

## Вплив різних швидкостей охолодження на життєздатність та клітинний склад суспензії клітин надниркових залоз при кріоконсервуванні

UDC 57.043:612.451.014.462.5

G.V. DUDETSKA\*, G.A. BOZHOK, P.M. ZUBOV, T.M. GURINA, T.P. BONDARENKO

## Effect of Different Cooling Rates on Viability and Cell Populations in Adrenal Cell Suspensions During Cryopreservation

За допомогою методів флуоресцентної мікроскопії, проточної цитофлуориметрії і гістохімічного забарвлення була вивчена суспензія клітин надниркових залоз дорослих щурів до та після кріоконсервування. Показано, що швидкості охолодження чинять селективну дію на життєздатність клітин наднирників. Низькі швидкості охолодження дозволяють зберегти найбільшу кількість ядромісних клітин в суспензії після заморожування-відігріву.

**Ключові слова:** суспензія клітин надниркових залоз, ядромісні клітини, кріоконсервування, швидкість охолодження, життєздатність.

С помощью методов флуоресцентной микроскопии, проточной цитофлуориметрии и гистохимического окрашивания была изучена суспензия клеток надпочечников взрослых крыс до и после криоконсервирования. Показано, что скорости охлаждения оказывают селективное действие на жизнеспособность клеток надпочечников. Низкие скорости охлаждения позволяют сохранить наибольшее количество ядродержащих клеток в суспензии после замораживания-отогрева.

**Ключевые слова:** суспензия клеток надпочечников, ядродержащие клетки, криоконсервирование, скорость охлаждения, жизнеспособность.

Adrenal cell suspension of adult rats was assessed prior to and after cryopreservation using fluorescence microscopy, flow cytometry and histochemical staining. It was found that cooling rates render a selective effect on viability of the adrenal cells. The low cooling rates allow to preserve the highest number of nucleated cells in the post-thaw suspension.

**Key words:** adrenal cell suspension, nucleated cells, cryopreservation, cooling rate, viability.

Трансплантація кріоконсервованих тканин і клітин ендокринних залоз – це метод відновлення гормонального потенціалу, втраченого внаслідок хвороби [4–6]. Кріоконсервування дозволяє не тільки зберегти життєздатність та функціональну активність клітин надниркових залоз (КНЗ) [3], але й модифікує популяційний склад клітинної суспензії внаслідок неоднакової чутливості клітин до охолодження. Швидкості охолодження також проявляють селективну дію на збереженість клітин кіркової і мозкової речовин наднирників [4]. Це дозволяє видалити небажані клітини або збагатити отриманий препарат потрібною популяцією клітин, однак може призвести й до втрати гормональної активності суспензії за рахунок вибіркового видалення з неї ендокриноцитів під час заморожування-відігрівання. У зв'язку з цим питання про вплив кріоконсервування на субпопуляційний склад суспензії клітин, отриманих з надниркових залоз, потребує вивчення.

Transplantation of cryopreserved endocrine gland tissues and cells is the method for recovery of hormonal potential lost due to disease [4–6]. Cryopreservation enables to preserve viability and functional activity of adrenal gland cells (AGCs) [3] as well as to modify populational composition in cell suspension due to different sensitivity of various cell types to cooling. Cooling rates also render a selective effect on survival of adrenal cortex and medulla cells [4]. This allows to remove unwanted cells or to enrich the resulted preparation with needed cell population, however, it may result in the loss of suspension's hormonal activity due to selective removal of endocrinocytes during freeze-thawing. Herewith the issues of cryopreservation effect on subpopulational composition of cell suspensions obtained from adrenal glands requires the thorough investigation.

The research aim was to study the effect of different cooling rates on viability and changes in cell populations in AGC suspension during cryopreservation.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України, м. Харків

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

\* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, електронна пошта:  
dudetska@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: dudetska@mail.ru

Мета дослідження – вивчити вплив різних швидкостей охолодження на життєздатність і зміну клітинного складу суспензії КНЗ при криоконсервуванні.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була суспензія КНЗ дорослих щурів. Подрібнені на фрагменти надниркові залози поміщали в середовище 199, яке містило колагеназу типу V 1 мг/мл («Sigma», США) і ДНКазу I 0,1 мг/мл («Sigma») та інкубували на водяній бані при температурі 37°C в 3 етапи: 30; 10 та 10 хв. Після кожного етапу інкубації супернатант збирали та додавали до нього 0,5 мл сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ, «Біолот», Росія). Деструкцію тканини проводили шляхом піпетування, після чого об'єднували разом з супернатантом і відмивали середовищем 199, яке містило 0,2% бичачого сироваткового альбуміну (БСА, «Sigma»). Суспензію клітин фільтрували крізь нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм і відмивали.

