

**Влияние условий криоконсервирования в бессывороточных, сывороткосодержащих криозащитных средах на формирование j-агрегатов в клетках коры надпочечников крыс**

UDC 577.366:57.043

T.A. YURCHUK<sup>1\*</sup>, G.A. BOZHOK<sup>2</sup>, I.A. BOROVY<sup>3</sup>,  
P.M. ZUBOV<sup>2</sup>, T.M. GURINA<sup>2</sup>, T.P. BONDARENKO<sup>2</sup>, YU.V. MALYUKIN<sup>3</sup>**Effect of Cryopreservation in Serum-Free and Serum-Enriched Cryoprotective Media on Formation of J-Aggregates in Rat Adrenal Cortex Cells**

Одним из необходимых условий для осуществления стероидогенной функции клетками коры надпочечников (ККН) является наличие потенциала на мембране митохондрий ( $\Delta\psi_m$ ). Для его оценки часто используется катионный краситель JC-1, который способен образовывать j-агрегаты в митохондриях при наличии потенциала на ее мембране. В нашей работе мы оценивали эту способность в ККН крыс после замораживания-отогрева в бессывороточных и сывороткосодержащих криозащитных средах в концентрационном ряду ДМСО. Установлено, что количество ККН, содержащих j-агрегаты, увеличивалось во всех криозащитных средах после замораживания-отогрева. Данный эффект сохранялся после краткосрочного культивирования в течение 24 ч только в ККН, замороженных-отогретых в бессывороточных криозащитных средах, и был наиболее выраженным в средах с концентрациями ДМСО 5 и 7%. Клетки коры надпочечников, криоконсервированные в сывороткосодержащих средах, по количеству клеток с j-агрегатами не отличались от нативных.

**Ключевые слова:** клетки коры надпочечников, стероидогенез, флуоресцентный краситель, j-агрегаты, митохондриальный потенциал.

Однією з необхідних умов для здійснення стероїдогенної функції клітинами кори надпочечників (ККН) є наявність потенціалу на мембрані митохондрий ( $\Delta\psi_m$ ). Для його оцінки часто використовується катионний барвник JC-1, який здатний створювати j-агрегати в митохондрії при наявності потенціалу на її мембрані. У нашій роботі ми оцінювали цю здатність у ККН щурів після заморожування-відігрівання у криозахисних середовищах з вмістом сироватки та без неї в концентраційному ряду ДМСО. Встановлено, що кількість ККН, які містять j-агрегати, збільшувалась після заморожування-відігрівання ККН у всіх криозахисних середовищах. Даний ефект зберігався після короткострокового культивування протягом 24 годин тільки в ККН, заморожених-відігрітих у криозахисних середовищах без сироватки і був найбільш вираженим у середовищах з концентраціями ДМСО 5 і 7%. Клітини кори надпочечників, криоконсервовані в середовищах з сироваткою, за кількістю клітин з j-агрегатами не відрізнялися від нативних.

**Ключові слова:** клітини кори надпочечників, стероїдогенез, флуоресцентний барвник, j-агрегати, митохондриальний потенціал.

One of necessary conditions to perform steroidogenesis by adrenal cortex cells (ACC) is the presence of the potential on mitochondrial membrane ( $\Delta\psi_m$ ). To assess it the cationic dye JC-1 capable of forming j-aggregates in mitochondrion with the presence of a potential on its membrane is frequently used. In this research we estimated this ability in rat ACC after freeze-thawing in serum-free and serum-enriched cryoprotective media in DMSO concentration row. It has been established that the number of ACC containing j-aggregates increased after freeze-thawing in all cryoprotective media. This effect was kept after short-term culturing during 24 hrs only in ACC, frozen-thawed in serum-free cryoprotective media and was the most manifested in the media with 5 and 7% DMSO. Adrenal cortex cells cryopreserved in serum-enriched media did not differ from native cells by the number of cells with j-aggregates.

**Key words:** adrenal cortex cells, steroidogenesis, fluorescent dye, j-aggregates, mitochondrial potential.

Для лечения хронической надпочечниковой недостаточности все чаще применяется клеточная и тканевая трансплантация, а криоконсервирование биологического материала, в том числе и эндокринных клеток, является одним из способов его долгосрочного хранения до момента транспланта-

Cell and tissue therapy is now used to treat chronic adrenal insufficiency and cryopreservation of biological material, including endocrine cells is one of the methods of its long-term storage prior to transplantation [2, 3]. However, freeze-thawing can affect structural and functional state of transplanted material and as a result

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

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

<sup>3</sup>Институт сцинтилляционных материалов 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: tais\_jazz@mail.ru

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

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

<sup>3</sup>Institute for Scintillation Materials 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: tais\_jazz@mail.ru

ции [2, 3]. Однако процесс замораживания-отогрева может влиять на структурно-функциональное состояние трансплантируемого материала и в итоге определяет его эффективность в организме реципиента [2,7]. Таким образом, одной из главных задач криоконсервирования клеток коры надпочечников (ККН) является сохранение их стероидогенных свойств.

Важный этап биосинтеза стероидных гормонов – превращение холестерина в прегненолон с участием острого регуляторного стероидогенного белка (StAR), при участии которого холестерин доставляется к ферменту P450<sub>scc</sub>, локализованному на внутренней мембране митохондрии [12]. Для обеспечения этого процесса обязательно наличие мембранного потенциала ( $\Delta\psi_m$ ) на митохондриях [13], который можно оценить с помощью катионного флуоресцентного красителя JC-1 [9, 16, 18]. Присутствие на митохондриях  $\Delta\psi_m$  обеспечивает прохождение JC-1 внутрь органеллы, где, аккумулируясь в достаточном количестве, он формирует j-агрегаты, флуоресцирующие в красно-оранжевой области. В противном случае JC-1 не может накапливаться, оставаясь в мономерной форме в цитоплазме, и флуоресцирует в зеленой области [14]. Таким образом, клетки с потенциалом на мембране митохондрий легко отличить по наличию двойной зеленой и красно-оранжевой флуоресценции.

