

Влияние скорости охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс

UDC 612.451.014.3.085:612.592

G.V. DUDETSKAYA*, G.A. BOZHOK, T.P. BONDARENKO

Effect of Cooling Rate on Integrity of Zone-Differentiated Adrenal Cell Populations of Rats

С помощью методов флуоресцентной микроскопии и гистохимического окрашивания были изучены клетки надпочечников взрослых крыс до и после криоконсервирования. Низкие скорости охлаждения позволяют сохранить наибольшее количество клеток в суспензии после замораживания-отогрева. Скорости охлаждения оказывают селективное действие на сохранность клеток коркового и мозгового вещества надпочечников.

Ключевые слова: флуоресцентные красители, 3β -гидроксистероиддегидрогеназа, хромогранин А, криоконсервирование, скорость охлаждения, суспензия клеток надпочечников.

За допомогою методів флуоресцентної мікроскопії та гістохімічного забарвлювання досліджено клітини наднирників дорослих щурів до та після криоконсервування. Низькі швидкості охолодження дозволяють зберегти найбільшу кількість клітин у суспензії після заморожування-відігрівання. Швидкості охолодження чинять селективну дію на збереженість клітин кіркової і мозкової речовини наднирників.

Ключові слова: флуоресцентні барвники, 3β -гидроксистероїддегідрогеназа, хромогранін А, криоконсервування, швидкість охолодження, суспензія клітин наднирників.

By means of the fluorescent microscopy and histochemical staining the adult rat adrenal cells prior to and after cryopreservation were studied. Low cooling rates enable the preservation of the highest number of cells in suspension after freeze-thawing. Cooling rates cause a selective effect on preservation of the cells of cortical and medullar substances of adrenal glands.

Key words: fluorescent dyes, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, chromogranin A, cryopreservation, cooling rate, adrenal cell suspension.

Применение медикаментозной терапии для лечения надпочечниковой недостаточности не всегда приводит к положительному эффекту. Это определило необходимость поиска новых методов лечения данной патологии. Одним из таких методов является трансплантация адренокортикальных клеток [2, 9, 10, 14, 17, 21, 24]. Стероидные гормоны, продуцируемые клетками коркового вещества надпочечников, оказывают заместительный эффект в отношении отсутствующих эндогенных гормонов собственной железы реципиента [19, 24]. Была показана возможность лечения паркинсонизма у экспериментальных животных путем трансплантации хромоаффинных клеток мозгового слоя надпочечников [8]. Поэтому разработка способа криоконсервирования адренокортикоцитов с целью создания запасов материала для последующей трансплантации актуальна.

В литературе приведены данные о криоконсервировании суспензии хромоаффинных клеток, выде-

Application of drug therapy to cure adrenal insufficiency not always leads to a positive effect. This preconditioned the necessity of searching the new treatment methods for this pathology. One of these methods is transplantation of adrenocortical cells [2, 9, 10, 14, 17, 21, 24]. Steroid hormones, produced by the adrenal cells of cortical substance render a substitutive effect in respect of missing endogenous hormones of own recipient's gland [19, 24]. There has been shown the possibility of Parkinsonism treatment in experimental animals by means of transplantation of adrenomedullary chromaffin cells [8]. Therefore the development of cryopreservation method for adrenocorticoytes to create the stocks of the material for following transplantation is an actual one.

There are reported data about cryopreservation of the suspension of chromaffin cells, isolated from human embryonic adrenal glands [27]. However, the question about the effect of cooling rate on the survival of all cell populations in the suspension has not been studied.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

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

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

ленных из эмбриональных надпочечных желез человека [27]. Однако вопрос о влиянии скорости охлаждения на сохранность всех популяций клеток в суспензии не изучен. В связи с этим необходимы исследования, направленные на оценку влияния скорости охлаждения на сохранность клеток надпочечников при криоконсервировании.

Цель работы – определить сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс при использовании различных скоростей охлаждения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили надпочечники взрослых крыс. Для получения суспензии клеток железы измельчали на фрагменты 2–3 мм³ и в 3 этапа (30, 10, 10 мин) инкубировали при 37°C в ферментативном растворе, содержащем среду 199, коллагеназу (1 мг/мл) и ДНКазу (0,2 мг/мл) [16]. Суспензии клеток, полученные на всех этапах коллагенизации, объединяли и удаляли ферментативный раствор двукратным центрифугированием в среде 199, содержащей 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), при 225g в течение 3 мин. Затем суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм, и снова центрифугировали в среде 199 с 10%-й сывороткой крупного рогатого скота (КРС).

В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Криозащитный раствор, содержащий 14% ДМСО и 10% сыворотки КРС готовили на среде 199. Поэтапное добавление криопротектора к суспензии клеток позволяет повысить их сохранность при криоконсервировании [20, 22, 23]. К 500 мкл суспензии клеток надпочечников с интервалом 1 мин при температуре 0–4°C добавляли по 100 мкл раствора ДМСО (в 5 этапов). Конечная концентрация ДМСО в образце составила 7%. Образцы замораживали в криоампулах фирмы “Nunc” (США) объемом 1,8 мл на программном замораживателе “Cryoson” (Германия).

При замораживании образцов использовали постоянные скорости охлаждения: 1; 5; 10; 15; 20; 40 градусов/мин (до –40°C) и затем погружали в жидкий азот (–196°C). Также замораживали образцы с неконтролируемой скоростью охлаждения прямым погружением в жидкий азот (↓LN₂). Отогревали на водяной бане (37°C) до исчезновения твердой фазы при визуальной оценке.

