 383 p.
3. Kisurina-Evgenieva O.P. Distribution of organelles during SPEV cell flattening in norm and during effect of energetic exchange inhibitors: Author's abstract...of Candidate of biological sciences. – Moscow, 2001. – 20 p.
4. Ustichenko V.D. Functional properties of newborn piglets' adrenal glands during effect of different freezing regimens: Author's abstract...of Candidate of biological sciences. – Kharkov, 2008 – 20 p.

5. Шутова М.С., Александрова А.Ю. Сравнительное исследование расплавления нормальных и трансформируемых фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения // Цитология. – 2010. – Т. 52, №1. – С. 41–51.
6. 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.
7. Dairkee S., Deng G., Stampfer M. et al. Selective cell culture of primary breast carcinoma // Cancer Res. – 1995. – Vol. 197, №3. – P. 2516–2519.
8. De S., Zhang Y., Garner J. et al. Disease and phenotype gene set analysis of disease-based gene expression in mouse and human // Physiol. Genomics. – 2010. – Vol. 42. – P. 162–167.
9. Demirci B., Lornage J., Salle B. et al. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 75, №4. – P. 754–762.
10. El-Shewy H.M., Kendall W.F. Jr., Darrabie M. et al. Polyvinyl pyrrolidone: a novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation // Cell Transplant. – 2004. – Vol. 13, №3. – P. 237–243.
11. Etchevers H. Primary culture of chick, mouse or human neural crest cells // Nature Protocols. – 2011. – Vol. 6, №10. – P. 1568–1577.
12. Flevaris P., Stojanovich A., Gong H. et al. A molecular switch that controls cell spreading and retraction // J. Cell Biol. – 2007. – Vol. 179, №3. – P. 553–565.
13. Foreman J., Moriya H., Taylor M.J. Effect of cooling rate and its interaction with pre-freeze and post-thaw tissue culture on the *in vitro* and *in vivo* function of cryopreserved pancreatic islets // Transpl. Int. – 1993. – Vol. 6, №4. – P. 191–200.
14. Fox J., Davisson M., Quimby F. et al. The mouse in biomedical research // Normative Biology, Husbandry, and Models. – Elsevier Academic Press. – 2006. – Vol.3. – P. 595–615.
15. Huber K., Kalchheim C., Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest // Auton. Neurosci. – 2009. – Vol. 151, №1. – P. 6–10.
16. Keane T., Goodstadt L., Danecek P. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation // Nature. – 2011. – Vol. 477, №7364. – P. 289–294.
17. Lakey J.R., Rajotte R.V., Fedorow C.A. et al. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions // Cell Transplant. – 2001. – Vol. 10, №7. – P. 583–589.
18. Lakey J.R., Anderson T.J., Rajotte R.V. Novel approaches to cryopreservation of human pancreatic islets // Transplantation. – 2001. – Vol. 72, №6. – P. 1005–1011.
19. Ock S., Rho G. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs) // Cell Transplant. – 2011. – Vol. 20, №8. – P. 1231–1239.
20. Pruitt D., Tatusova T., Klimke W. et al. NCBI reference sequences: current status, policy and new initiatives // Nucleic Acids Res. – 2009. – Vol. 37, №9. – P. 32–36.
21. Romero D., Plonczynski M., Welsh B. et al. Gene expression profile in rat adrenal zona glomerulosa cells stimulated with aldosterone secretagogues // Physiol. Genomics. – 2007. – Vol. 32, №1. – P. 117–127.
22. Silvani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // Brain. Res. – 1988. – Vol. 454, №(1–2). – P. 383–386.
23. Shepherd S., Holzwarth M. Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2001. – Vol. 280, №1. – P. 61–71.
24. Tai J., Tze W., Johnson H. Cryopreservation of rat Leydig cells for *in vitro* and *in vivo* studies // Horm. Metab. Res. – 1994. – Vol. 26, №3. – P. 145–147.
25. Tamura Y., Matsumura K., Sano M. et al. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2011. – Vol. 31, №3. – P. 582–589.
26. Till H., Stachel D., Müller-Höcker J. et al. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats // Eur. J. Pediatr. Surg. – 1998. – Vol. 8, №4. – P. 240–243.
5. Shutova M.S., Aleksandrova A.Yu. Comparative study of flattening of normal and transformed fibroblasts. Role of polymerization of microfilaments and actin-myosin contraction // Tsytologiya. – 2010. – V.52, N1. – P. 41–51.
6. Chen G.R., Ge R.S., Lin H. et al. Development of a cryopreservation protocol for Leydig cells // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 22, N8. – P. 2160–2168.