Для криоконсервирования стероидогенных эндокринных клеток наиболее часто в качестве криопротектора используют комбинированные криозащитные среды на основе диметилсульфоксида (ДМСО) и сыворотки крови. Однако целесообразность применения сывороточной добавки неоднозначна [6, 8, 19] и оценка мембранного потенциала митохондрий клеток, подвергнутых замораживанию-отогреву в комбинированных средах, вероятно, поможет оценить необходимость ее присутствия в среде.

Цель данной работы – изучение влияния условий криоконсервирования в бессывороточных и сывороткосодержащих криозащитных средах с разным содержанием ДМСО на формирование j-агрегатов в ККН крыс.

### Материалы и методы

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

В работе использовали суспензию клеток коры надпочечников (ККН) 3-месячных половозрелых крыс, полученную ферментативным способом. Для

determines its efficiency in a recipient's organism [2, 7]. Thus, one of the main tasks of adrenal cortex cells (ACCs) cryopreservation is preservation of their steroidogenic properties.

An important stage of steroid hormone biosynthesis is a transformation of cholesterol into pregnenolone with steroidogenic acute regulatory protein (StAR) due to which cholesterol is delivered to enzyme P450<sub>scc</sub> localized on interior membrane of mitochondrion [12]. To facilitate this process the presence of membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) on mitochondria is required [13] and this may be evaluated using cation fluorescent dye JC-1 [9, 16, 18]. The presence of  $\Delta\psi_m$  on mitochondria facilitate a penetration of JC-1 into organelles, where following concentrating it forms j-aggregates with red-orange fluorescence. Otherwise JC-1 can not be accumulated and is monomeric in cytoplasm and in this case its fluorescence is green [14]. Thus, the cells with potential on mitochondria membrane are easy to be distinguished by double green and red-orange fluorescence.

To cryopreserve steroidogenic endocrine cells the mostly used cryoprotective media are combinations of dimethylsulfoxide (DMSO) solutions and blood serum. However, the expedience of serum enrichment is still questionable [6, 8, 19] and assessment of membrane potential of cell mitochondria after freeze-thawing in combined media probably would help to estimate if its presence in medium is necessary.

The research aim is to study the effect of cryopreservation conditions in serum-free and serum-enriched cryoprotective media with different content of DMSO on formation of j-aggregates in rat ACCs.

### Materials and methods

The experiments were carried-out according to the General ethical principles of experiments in animals approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed with the statements of European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986).

In the research we used the adrenal cortex cell (ACC) suspension of 3 month-old adult rats derived by enzyme method. Adrenal cortex was separated from medulla under visual control of microscope MBS-10. Cortical adrenal tissue was placed in medium 199 (Biolot, Russia) with enzyme mixture containing collagenase V type (1 mg/ml, Sigma, USA), DNAase I type (0,1 mg/ml, Sigma) [10] for 15 min at 37°C, incubation was performed with constant agitating. Then the suspension was dispersed with Pasteur pipette and thrice washed free of enzyme solution in the medium 199 with 0.2% bovine serum albumin (Sigma) using centrifugation for 3 min at 1,500 rpm.

Cell viability was evaluated by their supravital staining with trypan blue. Viable cells exclude pene-

этого под микроскопом МБС-10 отделяли кортекс надпочечников от медулы. Кортикальную ткань надпочечников помещали в среду 199 (“Биолот”, Россия) с ферментативным коктейлем, содержащим коллагеназу V типа (1 мг/мл “Sigma”, США), ДНКазу I типа (0,1 мг/мл, “Sigma”) [10], 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 (“Sigma”) путем центрифугирования 3 мин при 1500 об/мин.

Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию их суправитальным красителем трипановым синим. Жизнеспособные клетки исключают проникающий внутрь краситель, в отличие от мертвых, которые окрашиваются синим цветом. В полученной суспензии ККН жизнеспособность в среднем составляла 85%. Сохранность ККН определяли как количество клеток в суспензии после инкубации с криозащитными средами или замораживания-отогрева по отношению к количеству клеток до инкубации или замораживания, выраженное в процентах.

В экспериментах использовали бессывороточные криозащитные среды, приготовленные на среде 199, с концентрациями ДМСО 5, 7, 10, 15% и сывороткосодержащие среды с такими же концентрациями ДМСО и с добавлением 25% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (“Биолот”, Россия).

Для минимизации осмотического повреждающего действия криозащитные среды добавляли ступенчатым способом. К 500 мкл суспензии клеток надпочечников в 5 этапов добавляли по 100 мкл раствора ДМСО двукратной концентрации с интервалом 1 мин, затем инкубировали 5 мин при 22°C для последующего замораживания или 20 мин для оценки влияния растворов криопротектора на сохранность и жизнеспособность клеток.

Суспензию ККН охлаждали со скоростью 1 град/мин до -40°C на программном замораживателе “Cryoson” (Германия) с последующим погружением в жидкий азот [5].

Для удаления криозащитных сред поэтапно уменьшали концентрацию ДМСО с дальнейшим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3 мин. Ступенчатое удаление криопротектора предполагало последовательное разведение средой 199 с 10% ЭТС путем добавления аликвот по 500, 500, 1000, 2000 мкл с интервалом 1 мин.

Для краткосрочного культивирования размороженную суспензию клеток помещали в среду 199 с 10% ЭТС на коллагеновую подложку в 96-луночный планшет на 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Клетки коры надпочечников окрашивали JC-1 (10 мкг/мл) в течение 30 мин при 37°C в среде ДМЕМ (“Sigma”) без фенолового красного, после чего дважды отмывали этой же средой.

trating dye unlike blue stained dead ones. In derived ACC suspension viability in average made 85%. Survival of ACCs was determined as cell number in suspension after incubation with cryoprotective media or freeze-thawing in relation to a cell number prior to effect, and expressed in percent.