Криопротектор после размораживания удаляли поэтапно [1] с последующим центрифугированием в течение 3 мин при 225g. Отмывочная среда содержала 10% сыворотки КРС и 2,5% БСА. Процент жизнеспособных клеток определяли с помо-

In this connection the studies targeted to the estimation of the cooling rate effect on the survival of adrenal cells during cryopreservation is necessary.

The research aim is to examine the survival of zone-differentiated cell populations of rat adrenal glands when using different cooling rates.

Materials and methods

The research object was adrenal glands of adult rats. To obtain the cell suspension the glands were fragmented by 2–3 mm³ and incubated in 3 stages (30, 10, 10 min) at 37°C in enzyme solution, containing the medium 199, collagenase (1 mg/ml) and DNase (0.2 mg/ml) [16]. Cell suspensions obtained at all the stages of collagenization were combined and enzyme solution was removed with two-fold centrifugation in the medium 199, containing 0.2% bovine serum albumin (BSA), at 225g for 3 min. Then the suspension was filtered through nylon filter with 100 mm pore diameter and again centrifugated in the medium 199 with 10% bovine serum (BS).

Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as the cryoprotectant. Cryoprotective solution was 14% DMSO in medium 199 supplemented with 10% BS. Stepwise adding of cryoprotective solution into cell suspension allows the increase of cell survival during cryopreservation [20, 22, 23]. 500 µl of DMSO solution was added to 500 µl of adrenal cell suspension in 5 steps (100 µl of DMSO solution on each one) with 1 min interval at the temperature of 0–4°C. The final DMSO concentration in the sample was 7%. The samples were frozen in 1.8 ml cryovials (Nunc, USA) using the programmable freezer (Cryoson, Germany).

During freezing of the samples the constant cooling rates, 1; 5; 10; 15; 20 and 40 degrees/min (down to –40°C) were used and then the vials were plunged into liquid nitrogen (–196°C). As well the samples were frozen with non-controlled rate cooling by a direct plunging into liquid nitrogen (↓LN₂). The thawing was performed in water bath (37°C) up to the solid phase disappearance under visual assessment.

After thawing the cryoprotectant was stepwise removed [1] with following 3 min centrifugation at 225g. The washing medium contained 10% BS and 2.5% BSA. The percentage of viable cells was examined using fluorescent dyes [18]: fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). Afterwards the samples were twice washed with the medium 199 and the cell fluorescence was assessed with luminescent microscope Olympus IX-71 (Japan) at the fluorescence excitation wavelength of 488 nm.

Significant number of lipid inclusions and the activity of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) are integral parameters of steroid producing cells in adrenal

щью флуоресцентных красителей [18]: флуоресцеин диацетата (ФДА) и пропидиум йодида (ПИ). Далее образцы дважды отмывали средой 199 и оценивали флуоресценцию клеток на люминесцентном микроскопе Olympus IX-71 (Япония) при длине волны возбуждения флуоресценции 488 нм.

Значительное количество липидных включений и активность 3β -гидроксистероиддегидрогеназы (3β -ГСД) являются неотъемлемой характеристикой стероидпродуцирующих клеток в надпочечниках. Для выявления липидных включений клетки окрашивали нильским красным (НК) по методу, описанному в [29]. В 1 мл ДМСО растворяли 1 мг красителя. Перед окрашиванием раствор красителя разводили 1:100 физиологическим раствором на фосфатном буфере (PBS) (pH 7,4) и добавляли 15 мкл данного раствора к 1 мл клеточной суспензии. Клетки окрашивали 10 мин при 37°C и затем отмывали от избытка красителя физиологическим раствором на фосфатном буфере. Для регистрации флуоресценции использовали люминесцентный микроскоп Olympus IX-71 (при длине волны возбуждения 455–500 нм). Сохранность НК⁺-клеток после криоконсервирования определяли по содержанию в их цитоплазме окрашенных включений и выражали в процентах по отношению к общему количеству клеток в образце после отогрева.

Для выявления в клетках активности 3β -ГСД проводили гистохимическое окрашивание по методу, предложенному в работе [6]. Для этого суспензию клеток инкубировали в 2,5 мл забуференного физиологического раствора (pH 7,4), содержащего 0,2 мг/мл нитросинего тетразолия, 1 мг/мл никотинамид-адениндинуклеотид и 0,12 мг/мл дегидроэпиандростерона в течение 90 мин при 37°C. Позитивно окрашенные клетки (3β -ГСД⁺ – клетки) имели фиолетовую окраску восстановленного тетразолия. Подсчет 3β -ГСД⁺ – клеток осуществляли в поле зрения микроскопа и выражали в процентном соотношении их к общему количеству клеток в образце.

Нативные и криоконсервированные клетки окрашивали иммуногистохимическим методом для выявления белка хромогранина А, специфического для клеток мозгового вещества надпочечников [15]. Клетки фиксировали 4%-м параформальдегидом, приготовленным на PBS, в течение 15 мин при температуре 22°C. Пермеабиллизацию клеток проводили в течение 2 мин в абсолютном этиловом спирте, после чего клетки инкубировали 1 час в 1%-м растворе БСА, приготовленном на PBS, содержащем 0,1% тритона X-100. Затем клетки инкубировали с первичными антителами к хромогранину А (антитела кроличьи поликлональные к

glands. To reveal lipid inclusions the cells were stained with Nile red (NR) according to the method reported [29]. 1 mg of the dye was diluted in 1 ml DMSO. Prior to the staining the dye solution was diluted 1:100 with phosphate buffered physiological solution (PBS) (pH 7.4) and 15 μ l of this solution was added to 1 ml of cell suspension. The cells were stained for 10 min at 37°C and then washed with PBS from the surplus dye. To record the fluorescence the luminescent microscope Olympus IX-71 was used (excitation wavelength of 455–500 nm). NR⁺ cells post-thaw integrity was examined by the cytoplasm content of stained inclusions and expressed in the percentage in respect to total cell number in the sample after thawing.