В якості криопротектора використовували диметилсульфоксид (ДМСО). Розчин криопротектора готували на середовищі 199 у концентрації 10, 14 і 20% з вмістом 10% сироватки ВРХ. Для подальшого заморожування криопротектор додавали поетапно. До 500 мкл суспензії КНЗ з інтервалом 1 хв при температурі 4°C в 5 етапів додавали по 100 мкл розчину ДМСО. Кінцева концентрація ДМСО в зразках складала 5; 7; 10%. Зразки заморожували в криоампулах об'ємом 1,8 мл («Nunc», США) в програмному заморожувачі («Cryoson», Німеччина). При заморожуванні зразки охолоджували з постійними швидкостями 1; 5; 10; 15; 20 град/хв до температури -40°C, а потім занурювали у рідкий азот (-196°C). Криоконсервування зі швидкістю охолодження 40 град/хв здійснювали над дзеркалом рідкого азоту при постійній температурі докільця -145...-150°C. Зразки заморожували також прямим зануренням у рідкий азот ( $\downarrow$ LN<sub>2</sub>). Всі зразки відігрівали на водяній бані (37°C) до зникнення твердої фази (візуальне оцінювання). Криопротектор після заморожування-відігріву видаляли поетапно. До суспензії КНЗ з інтервалом 1 хв при температурі 4°C додавали 500; 500; 1000; 2000 мкл середовища 199, яке містило 10% сироватки ВРХ і 2,5% БСА. Суспензію центрифугували протягом 3 хв при 225g.

Для контролю загальної кількості клітин в суспензії їх підраховували в гемоцитометрі [1]. Збереженість клітин після криоконсервування визначали як загальну їх кількість після відігріву по відношенню до загальної кількості клітин до заморожування, виражену в відсотках, життєздатність клітин – як

### Materials and methods

The research object was AGC suspension of adult rats. Fragments of adrenal glands were placed into medium 199 containing V-type collagenase of 1mg/ml (Sigma, USA) and DNAase I of 1 mg/ml (Sigma) and incubated in water bath at 37°C by 3 steps: 30, 10 and 10 min. After each incubation step the supernatant was collected and supplemented with 0.5 ml bovine blood serum (Biolog, Russia). Tissue was destructed by pipetting and after that mixed with supernatant and washed with medium 199 containing 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma). Cell suspension was sieved through nylon filter with 100  $\mu$ m pore diameter and washed.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a cryoprotectant. Cryoprotectant solution of 10, 14 or 20% concentration was prepared on the base of medium 199 supplemented with 10% bovine blood serum. For further freezing cryoprotectant was added stepwise. 500  $\mu$ l of AGC suspension was supplemented with 100  $\mu$ l of DMSO solution with 1 min interval at 4°C by 5 steps. Final DMSO concentration in the samples made 5; 7; 10%. The samples were frozen in 1.8 ml volume cryoampoules (Nunc, USA) in a programmable freezer (Cryoson, Germany). Freezing of samples was performed with constant cooling rates 1; 5; 10; 15; 20 deg/min down to -40°C, and following plunging into liquid nitrogen (-196°C). Cryopreservation with cooling rate of 40 deg/min was performed above a mirror of liquid nitrogen at constant environmental temperature of -145...-150°C. The samples were also frozen by direct plunging into liquid nitrogen ( $\downarrow$ LN<sub>2</sub>). All the samples were thawed in water bath (37°C) until solid phase disappeared (visual assessment). After freeze-thawing the cryoprotectant was removed stepwise. Every minute AGC suspension was supplemented with 500; 500; 1000; and 2000  $\mu$ l of medium 199 containing 10% bovine blood serum and 2.5% BSA. Procedure was performed at 4°C. Suspension was centrifuged during 3 min at 225g.