In the experiments there we used serum-free cryoprotective media prepared on the base of medium 199 with 5; 7; 10; 15% DMSO concentrations or serum-enriched ones with the same DMSO concentrations and supplemented with 25% fetal bovine serum (FBS) (Biolot, Russia).

To minimize a damaging effect of osmotic factors the cryoprotective media were added to cell suspension step-wise. Double concentration of 100 µl DMSO was added through 5 steps into 500 µl of adrenal cell suspension by 1 min interval and then incubated for 5 min at 22°C for following freezing, or 20 min to evaluate the effect of cryoprotectant solutions on a cell survival and viability.

ACC suspension was cooled with the rate of 1 degree/min down to -40°C using Cryoson programmable freezer (Germany) and then plunged into liquid nitrogen [5].

To remove cryoprotective media the concentration of DMSO was stepwise reduced and then sample was centrifugated for 3 min at 1,500 rpm. Stepwise removal of cryoprotectant supposed a serial dilution with medium 199 with 10% FBS by addition of aliquots of 500, 500, 1,000, 2,000 µl with 1 min interval.

For a short-term culturing the frozen-thawed cell suspension was placed into the medium 199 with 10% FBS on collagen-coated surface in 96-well plate for 24 hrs at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Adrenal cortex cells were stained with JC-1 (10 µg/ml) for 30 min at 37°C in medium DMEM (Sigma) without phenol red, thereafter twice washed with the same medium.

Microscopic researches were performed with fluorescent microscope Olympus X71 (Japan) using light filters, excitation wave-length was 485 nm and emission was observed in green zone of spectrum at 520 nm, in red one at 590 nm. In each zone (with magnification 400) a cell number with and without j-aggregates was calculated.

ACCs stained with JC-1 were studied with flow cytometer FACS Calibur (BD Bioscience). The analysis of the data obtained in FACS Calibur was performed with WinMDI software.

To evaluate a mitochondrial potential there was used the coefficient of double fluorescence, which was calculated by the formula:

$$C_{df} = \frac{C_{green+red}}{C_{green}},$$

Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе “Olympus X71” (Япония) с использованием светофильтров: длина волны возбуждения 485 нм и эмиссии в зеленой области спектра 520 нм, в красной – 590 нм. В каждом поле (увеличение 400) подсчитывали количество клеток, содержащих и не содержащих j-агрегаты.

На проточном цитофлуориметре “FACS Calibur” (“BD Bioscience”, США) исследовали ККН, окрашенные JC-1. Анализ данных, полученных на “FACS Calibur”, осуществляли при помощи программы WinMDI.

Для оценки митохондриального потенциала использовали коэффициент двойной флуоресценции, который рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{оф}} = \frac{K_{\text{зелен+красн}}}{K_{\text{зелен}}},$$

где  $K_{\text{зелен+красн}}$  – количество клеток с красной и зеленой флуоресценцией;  $K_{\text{зелен}}$  – количество клеток только с зеленой флуоресценцией.

Повышение  $K_{\text{оф}}$  свидетельствует о поляризации мембран митохондрий, тогда как понижение  $K_{\text{оф}}$  – о деполяризации [17].

При статистической обработке результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Данные представляли как среднее значений, полученных в серии аналогичных экспериментов ( $n = 10$ ),  $\pm$  стандартное отклонение.

## Результаты и обсуждение

Для определения цитотоксичности криозащитных сред оценивали жизнеспособность и сохранность ККН после инкубации в течение 20 мин в условиях комнатной температуры 22°C (рис. 1). При проведении эксперимента продолжительность инкубации была выбрана исходя из того периода времени, в течение которого клетки контактировали с жидкофазными криозащитными средами. Сохранность клеток достоверно не отличалась от контроля в сывороткосодержащих криозащитных средах с концентрациями ДМСО 7 и 10% и бессывороточной среде – с 10% ДМСО. Самая низкая

where  $C_{\text{green+red}}$  is cell number with green and red fluorescence;  $C_{\text{green}}$  is cell number only with green fluorescence

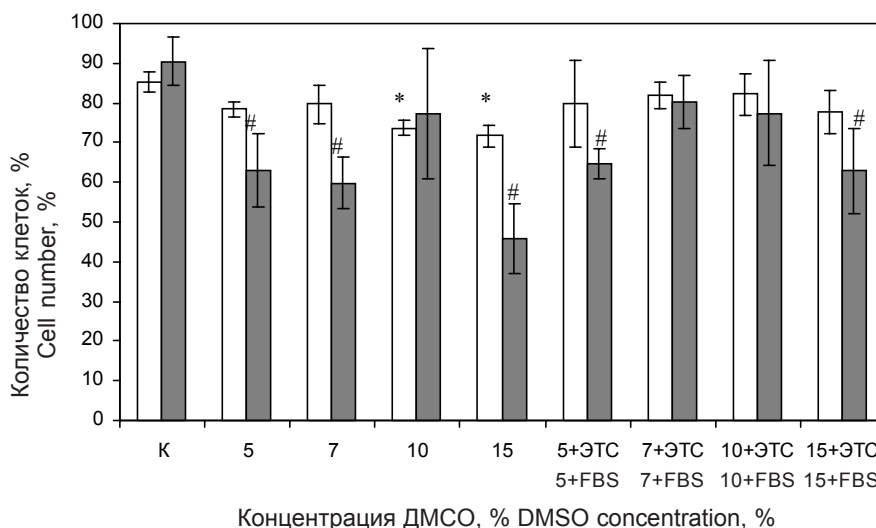
The increase of  $C_{\text{df}}$  testifies to polarization of mitochondria membranes, whereas the decrease of  $C_{\text{df}}$  means depolarization [17].