To reveal 3β -HSD activity in the cells the histochemical staining was performed according to the method proposed in the paper [6]. For this aim the cell suspension was incubated in 2.5 ml buffered physiological solution (pH 7.4), supplemented with 0.2 mg/ml nitroblue tetrazolium, 1 mg/ml nicotinamide adenine nucleotide and 0.12 mg/ml dehydroepiandrosterone for 90 min at 37°C. Positively stained cells (3β -HSD⁺-cells) were violet because of the presence of reduced tetrazolium. The 3β -HSD⁺-cells were counted in the vision field of microscope and expressed in the percentage vs. total cell number in the sample.

Native and frozen-thawed cells were stained with immunohistochemical method to reveal the chromogranin A protein specific for the cells of adrenomedullar substances [15]. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS during 15 min at 22°C. Permeabilization of the cells was performed during 2 min in an absolute ethyl alcohol, then the cells were incubated for 1 hr in PBS supplemented with 1% BSA and 0.1% Triton X-100. Then the cells were incubated with primary antibodies to chromogranin A (rabbit polyclonal antibodies to chromogranin A, Abcam, 1:100) for 12 hrs at 4°C, and then with secondary antibodies (sheep polyclonal antibodies to rabbit IgG, conjugated with Texas Red, Abcam, 1:200) for 1 hour at 22°C in the darkness. The fluorescence was recorded using luminescent microscope Olympus IX-71 at excitation wavelength of 620 nm.

Statistical processing of the results was performed using the single factor analysis of variance and Student's t-criterion with Excel software. The differences of indices were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

For the analysis of cryopreservation efficiency the estimation of the number of viable cells is important. Existing methods of assessing the viability of nucleated cells are based on the examining the presence of the

хромогранину А, Abcam, 1:100) в течение 12 ч при 4°C, и со вторичными (овечьи поликлональные антитела к кроличьему IgG, конъюгированные с Texas Red, Abcam, 1:200) – в течение часа при температуре 22°C в темноте. Регистрировали флуоресценцию при помощи люминесцентного микроскопа Olympus IX-71 при возбуждении световым пучком с длиной волны 620 нм.

При статистической обработке результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента с помощью пакета программ Excel. Разницу показателей считали достоверной при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для анализа эффективности криоконсервирования важна оценка количества жизнеспособных клеток. Существующие методы оценки жизнеспособности ядерных клеток основаны на определении наличия ядра, целостности клеточной мембраны и уровня функциональной активности. В данной работе для оценки жизнеспособности клеток использовали двойное окрашивание ФДА и ПИ. Накопление ФДА в цитоплазме является показателем целостности клеточной мембраны и метаболической активности клеток [4], а окрашивание ПИ свидетельствует о наличии ядра. Известно, что ПИ обладает способностью специфически окрашивать нуклеиновые кислоты [18], а использование глутарового альдегида облегчает проникновение ПИ и обеспечивает его связывание с ДНК/РНК в клетках, сохранивших ядра. Исходя из этого, окрашивание ПИ проводили в присутствии фиксатора глутарового альдегида. Формирующаяся при этом красная и зеленая флуоресценция может визуализироваться при помощи флуоресцентного микроскопа [5, 7]. Таким образом, при окрашивании клеток данным способом наблюдается одновременное включение ФДА (зеленая флуоресценция) и ПИ (красная флуоресценция), что является признаком жизнеспособности ядерных клеток. Наличие только красной флуоресценции свидетельствует об отсутствии активности внутриклеточных эстераз ядерной клетки, то есть о ее нежизнеспособности.

Как видно из рис. 1, жизнеспособность клеток снижалась после криоконсервирования по всем программам. Однако наиболее выраженное падение жизнеспособности суспензии клеток было выявлено при использовании скоростей охлаждения свыше 10 градусов/мин и непосредственном погружении в жидкий азот. Наибольшее количество жизнеспособных клеток сохранилось при использовании скоростей охлаждения 1; 5 и 10 градусов/мин. Следовательно, при криоконсервировании суспензии клеток надпочечников крыс необходимо ис-

пользовать скорость охлаждения до 10 градусов/мин, целостность клеточной мембраны и функциональный уровень активности. В этом исследовании для оценки жизнеспособности клеток использовалось двойное окрашивание ФДА и ПИ. Накопление ФДА в цитоплазме является индексом целостности мембраны и метаболической активности клеток [4] и окрашивание ПИ свидетельствует о наличии ядра. Известно, что ПИ имеет способность специфически окрашивать нуклеиновые кислоты [18], а использование глутарового альдегида облегчает проникновение ПИ и обеспечивает его связывание с ДНК/РНК в клетках, сохраняющих ядра. Поэтому ПИ окрашивали в присутствии глутарового альдегида. Формирующаяся при этом красная и зеленая флуоресценция может быть визуализирована с помощью флуоресцентного микроскопа [5, 7]. Таким образом, при двойном окрашивании клеток наблюдается одновременное включение ФДА (зеленая флуоресценция) и ПИ (красная флуоресценция), что свидетельствует о жизнеспособности ядерных клеток. Наличие только красной флуоресценции свидетельствует об отсутствии активности эстераз в ядерной клетке, *т.е.* ее нежизнеспособности.