7. Dairkee S., Deng G., Stampfer M. et al. Selective cell culture of primary breast carcinoma // Cancer Res. – 1995. – Vol. 197, N3. – P. 2516–2519.
8. De S., Zhang Y., Garner J. et al. Disease and phenotype gene set analysis of disease-based gene expression in mouse and human // Physiol. Genomics. – 2010. – Vol. 42. – P. 162–167.
9. Demirci B., Lornage J., Salle B. et al. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 75, N4. – P. 754–762.
10. El-Shewy H.M., Kendall W.F. Jr., Darrabie M. et al. Polyvinyl pyrrolidone: a novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation // Cell Transplant. – 2004. – Vol. 13, N3. – P. 237–243.
11. Etchevers H. Primary culture of chick, mouse or human neural crest cells // Nature Protocols. – 2011. – Vol. 6, N10. – P. 1568–1577.
12. Flevaris P., Stojanovich A., Gong H. et al. A molecular switch that controls cell spreading and retraction // J. Cell Biol. – 2007. – Vol. 179, N3. – P. 553–565.
13. Foreman J., Moriya H., Taylor M.J. Effect of cooling rate and its interaction with pre-freeze and post-thaw tissue culture on the *in vitro* and *in vivo* function of cryopreserved pancreatic islets // Transpl. Int. – 1993. – Vol. 6, N4. – P. 191–200.
14. Fox J., Davisson M., Quimby F. et al. The mouse in biomedical research // Normative Biology, Husbandry, and Models. – Elsevier Academic Press. – 2006. – Vol.3. – P. 595–615.
15. Huber K., Kalchheim C., Unsicker K. The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest // Auton. Neurosci. – 2009. – Vol. 151, N1. – P. 6–10.
16. Keane T., Goodstadt L., Danecek P. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation // Nature. – 2011. – Vol. 477, N7364. – P. 289–294.
17. Lakey J.R., Rajotte R.V., Fedorow C.A. et al. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions // Cell Transplant. – 2001. – Vol. 10, N7. – P. 583–589.
18. Lakey J.R., Anderson T.J., Rajotte R.V. Novel approaches to cryopreservation of human pancreatic islets // Transplantation. – 2001. – Vol. 72, N6. – P. 1005–1011.
19. Ock S., Rho G. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs) // Cell Transplant. – 2011. – Vol. 20, N8. – P. 1231–1239.
20. Pruitt D., Tatusova T., Klimke W. et al. NCBI reference sequences: current status, policy and new initiatives // Nucleic Acids Res. – 2009. – Vol. 37, N9. – P. 32–36.
21. Romero D., Plonczynski M., Welsh B. et al. Gene expression profile in rat adrenal zona glomerulosa cells stimulated with aldosterone secretagogues // Physiol. Genomics. – 2007. – Vol. 32, N1. – P. 117–127.
22. Silvani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // Brain. Res. – 1988. – Vol. 454, N(1–2). – P. 383–386.
23. Shepherd S., Holzwarth M. Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2001. – Vol. 280, N1. – P. 61–71.
24. Tai J., Tze W., Johnson H. Cryopreservation of rat Leydig cells for *in vitro* and *in vivo* studies // Horm. Metab. Res. – 1994. – Vol. 26, N3. – P. 145–147.
25. Tamura Y., Matsumura K., Sano M. et al. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2011. – Vol. 31, N3. – P. 582–589.
26. Till H., Stachel D., Müller-Höcker J. et al. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats // Eur. J. Pediatr. Surg. – 1998. – Vol. 8, N4. – P. 240–243.

27. *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 // *Physiol. Genomics. Mechanisms of Development.* – 2003. – Vol. 120, №3. – P. 299–304.
28. *Unsicker K., Huber K., Schütz G. et al.* The chromaffin cell and its development // *Neurochem. Res.* – 2005. – Vol. 30, №(6–7). – P. 921–925.
29. *Vasir B., Gray D., Morris P.* Normalization of hyperglycemia in diabetic rats by intraportal transplantation of cryopreserved islets from four donors // *Diabetes.* – 1989. – Vol. 38, №1. – P. 185–188.

Поступила 06.03.2012

27. *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 // *Physiol. Genomics. Mechanisms of Development.* – 2003. – Vol. 120, N3. – P. 299–304.
28. *Unsicker K., Huber K., Schütz G. et al.* The chromaffin cell and its development // *Neurochem. Res.* – 2005. – Vol. 30, N(6–7). – P. 921–925.
29. *Vasir B., Gray D., Morris P.* Normalization of hyperglycemia in diabetic rats by intraportal transplantation of cryopreserved islets from four donors // *Diabetes.* – 1989. – Vol. 38, N1. – P. 185–188.

Accepted 06.03.2012