Statistical processing of the results was performed using one-factor dispersion analysis and Student's t-criterion. The differences were significant at  $p < 0.05$ . The data were presented as mean obtained during the same experiments ( $n = 10$ ),  $\pm$  standard deviation.

## Results and discussion

To examine cytotoxicity of cryoprotective media the viability and survival of ACCs were evaluated after incubation for 20 min at room temperature 22°C (Fig. 1). During the experiment an incubation duration was selected to conform the time within which the cells contact liquid cryoprotective media. The cell survival did not significantly differ from the control in serum-enriched cryoprotective media with 7 and 10% DMSO concentrations and in serum-free one with 10% DMSO. The lowest cell integrity was observed in serum-free medium with 15% DMSO. In the rest observed cryoprotective media it varied within the range of 70–85%.

Viability and survival of ACC were also evaluated after freeze-thawing of suspension. It was established that in serum-free cryoprotective media with different DMSO concentrations in average nearly 50% of cells were preserved (Fig. 2). Herewith ACC viability made



**Рис. 1.** Влияние инкубации ККН в криозащитных средах разного состава в течение 20 мин при 22°C на жизнеспособность (□) и сохранность (■) клеток; К – контроль; \* – отличия жизнеспособности достоверны относительно контроля; # – отличия сохранности достоверны относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Effect of ACC incubation in cryoprotective media of different composition during 20 min at 22°C on cell viability (□) and survival (■); K – control; \* – the differences in viability are significant if compared to the control; # – the differences in survival are significant if compared to the control;  $p < 0.05$ .

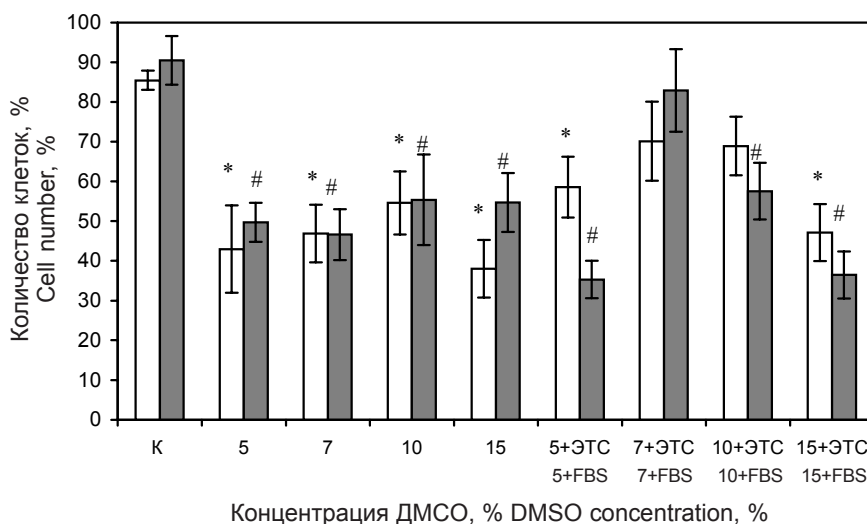
сохранность клеток наблюдалась в бессывороточной среде с 15% ДМСО. В остальных исследуемых криозащитных средах она колебалась в пределах 70–85%.

Показатели жизнеспособности и сохранности ККН оценивали также после замораживания-отогрева суспензии. Установлено, что в бессывороточных криозащитных средах с различной концентрацией ДМСО сохраняется в среднем около 50% клеток (рис. 2). Жизнеспособность ККН при этом составляла 39–55%: минимальная – для среды с 15% и максимальная – с 10% ДМСО.

После замораживания-отогрева ККН в сыворотко-содержащих средах наибольшее количество клеток (82%) сохранялось в среде с 7% ДМСО, а наименьшее (35%) – в образцах с 5 и 15% ДМСО. Жизнеспособность ККН составляла 70% в средах с 7 и 10% ДМСО, 57% – с 5% ДМСО. Наименьшее количество жизнеспособных клеток (46%) наблюдалось в среде с 15% ДМСО. Такая низкая жизнеспособность клеток в среде с 5% ДМСО, возможно, обусловлена недостаточным защитным эффектом данной концентрации криопротектора, а в среде с 15% ДМСО – его токсическим влиянием.

Для оценки митохондриального потенциала после оттаивания ККН окрашивали JC-1 и с помощью проточного цитофлуориметра оценивали количество клеток с двойной (красной и зеленой) и только зеленой флуоресценцией.

При анализе полученных данных на цитогамме по параметрам прямого и углового светорассеяния выделяли “регион событий”, отвечающий размерам исследованных клеток (рис. 3, А). Далее его анализировали по параметрам флуоресценции в зеленой и красной областях спектра (рис. 3, В). При этом выделяли три популяции клеток: 1) неокрашенные, среди которых основную часть составляли эритроциты; 2) флуоресцирующие в зеленой области спектра; 3) флуоресцирующие в зеленой и красной областях спектра (двойная флуоресценция). Мы подсчитывали количество ККН, имеющих двойную флуоресценцию. Эта популяция клеток содержала j-агрегаты, что свидетельствовало о наличии потенциала на мембране митохондрий и



**Рис. 2.** Влияние условий криоконсервирования ККН в криозащитных средах разного состава на жизнеспособность (□) и сохранность (■) клеток; К — контроль; \* — отличия жизнеспособности достоверны относительно контроля; # — отличия сохранности достоверны относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Effect of ACC cryopreservation conditions in cryoprotective media of different composition on cell viability (□) and survival (■); K — control; \* — the differences in viability are significant if compared to the control; # — the differences in survival are significant if compared to the control,  $p < 0.05$ .

39–55%: minimum for medium with 15% and maximum with 10% DMSO.