Как видно из рис. 1, жизнеспособность клеток снижалась после криоконсервирования по всем программам. Однако наиболее выраженное падение жизнеспособности суспензии клеток было выявлено при использовании скоростей охлаждения свыше 10 градусов/мин и непосредственном погружении в жидкий азот. Наибольшее количество жизнеспособных клеток сохранилось при использовании скоростей охлаждения 1, 5 и 10 градусов/мин. Следовательно, при криоконсервировании суспензии клеток надпочечников крыс необходимо использовать скорость охлаждения до 10 градусов/мин.

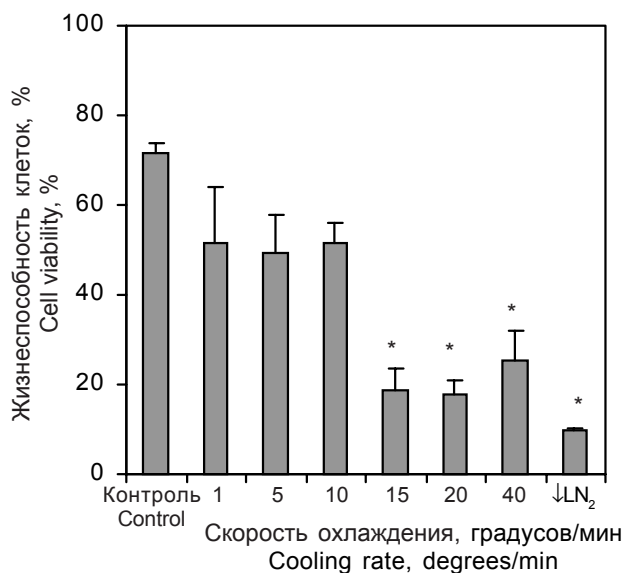


Рис. 1. Жизнеспособность клеток надпочечников взрослых крыс (по включению ФДА/ПИ) до (контроль) и после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения; * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Fig. 1. Adrenal cell viability of adult rats (on the inclusion of FDA/PI) prior to (the control) and after freeze-thawing with different cooling rates; * – differences are statistically significant comparing to the control, $p < 0.05$.

пользовать низкие (до 10 градусов/мин) скорости охлаждения.

Формирование цитоплазматических липидных капель в стероид-продуцирующих клетках надпочечников является одним из основных процессов. Они представляют собой скопление нейтральных липидов, обычно триглицеридов или холестеринных эфиров, которые используются как источник запаса энергии в организме или как депо холестерина для синтеза стероидных гормонов в стероидогенных тканях [3, 9, 11–13, 28]. Для визуализации в клетках цитоплазматических липидных капель использовали флуоресцентный краситель НК.

Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о значительном уменьшении количества клеток, содержащих липидные капли, после замораживания со скоростями 15; 20, 40 градусов/мин и неконтролируемой скоростью охлаждения ($\downarrow LN_2$). Образцы, криоконсервированные со скоростями 1; 5 и 10 градусов/мин, сохраняют количество клеток, окрашенных НК на уровне контрольных значений. Таким образом, оценивая сохранность липидных капель в клетках после криоконсервирования, было установлено, что достоверные отличия между контрольным значением и данными после замораживания с контролируемыми скоростями охлаждения 1, 5, 10 градусов/мин не выявлены. При этом режимы замораживания с контролируемыми скоростями охлаждения 15, 20 и 40 градусов/мин и неконтролируемой скоростью охлаждения ($\downarrow LN_2$) снижают этот показатель практически вдвое.

Одним из методов оценки жизнеспособности стероидпродуцирующих клеток в суспензии является определение активности фермента 3β -ГСД, который обеспечивает конверсию прегненолона в прогестерон и характеризует функциональную активность стероид-продуцирующих клеток. Поэтому наличие позитивно окрашенных клеток, имеющих фиолетовую окраску восстановленного тетразолия, свидетельствует о сохранности стероид-продуцирующих клеток в суспензии.

Как видно из рис. 3, сохранность 3β -ГСД⁺ – клеток после криоконсервирования оставалась на уровне контрольных значений при охлаждении со скоростями 1; 5, 15 и 20 градусов/мин. Охлаждение суспензии со скоростью 40 градусов/мин и погружение в жидкий азот привели к снижению количества 3β -ГСД⁺ – клеток. При замораживании суспензии со скоростью 10 градусов/мин сохранность 3β -ГСД⁺ – клеток по сравнению с контролем была достоверно выше. Таким образом, использование скорости охлаждения 10 градусов/мин для замораживания клеток надпочечных желез крыс позволяет получить суспензию клеток с повышенным содержанием 3β -ГСД⁺ – клеток.

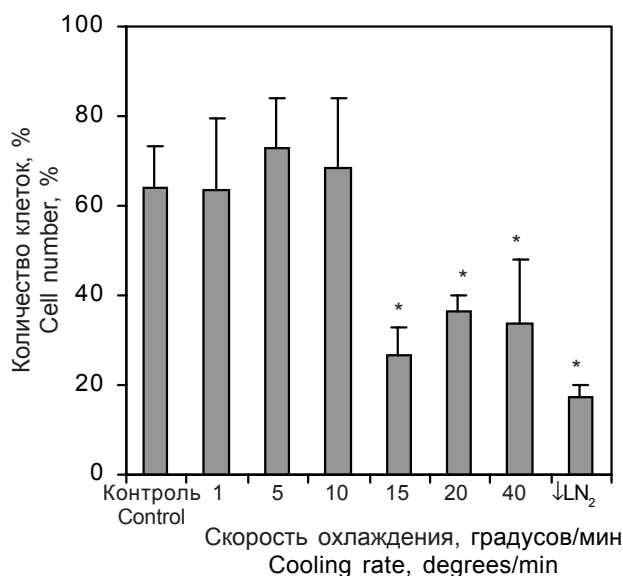


Рис. 2. Количество клеток надпочечников, включающих НК до (контроль) и после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения; * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Fig. 2. Adrenal cell number positively stained with NR prior to (the control) and after freeze-thawing with different cooling rates; * – differences are statistically significant comparing to the control, $p < 0.05$.