After freeze-thawing of ACC in serum-enriched media the biggest amount of cells (82%) was preserved in the medium with 7% DMSO, and lowest survival (35%) was in the samples with 5 and 15% DMSO. Viability of ACC made 70% in the media with 7 and 10% DMSO, 57% viability was with 5% DMSO. The least number of viable cells (46%) was observed in the medium with 15% DMSO. Such a low cell viability in the medium with 5% DMSO is probably stipulated by insufficient protective effect of this cryoprotectant concentration, and in the medium with 15% DMSO it was due to a toxic effect.

To assess a mitochondrial potential after thawing ACCs were stained with JC-1 and a number of cells with dual (red and green) and just green fluorescence was evaluated with flow cytometer.

Analyzing the obtained cytograms by direct and side scattering parameters we determined ‘region of events’ corresponding to the dimensions of the investigated cells (Fig. 3A). Later it was analyzed by the parameters of fluorescence in green and red spectrum regions (Fig. 3B). Furthermore three populations of cells were determined: 1) unstained cells (predominantly erythrocytes); 2) cells fluoresced in green spectrum region; 3) cells fluoresced in green and red spectrum regions (dual fluorescence). We estimated ACCs having a dual fluorescence. This population of cells contained j-aggregates. This fact testified to the presence of a potential

косвенно указывало на возможность активного стероидогенеза в клетках.

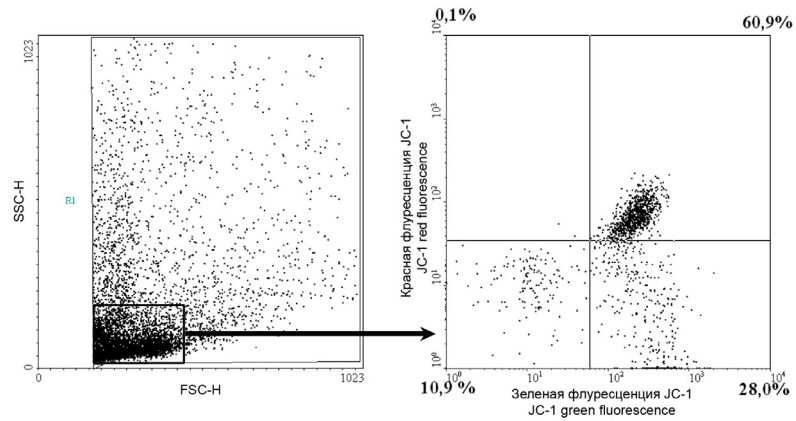
Установлено, что в свежесодержимой суспензии около 30% ККН обладали двойной красно-зеленой флуоресценцией (рис. 4). После оттаивания ККН, замороженных в бессывороточных криозащитных средах, наибольшее количество клеток с двойной флуоресценцией в пробе с 5% ДМСО составило 70%, а в остальных пробах – 45%.

Клетки коры надпочечников, криоконсервированные в сывороткосодержащих средах с концентрациями ДМСО 5 и 7%, содержали около 60%

клеток с двойной флуоресценцией; в среде с 10% ДМСО – 43%, а в среде с 15% ДМСО – 50%.

Коэффициент двойной флуоресценции для свежесодержимой суспензии ККН составил 1, а в клетках, криоконсервированных в бессывороточной среде с 5% ДМСО, – 5 (рис.5). В остальных криозащитных средах  $K_{df}$  составлял около 3, кроме сывороткосодержащей среды с 15% ДМСО (1,5). На основе полученных данных можно заключить, что после криоконсервирования ККН наблюдалось увеличение количества клеток с поляризованными митохондриями, содержащих j-агрегаты.

Известно, что повреждение клеток, возникшие вследствие замораживания-отогрева, могут иметь обратимый характер. Репарация клеточных дефектов может происходить при возвращении клеток в физиологические условия [1]. В связи с этим ККН после замораживания-отогрева культивировали 24 ч и окрашивали JC-1. Наибольшее количество j-агрегат-содержащих клеток (40%) наблюдали в бессывороточной среде с 7% ДМСО (рис. 6). В остальных случаях количество таких клеток колебалось в пределах 12–20% (минимальное для среды с 10%, максимальное – с 5% ДМСО).

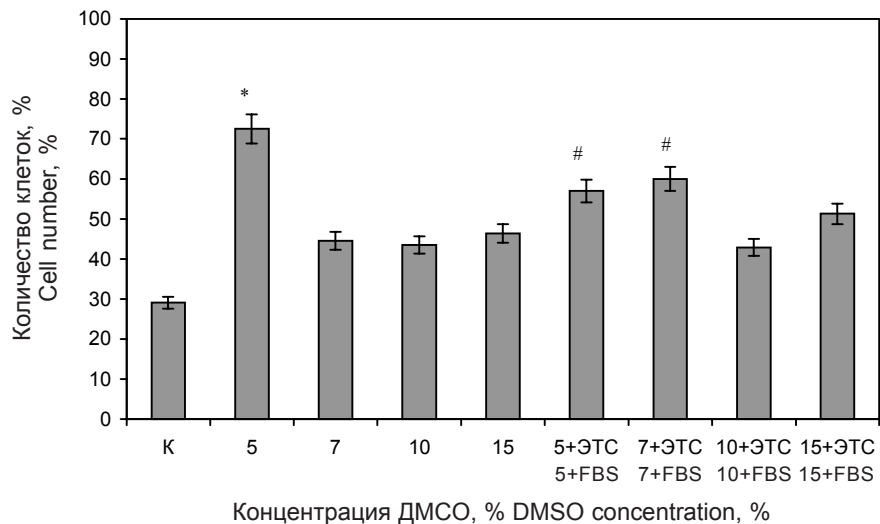


**Рис. 3.** Цитофлуориметрический анализ ККН, окрашенных JC-1: А – цитограмма по параметрам прямого и углового светорассеяния ККН; В – цитограмма по параметрам зеленой и красной флуоресценции.

**Fig.3.** Cytofluorimetric analysis of ACCs stained with JC-1: А – cytogram by direct and side scatter ing parameters of ACCs; В – cytogram on green and red fluorescence parameters.

on mitochondria membrane and indirectly pointed to the possibility of active steroidogenesis in cells.

It was that in fresh suspension about 30% of ACCs had dual red-green fluorescence (Fig. 4). After thawing of ACCs frozen in serum-free cryoprotective media the biggest amount of cells with dual fluorescence in the sample with 5% DMSO was 70%, and in the rest samples it made 45%.



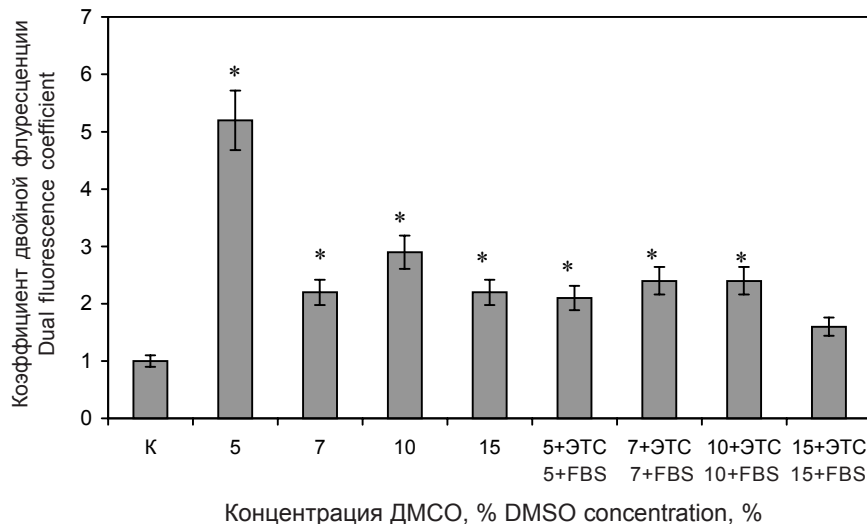
**Рис. 4.** Влияние условий криоконсервирования в бессывороточных и сывороткосодержащих средах с разной концентрацией ДМСО на флуоресценцию ККН, окрашенных JC-1 непосредственно после оттаивания; К – контроль; \* – различия достоверны по сравнению с остальными данными; # – отличие достоверно относительно такой же концентрации ДМСО в бессывороточной криозащитной среде,  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Effect of cryopreservation conditions in serum-free and serum containing media with different DMSO concentrations on fluorescence of ACCs stained with JC-1 immediately after thawing; K – control. \* – the difference is significant as compared to other data; # – the difference is significant as compared to the same DMSO concentration in serum-free cryoprotective medium,  $p < 0.05$ .

После культивирования замороженных-отогретых в сывороткосодержащих криозащитных средах с исследуемыми концентрациями ДМСО количество ККН с j-агрегатами достоверно не отличалось от контроля и достигало 5% от их общего количества.

На основании результатов, полученных при изучении токсичности криопротекторов до замораживания, можно заключить, что при использовании концентрации ДМСО свыше 10% уменьшается сохранность ККН.

После замораживания-отогрева снижается сохранность и жизнеспособность ККН по сравнению с нативными образцами до 50–70%. Необходимо отметить положительное влияние присутствия сыворотки в составе криозащитных сред на жизнеспособность ККН. Этот факт, возможно, объясняется способностью сыворотки компенсировать осмотическое давление, изменяющееся в процессе замораживания-отогрева клеточной суспензии. В литературе



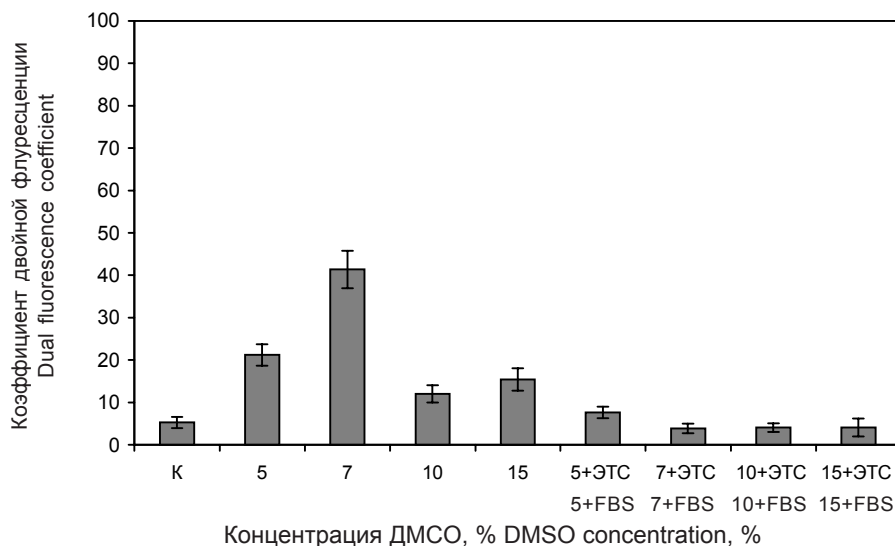
**Рис. 5.** Коэффициент двойной флуоресценции. К – контроль; \* – отличие достоверно относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 5.** Coefficient of double fluorescence; К – control; \* – the difference is significant as compared to the control,  $p < 0.05$ .

Adrenal cortex cell suspension cryopreserved in serum-enriched media with 5 and 7% DMSO concentration contained about 60% of cells with dual fluorescence; in the case of 10% DMSO it was 43%, and 50% were observed in the suspension cryopreserved in the medium with 15% DMSO.