The formation of cytoplasm lipid drops in steroid-producing adrenal cells is one of essential processes. They represent the cluster of neutral lipids, usually triglycerides or cholesterol ethers, utilized as the source of energy in an organism or as the depot of cholesterol to synthesize steroid hormones in steroidogenic tissues [3, 9, 11–13, 28]. To visualize the cell cytoplasm lipid drops we used NR fluorescent dye.

The data demonstrated in Fig. 2 testify to a significant decrease in the number of cells, containing lipid drops after freezing with the rates of 15; 20; 40 degrees/min and with non-controlled rate cooling ($\downarrow LN_2$). In the samples cooled with the rates of 1, 5 and 10 degrees/min the post-thaw number of NR⁺ cells was at the level of non-frozen control. Thus when estimating the preservation of lipid drops in the cells after cryopreservation no statistically significant differences were revealed between the non-frozen control values and the data after freeze-thawing using cooling with controlled rates of 1; 5 and 10 degrees/min. Herewith the protocols utilizing cooling with controlled rates of 15; 20 and 40 degrees/min cooling and non-controlled rate ($\downarrow LN_2$) reduce this index almost twice.

One of the methods to assess the viability of steroid-producing cells in suspension is the examining the activity of 3β -HSD enzyme, providing the conversion of pregnenolone into progesterone and characterizes the functional activity of steroid producing cells. Therefore the presence of positively stained cells with violet

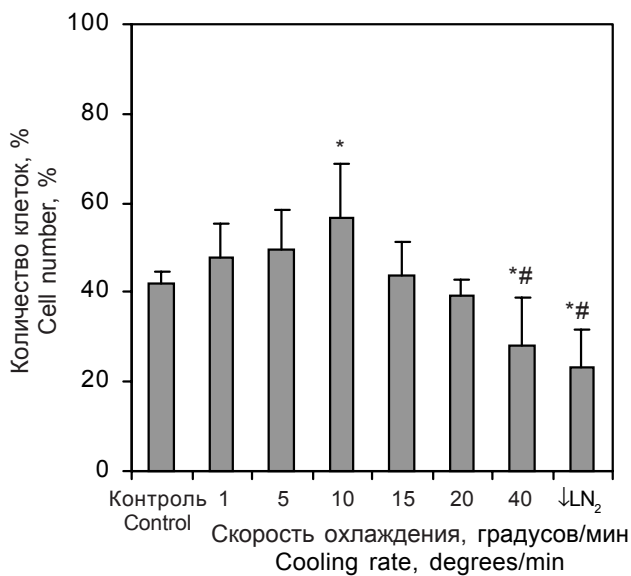


Рис. 3. Количество 3β-ГСД⁺-клеток до (контроль) и после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения; * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$; # – различия достоверны по отношению к скорости охлаждения 10 градусов/мин, $p < 0,05$.

Fig. 3. The number of 3β-HSD⁺ cells prior to (the control) and after freeze-thawing with different cooling rates; * – differences are statistically significant comparing to the control, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant comparing the cooling rate of 10 degrees/min, $p < 0.05$.

Поскольку в состав суспензии клеток надпочечников входят разные популяции клеток, мы оценили влияние скоростей охлаждения на сохранность клеток мозгового вещества надпочечников.

Как показано на рис. 4, сохранность клеток, содержащих хромогранин А, после криоконсервирования значительно снижалась относительно контрольных значений при охлаждении со скоростями 1; 5; 10; 20; 40 градусов/мин и погружении в жидкий азот. Использование скорости охлаждения 15 градусов/мин для замораживания суспензии клеток надпочечных желез крыс способствует сохранности наибольшего количества клеток, содержащих хромогранин А, среди исследованных вариантов.

Таким образом, с учетом данных о влиянии скорости охлаждения на жизнеспособность адренокортикоцитов взрослых крыс, очевидно, что замораживание с контролируемыми скоростями охлаждения более 10 градусов/мин и использование неконтролируемых скоростей охлаждения (прямое погружение в жидкий азот) значительно снижает показатели жизнеспособности клеток надпочечных желез крыс. Применение скоростей охлаждения до 10 градусов/мин уменьшает количество жизнеспособных клеток, однако позволяет сохра-

нить цвет due to presence of the reduced tetrazolium testifies to the integrity of steroid producing cells in suspension.

As Fig. 3 shows the number of 3β-HSD⁺ cells after freeze-thawing remained at the level of non-frozen control values in the case of cooling with the rates of 1; 5; 15 and 20 degrees/min. Cooling of the suspension with the rate of 40 degrees/min and plunging into liquid nitrogen resulted in the decreased number of 3β-HSD⁺ cells. When freezing the suspension with the cooling rate of 10 degrees/min the number of 3β-HSD⁺ cells was quite higher comparing to the control. Thus the use of cooling rate of 10 degrees/min for freezing the rat adrenal glands enables the obtaining of suspension with an increased content of 3β-HSD⁺ cells.