The coefficient of dual fluorescence for fresh ACC suspension was 1, and in the cells cryopreserved in serum-free medium with 5% DMSO it made 5 (Fig. 5), in other cryoprotective media  $C_{df}$  it was about 3, except serum-enriched medium with 15% DMSO, where it was 1.5. Thus we may conclude that freeze-thawing of ACCs resulted in rised number of cells with polarized mitochondria comprising j-aggregates.

It is known the cell damages appearing after freeze-thawing may have a reversible character. Reparation of cell defects may occur during cell transfer to physiological conditions [1]. For this aim we cultured ACCs after freeze-thawing for 24 hrs and then stained with JC-1. The highest number (40%) of cells containing j-aggregates was



**Рис. 6.** Влияние условий криоконсервирования в бессывороточных, сывороткосодержащих и криозащитных средах с разной концентрацией криопротектора на формирование j-агрегатов в ККН после краткосрочного культивирования; К – контроль; \* – отличие достоверно относительно контроля,  $p < 0,05$ .

**Fig. 6.** Effect of cryopreservation conditions in serum-free, serum containing and cryoprotective media with different concentration of cryoprotectant on j-aggregates formation on ACCs after short-term culturing; C – control; \* – the difference is significant if compared to the control,  $p < 0.05$ .

эффект добавления сыворотки в криозащитную среду описан противоречиво [8, 19], однако в работе [6] также показана высокая жизнеспособность и сохранность культуры клеток надпочечников новорожденных поросят при криоконсервировании первичной в криозащитных средах с добавлением ЭТС.

Поскольку стероидогенез в ККН зависит от мембранного потенциала митохондрий  $\Delta\psi_m$  [11, 15], мы оценивали его с помощью окрашивания флуоресцентным красителем JC-1. Установлено, что после криоконсервирования во всех изученных криозащитных средах в ККН образуется большее количество клеток с j-агрегатами по сравнению со свежевыделенными клетками. Наибольшее их количество (72%) наблюдалось после криоконсервирования в бессывороточной среде с 5% ДМСО. Возможно, это связано со стимулирующим действием ДМСО в данной концентрации на активность аденилатциклазы и секрецию стероидных гормонов [3, 4]. Увеличение количества клеток с j-агрегатами в ККН косвенно подтверждает данные об активации базальной секреции стероидных гормонов после криоконсервирования [7].

После культивирования в течение 24 ч количество j-агрегат-содержащих ККН, замороженных в сывороткосодержащих криозащитных средах, не отличается от контрольных значений, тогда как после криоконсервирования ККН в бессывороточных средах сохраняется повышенное количество клеток с j-агрегатами. По нашему мнению, такое явление носит негативный характер, поэтому для криоконсервирования ККН более предпочтительны сывороткосодержащие криозащитные среды, позволяющие нивелировать это влияние.

## Выводы

1. Наиболее выраженный цитотоксический эффект по показателю сохранности при инкубации в криозащитных средах оказала бессывороточная среда с концентрацией ДМСО 15%, а наименее – сывороткосодержащие среды с концентрациями ДМСО 7 и 10 %.

2. Наилучшими показателями жизнеспособности и сохранности ККН в изученных условиях криоконсервирования обладала сывороткосодержащая среда с концентрацией ДМСО 7%.

3. Количество ККН, содержащих j-агрегаты, увеличивалось после замораживания-отогрева во всех криозащитных средах и сохранялось после краткосрочного культивирования ККН, замороженных-отогретых в бессывороточных средах. При этом наиболее выраженный эффект наблюдался в средах с концентрациями ДМСО 5 и 7%.

observed in serum-free medium with 7% DMSO (Fig. 6). In other cases their number varied within 12–20% (minimal for the medium with 10%, maximal for the one with 5% DMSO).

After culturing of frozen-thawed cells in serum-enriched cryoprotective media with the investigated DMSO concentrations the number of ACCs with j-aggregates did not significantly differ from the control and reached 5% of their total number.

The results obtained during the studying of cryoprotectant toxicity prior to freezing attest to the fact that ACC survival decreases at DMSO concentration over 10%.

After freeze-thawing the ACC survival and viability decrease down to 50–70% as compared to the non-frozen-thawed samples. A positive effect of serum presence in cryoprotective media on ACC viability in should be noted. This fact could be explained by probable ability of serum to compensate osmotic pressure variations during freeze-thawing of cell suspension. The effect of serum adding to cryoprotective medium is reported as controversial [8, 19]. Earlier we have shown [6] a high viability and survival of a primary culture of newborn piglet adrenal cells after freeze-thawing in cryoprotective media enriched with FBS.

Because steroidogenesis in ACCs depends on the mitochondria membrane potential  $\Delta\psi_m$  [11, 15], we assessed it by staining with fluorescent dye JC-1. We established that after cryopreservation in all the studied cryoprotective media a higher content of ACC with j-aggregates is observed if compared with fresh suspension. The highest content (72%) was observed after cryopreservation in serum-free medium with 5% DMSO. Probably it is associated with stimulation effect of DMSO in this concentration on activity of adenylate cyclase and secretion of steroid hormones [3, 4]. The increase of ACC with j-aggregates content indirectly confirms the data for activation of steroid hormones basal secretion after cryopreservation [7].

After the day of culturing the number of cells containing j-aggregates did not change in the case if ACCs were frozen-thawed in serum-enriched medium and does not differ from the control values, whereas in the case of serum-free medium their number remains increased. We believe that this phenomenon is of negative nature therefore serum-enriched cryoprotective media enabling to neutralize this effect are more preferable for ACC cryopreservation.

## Conclusions

1. The most expressed cytotoxic effect on survival index during incubation in cryoprotective media was manifested when using serum-free medium with DMSO concentration of 15%, and the lowest effect



## Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 432 с.
2. Бондаренко Т.П., Самченко И.И., Божок Г.А., Алабедаль-карим Н.М. Гормонсекретирующая способность криоконсервированной органной культуры надпочечников новорожденных поросят *in vivo* и *in vitro* // Проблемы медицинской науки та освіти.– 2002.– № 3 – С. 35–37.
3. Грищенко В.И., Бондаренко Т.П., Легач Е.И., та ін. Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування органної культури наднирників новонароджених поросят в лікуванні недостатності наднирників: Метод. рекомендації – Харків, 2000.– 12 с.
4. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь М.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук. думка, 1993.– 244 с.
5. Дудецкая Г.В., Гурина Т.М., Бондаренко Т.П. Изучение возможности криоконсервирования клеток надпочечников крыс // Проблемы кробиологии.– 2010.– Т. 20, №4.– С. 379–387.
6. Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И. и др. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят // Проблемы кробиологии.– 2011.– Т. 21, №1.– С. 58–67.
7. Устиченко В.Д. Функціональні властивості надниркових залоз новонароджених поросят при дії різних режимів заморожування: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.– Харків, 2006.– 20 с.
8. Brockbank K.G., Heacox A.E., Schenke–Layland K. Guidance for removal of fetal bovine serum from cryopreserved heart valve processing // Cell Tissues Organs.– 2011.– Vol. 193, N4.– P. 264–273.
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, N1.– P. 40–45.
10. Hales D.B., Allen J.A., Shankara T. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. // Ann. N.Y. Acad. Sci.– 2005.– Vol. 1061.– P. 120–134.
11. Dunn J.C., Chu Y., Qin H.H., Zupekan T. Transplantation of adrenal cortical progenitor cells enriched by Nile red // J. Surg. Res.– 2009.– Vol. 156, N2.– P. 317–324.
12. Jefcoate C. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex // J. Clin. Invest.– 2002.– Vol. 110, N7.– P. 881–890.
13. King S.R., Liu Z., Soh J. et al. Effects of disruption of the mitochondrial electrochemical gradient on steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein // J. Steroid Biochem. Mol. Biol.– 1999.– Vol. 69, N1–6.– P.143–54.
14. 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, N1–2.– P. 153–159.
15. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J. et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide // BioTechniques.– Vol. 50, N2.– P. 98–115.
16. 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.
17. Wilding M., Dale B., Marino M. et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos // Hum. Reprod.– 2001.– Vol.16, N5.– P. 909–917.
18. 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, N6.– P. 413–420.

was observed in serum-enriched media with 7 or 10% DMSO concentrations.

2. Serum-enriched medium with 7% DMSO concentration provided the highest indices of ACC viability and survival in the studied conditions.

3. Number of ACCs containing j-aggregates increased after freeze-thawing in all the cryoprotective media and was kept after short-term culturing of ACCs frozen-thawed in serum-free media. Herewith, the most pronounced effect was observed in the media with 5 and 7% DMSO concentrations.

## References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 432 p.
2. Bondarenko T.P., Samchenko I.I., Bozhok G.A., Alabedalkarim N.M. Hormone-secreting ability of cryopreserved organ culture of newly born piglet adrenal glands *in vivo* and *in vitro* // Problems of Medical Science and Education.– 2002.– N3.– P. 35–37.
3. Grischenko V.I., Bondarenko T.P., Legach E.I. et al. Procurement, cryopreservation and clinical use of organ culture of newly born piglet adrenal glands in treatment of adrenal insufficiency: Methodical recommendations.– Kharkiv, 2000.– 12 p.
4. Grischenko V.I., Chuyko V.A., Pushkar M.S. Cryopreservation of endocrine organ cells and tissues.– Kiev: Naukova Dumka, 1993.– 244 p.
5. Dudetskaya G.V., Gurina T.M., Bondarenko T.P. Study of possibility of rat adrenal gland cells cryopreservation // Vestnik of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology.– 2010.– Vol. 20, N4.– P. 379–387.
6. Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I. et al. Study of possibility to obtain and cryopreserve adrenal cell primary culture of newly born piglets // Problems of Cryobiology.– 2011.– Vol. 21, N1.– P. 58–67.
7. Ustichenko V.D. Functional properties of newly born piglet adrenal glands at different freezing regimens: Author's Abstract of the Thesis of Candidate of Biological Sciences.– Kharkiv, 2006.– 20 p.
8. Brockbank K.G., Heacox A.E., Schenke–Layland K. Guidance for removal of fetal bovine serum from cryopreserved heart valve processing // Cell Tissues Organs.– 2011.– Vol. 193, N4.– P. 264–273.
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, N1.– P. 40–45.
10. Hales D.B., Allen J.A., Shankara T. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. // Ann. N.Y. Acad. Sci.– 2005.– Vol. 1061.– P. 120–134.
11. Dunn J.C., Chu Y., Qin H.H., Zupekan T. Transplantation of adrenal cortical progenitor cells enriched by Nile red // J. Surg. Res.– 2009.– Vol. 156, N2.– P. 317–324.
12. Jefcoate C. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex // J. Clin. Invest.– 2002.– Vol. 110, N7.– P. 881–890.
13. King S.R., Liu Z., Soh J. et al. Effects of disruption of the mitochondrial electrochemical gradient on steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein // J. Steroid Biochem. Mol. Biol.– 1999.– Vol. 69, N1–6.– P. 143–54.

19. 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, N3.– P. 212–118.

*Поступила 04.10.2011*

14. 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, N1–2.– P. 153–159.
15. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J. *et al.* Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide // *BioTechniques*.– Vol. 50, N2.– P. 98–115.
16. 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.
17. Wilding M., Dale B., Marino M. *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos // *Hum. Reprod*.– 2001.– Vol.16, N5.– P. 909–917.
18. 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, N6.– P. 413–420.
19. 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, N3.– P. 212–118.

*Accepted 04.10.2011*