Since adrenal cell suspension comprises different cell populations, we assessed the effect of cooling rates on the integrity of adrenal medullar substance.

As Fig. 4 shows the number of cells containing chromogranin A, significantly reduced after freeze-thawing if compared with the non-frozen control values when using the cooling rates of 1; 5; 10; 20 and 40 degrees/min and plunging into liquid nitrogen. Use of cooling rate of 15 degrees/min to freeze the rat adrenal cell suspension contributes to the highest amount

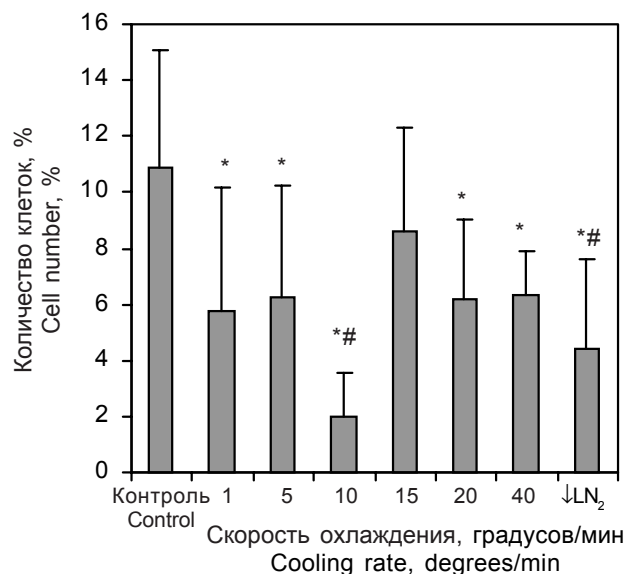


Рис. 4. Количество клеток надпочечников взрослых крыс, содержащих хромогранин А до (контроль) и после криоконсервирования с разными скоростями охлаждения; * – различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$; # – различия достоверны по отношению к скорости охлаждения 15 градусов/мин, $p < 0,05$.

Fig. 4. Amount of adult rats' adrenal cells, containing chromogranin A prior to (the control) and after cryopreservation with different cooling rates; * – differences are statistically significant comparing to the control, $p < 0.05$; # – differences are statistically significant comparing the cooling rate of 15 degrees/min, $p < 0.05$.

нить их наибольшее количество в суспензии. Было установлено, что при довольно низких значениях общей сохранности клеток использование скорости охлаждения 10 градусов/мин дает возможность сохранить наибольшее количество стероид-продуцирующих клеток в суспензии. При использовании скорости охлаждения 15 градусов/мин можно сохранить наибольшее количество хромоаффинных клеток. Причем применение скорости охлаждения 15 градусов/мин позволяет сохранить на уровне контрольных значений количество не только хромоаффинных, но и стероид-продуцирующих клеток. Это может быть использовано для последующего совместного культивирования этих клеток, так как было показано, что совместное культивирование клеток коркового и мозгового вещества надпочечников оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию стероид-продуцирующих клеток в культуре [25, 26, 30].

Выводы

1. Контролируемые скорости охлаждения до 10 градусов/мин позволяют получить более высокие показатели жизнеспособности и функциональной активности клеток надпочечных желез крыс.

2. Установлено, что скорости охлаждения оказывают селективное действие на сохранность клеток коркового и мозгового вещества надпочечников.

3. Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников крыс со скоростью охлаждения 10 градусов/мин позволяет получить суспензию, обогащенную стероидпродуцирующими клетками.

4. Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников крыс со скоростью охлаждения 15 градусов/мин позволяет получить суспензию, обогащенную хромоаффинными клетками.

Литература

1. *Криоконсервирование клеточных суспензий* / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наукова думка, 1983.– 240 с.
2. *Тронько Н.Д., Рыбаков С.И., Комисаренко И.В. и др.* Лечение хронического гипокортицизма методом трансплантации культур клеток коры надпочечных желез: Метод. рекомендации.– Киев, 1990.– 24 с.
3. *Renold A.E., Cahill G.F.* Adipose tissue. Handbook of Physiology.– Washington: American Physiological Society, 1965. – 824 p.
4. *Armour A.D., Powell H.M., Boyce S.T.* Fluorescein diacetate for determination of cell viability in tissue-engineered skin // *Tissue Eng. Part C. Methods.*– 2008.– Vol. 14, N1.– P. 89–96.
5. *Bachtel N.E., Conaghan I.J., Turek P.J.* The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation // *Human Reproduction.*– 1999.– Vol. 14, N12.– P. 3048–3051.

of cells, containing chromaffin granules, among the studied variants.

Thus taking into account the data on the effect of cooling rate on viability of adult rats' adrenocorticytes it became evident that freezing with the controlled cooling rates above 10 degrees/min and use of non-controlled cooling rates (direct plunging into liquid nitrogen) significantly reduces the viability indices of rat adrenal cells. Application of the cooling rates under 10 degrees/min decreases the number of viable cells, however allows to preserve the highest cell number in suspension. It has been established that quite low values of post-thaw total cell integrity after using the cooling rate of 10 degrees/min is accompanied with the preservation of the highest amount of steroid-producing cells in the suspension. When using the cooling rate of 15 degrees/min one may preserve the highest number of chromaffin cells. Herewith the use of the cooling rate of 15 degrees/min allows the preservation of number of both chromaffin and steroid-producing cells at the level of the non-frozen control. This may be used for the following co-culturing of these cells, since it has been shown that co-culturing of adrenal cells of cortical and medullar substances renders the stimulating effect on proliferation of steroid-producing cells in the culture [25, 26, 30].

Conclusions

1. Controlled cooling rates below 10 degrees/min enable the obtaining of higher indices of viability and functional activity of rat adrenal cells.

2. It has been established that the choice of cooling rates could cause a selective effect on the survival of the adrenal cells of cortical and medullar substances.

3. Freeze-thawing of rat adrenal cell suspension using 10 degrees/min cooling rate allowed to obtain the suspension enriched with steroid-producing cells.

4. Freeze-thawing of rat adrenal cell suspension using the cooling rate of 15 degrees/min allowed to obtain the suspension enriched with chromaffin cells.

References

1. *Cryopreservation of cell suspensions* / Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova dumka, 1983.– 240 p.
2. *Tronko N.D., Rybakov S.I., Komisarenko I.V. et al.* Treatment of chronic hypocorticism by adrenal cortex cell culture transplantation: Methodical recommendations.– Kiev, 1990.– 24 p.
3. *Renold A.E., Cahill G.F.* Adipose tissue. Handbook of Physiology.– Washington: American Physiological Society, 1965. – 824 p.
4. *Armour A.D., Powell H.M., Boyce S.T.* Fluorescein diacetate for determination of cell viability in tissue-engineered skin // *Tissue Eng. Part C. Methods.*– 2008.– Vol. 14, N1.– P. 89–96.
5. *Bachtel N.E., Conaghan I.J., Turek P.J.* The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis

6. *Benton L., Shan L.X, Hardy M.P.* Differentiation of adult Leydig cells // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*– 1995.– Vol. 53, N1–6.– P. 61–68.
7. *Diaz T.M., Pertega S.* FDA/PI flow cytometry assay of complement-mediated cytotoxicity of antibodies generated during xenotransplantation // *Cytometry.*– 2004.– Vol. 62, N1.– P. 54–60.
8. *Drucker-Colin R., Verdugo-Diaz L.* Cell transplantation for Parkinson's disease: present status // *Cell. Mol. Neurobiol.*– 2004.– Vol. 24, N3.– P. 301–316.
9. *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.
10. *Dunn J.C., Chu Y., Lam M.M. et al.* Adrenal cortical cell transplantation // *J. Pediatr. Surg.*– 2004.– Vol. 39, N12.– P. 1856–1858.
11. *Goldstein J. L., Brown M.S.* The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis // *Annu. Rev. Biochem.*– 1977.– Vol. 46.– P. 897–930.
12. *Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D.* Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets // *J. of Cell Biol.*– 1985.– Vol. 100, N3.– P. 965–973.
13. *Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D.* Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red // *J. Lipid Res.*– 1985.– Vol. 26, N7.– P. 781–789.
14. *Grodstein E., Hardy M.A., Goldstein M.J.* A case of human intramuscular adrenal gland transplantation as a cure for chronic adrenal insufficiency // *Am J. Transplant.*– 2009.– Vol. 10, N2.– P. 431–433.
15. *Hawkins K.L., Lloyd R.V., Toy K.A.* Immunohistochemical localization of chromogranin A in normal tissues from laboratory animals // *Vet. Pathol.*– 1989.– Vol. 26, N6.– P. 488–498.
16. *Hines G.A., Azziz R.* Impact of architectural disruption on adrenocortical steroidogenesis *in vitro* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 1999.– Vol. 84, N3.– P. 1017–1021.
17. *Hornsby P.J.* Transplantation of adrenocortical cells // *Rev. Endocr. Metab. Disord.*– 2001.– Vol. 2, N3.– P. 313–321.
18. *Jones K.H., Senft J.A.* An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide // *J. Histochem. Cytochem.*– 1985.– Vol. 33, N1.– P. 77–79.
19. *Kemppainen R.J., Behrend E.N.* Adrenal physiology // *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*– 1997.– Vol. 27, N2.– P.173–186.
20. *Lakey J.R., Anderson T.J., Rajotte R.V.* Novel approaches to cryopreservation of human pancreatic islets // *Transplantation.*– 2001.– Vol. 27, N72(6).– P. 1005–1011.
21. *Lee M.K., Bae Y.H.* Cell transplantation for endocrine disorders // *Adv. Drug Deliv. Rev.*– 2000.– Vol. 42, N1–2.– P. 103–120.
22. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Transplant. Proc.*– 2004.– Vol. 36, N4.– P. 1133–1134.
23. *McKay D.B., Karow A.M.Jr.* Factors to consider in the assessment of viability of cryopreserved islets of Langerhans // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N2.– P. 151–160.
24. *Scheumann G.F., Hiller W.F., Schroder S. et al.* Adrenal cortex transplantation after bilateral total adrenalectomy in the rat // *Henry Ford Hosp Med J.*– 1989.– Vol. 37, N3–4.– P. 154–156.
25. *Shepherd S.P., Holzwarth M.A.* Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal and testis before and after cryopreservation // *Human Reproduction.*– 1999.– Vol. 14, N12.– P. 3048–3051.
6. *Benton L., Shan L.X, Hardy M.P.* Differentiation of adult Leydig cells // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*– 1995.– Vol. 53, N1–6.– P. 61–68.
7. *Diaz T.M., Pertega S.* FDA/PI flow cytometry assay of complement-mediated cytotoxicity of antibodies generated during xenotransplantation // *Cytometry.*– 2004.– Vol. 62, N1.– P. 54–60.
8. *Drucker-Colin R., Verdugo-Diaz L.* Cell transplantation for Parkinson's disease: present status // *Cell. Mol. Neurobiol.*– 2004.– Vol. 24, N3.– P. 301–316.
9. *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.
10. *Dunn J.C., Chu Y., Lam M.M. et al.* Adrenal cortical cell transplantation // *J. Pediatr. Surg.*– 2004.– Vol. 39, N12.– P. 1856–1858.
11. *Goldstein J. L., Brown M.S.* The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis // *Annu. Rev. Biochem.*– 1977.– Vol. 46.– P. 897–930.
12. *Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D.* Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets // *J. of Cell Biol.*– 1985.– Vol. 100, N3.– P. 965–973.
13. *Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D.* Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red // *J. Lipid Res.*– 1985.– Vol. 26, N7.– P. 781–789.
14. *Grodstein E., Hardy M.A., Goldstein M.J.* A case of human intramuscular adrenal gland transplantation as a cure for chronic adrenal insufficiency // *Am J. Transplant.*– 2009.– Vol. 10, N2.– P. 431–433.
15. *Hawkins K.L., Lloyd R.V., Toy K.A.* Immunohistochemical localization of chromogranin A in normal tissues from laboratory animals // *Vet. Pathol.*– 1989.– Vol. 26, N6.– P. 488–498.
16. *Hines G.A., Azziz R.* Impact of architectural disruption on adrenocortical steroidogenesis *in vitro* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 1999.– Vol. 84, N3.– P. 1017–1021.
17. *Hornsby P.J.* Transplantation of adrenocortical cells // *Rev. Endocr. Metab. Disord.*– 2001.– Vol. 2, N3.– P. 313–321.
18. *Jones K.H., Senft J.A.* An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide // *J. Histochem. Cytochem.*– 1985.– Vol. 33, N1.– P. 77–79.
19. *Kemppainen R.J., Behrend E.N.* Adrenal physiology // *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*– 1997.– Vol. 27, N2.– P.173–186.
20. *Lakey J.R., Anderson T.J., Rajotte R.V.* Novel approaches to cryopreservation of human pancreatic islets // *Transplantation.*– 2001.– Vol. 27, N72(6).– P. 1005–1011.
21. *Lee M.K., Bae Y.H.* Cell transplantation for endocrine disorders // *Adv. Drug Deliv. Rev.*– 2000.– Vol. 42, N1–2.– P. 103–120.
22. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Transplant. Proc.*– 2004.– Vol. 36, N4.– P. 1133–1134.
23. *McKay D.B., Karow A.M.Jr.* Factors to consider in the assessment of viability of cryopreserved islets of Langerhans // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N2.– P. 151–160.
24. *Scheumann G.F., Hiller W.F., Schroder S. et al.* Adrenal cortex transplantation after bilateral total adrenalectomy in the rat // *Henry Ford Hosp Med J.*– 1989.– Vol. 37, N3–4.– P. 154–156.
25. *Shepherd S.P., Holzwarth M.A.* Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal

- cell co-cultures // *Am. J. Physiol Cell Physiol.*— 2001.— Vol.280, N1.— P. 61–71.
26. *Shepherd S.P., Holzwarth M.A.* Frog chromaffin and adrenocortical cell co-cultures: a model for the study of medullary control of corticosteroidogenesis // *J. Neuroendocrinol.*— 1998.— Vol. 10, N7.— P. 539–549.
27. *Silani V., Pizzuti A., Strada O., Falini A. et al.* Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // *Brain Res.*— 1988.— Vol. 28, N454(1–2).— P. 383–386.
28. *Stanley D.F., Greenspan P.* Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O // *J. Histochem. Cytochem.*— 1985.— Vol. 33, N8.— P. 833–836.
29. *Tchoukalova Y.D., Harteneck D.A., Karwoski R.A. et al.* A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing // *J. Lipid. Res.*— 2003.— Vol. 44, N9.— P. 1795–1801.
30. *Walker S.W., Lightly E.R.T., Milner S.W., Williams B.C.* Catecholamine stimulation of cortisol secretion by 3-day primary cultures of purified zona fasciculata/reticularis cells isolated from bovine adrenal cortex // *Mol. Cell Endocrinol.*— 1988.— Vol. 57, N3.— P. 139–147.
- cell co-cultures // *Am. J. Physiol Cell Physiol.*— 2001.— Vol.280, N1.— P. 61–71.
26. *Shepherd S.P., Holzwarth M.A.* Frog chromaffin and adrenocortical cell co-cultures: a model for the study of medullary control of corticosteroidogenesis // *J. Neuroendocrinol.*— 1998.— Vol. 10, N7.— P. 539–549.
27. *Silani V., Pizzuti A., Strada O., Falini A. et al.* Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // *Brain Res.*— 1988.— Vol. 28, N454(1–2).— P. 383–386.
28. *Stanley D.F., Greenspan P.* Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O // *J. Histochem. Cytochem.*— 1985.— Vol. 33, N8.— P. 833–836.
29. *Tchoukalova Y.D., Harteneck D.A., Karwoski R.A. et al.* A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing // *J. Lipid. Res.*— 2003.— Vol. 44, N9.— P. 1795–1801.
30. *Walker S.W., Lightly E.R.T., Milner S.W., Williams B.C.* Catecholamine stimulation of cortisol secretion by 3-day primary cultures of purified zona fasciculata/reticularis cells isolated from bovine adrenal cortex // *Mol. Cell Endocrinol.*— 1988.— Vol. 57, N3.— P. 139–147.

Поступила 28.09.2010
Рецензент Е.И. Смольянинова

Accepted in 28.09.2010