To control the total number of cells in suspension they were calculated in hemocytometer [1]. Cell survival after cryopreservation was determined as their total number after thawing in relation to the total number of cells prior to freezing and expressed in percents, viability of cells was expressed as the number of viable cells in relation to total cell number and expressed in percents. Percent of viable cells was determined by supravital staining with 0.2% aqueous solution of trypan blue and fluorescent dyes, fluorescent diacetate (FDA, Sigma) and propidium iodide (PI, Sigma) [7]. Fluorescence was recorded with luminescent microscope Olympus IX-71 with excitation at 488 nm. If the cell was stained with FDA and a green fluorescence was

кількість життєздатних клітин по відношенню до загальної їх кількості, виражену у відсотках. Відсоток життєздатних клітин визначали за допомогою суправітального забарвлення з використанням 0,2%-го водного розчину трипанового синього, а також флуоресцентних барвників – флуоресцеїну діацетату (ФДА, «Sigma») і пропідіум йодиду (ПІ, «Sigma») [7]. Реєстрацію флуоресценції проводили на люмінесцентному мікроскопі «Olympus IX-71» при збудженні світловим пучком з довжиною хвилі 488 нм. При забарвленні клітин ФДА спостерігалась зелена флуоресценція, яка свідчила про їх життєздатність, а при забарвленні клітин ПІ – червона флуоресценція, що було ознакою їх нежиттєздатності. Підрахунок флуоресціюючих об'єктів при збудженні з довжиною хвилі 488 нм, а також одночасно загальної кількості клітин в прохідному світлі дозволяв виявити наявність без'ядерних клітин.

Для візуалізації в клітинах ліпідних включень проводили забарвлення нільським червоним (НЧ, «Acros Organics»). В 1 мл ДМСО розчиняли 1 мг барвника. Перед забарвленням розчин барвника розводили 1:100 фізіологічним розчином на фосфатному буфері (рН 7,4) і додавали 15 мкл цього розчину до 1 мл клітинної суспензії ( $10^6$  кл/мл). Забарвлювали 10 хв при 37°C, після чого одноразово відмивали від надлишку барвника фізіологічним розчином на фосфатному буфері. Реєстрацію флуоресценції проводили при збудженні світловим пучком з довжиною хвилі 455–500 нм. Збереження НЧ<sup>+</sup>-клітин до та після кріоконсервування визначали за вмістом у цитоплазмі клітин забарвлених включень і виражали у відсотках по відношенню до загальної кількості клітин у зразку після відігріву.

Для виявлення в клітинах активності 3 $\beta$ -гідроксистероїддегідрогенази (3 $\beta$ ГСД) суспензію клітин ( $10^6$  кл/мл) інкубували в 2,5 мл фізіологічного розчину на фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,2 мг/мл нітросинього тетразолію («Chemapol», Чехія), 1 мг/мл НАД («Fluka», Німеччина) і 0,12 мг/мл дегідроепіандростерону («Sigma») протягом 90 хв при 37°C. Позитивно забарвлені клітини (3 $\beta$ ГСД<sup>+</sup>-клітини) мали фіолетове забарвлення відновленого тетразолію, їх підрахунок здійснювали в полі зору мікроскопа і виражали у відсотковому співвідношенні до загальної кількості клітин у зразку після відігріву.

Для виявлення кількості еритроцитів у суспензії КНЗ було проведено мічення моноклональними антитілами, а саме фенотиповим маркером еритроцитів «TER119 PE-conjugated» («BD Biosciences», США). Клітини відмивали фізіологічним розчином на фосфатному буфері та інкубували з антитілами 20 хв при 4°C. Зразки повторно відмивали і аналі-

завали, клітина була розглянута як життєздатна, а забарвлена з червоною флуоресценцією була нежиттєздатною. Розрахунок флуорескуючих об'єктів при збудженні світловим пучком з довжиною хвилі 488 нм і одночасно загальної кількості клітин в прохідному світлі дозволяв виявити наявність без'ядерних клітин.

Для виявлення ліпідних включень у клітинах проводили забарвлення Нілею червоною (NR, Acros Organics). Діє речовину розчиняли в 1 мл ДМСО. Перед забарвленням розчин діє речовини розводили 1:100 фізіологічним розчином на фосфатному буфері (рН 7,4) і додавали 15 мкл цього розчину до 1 мл клітинної суспензії ( $10^6$  кл/мл). Забарвлювали 10 хв при 37°C, після чого одноразово відмивали від надлишку діє речовини фізіологічним розчином на фосфатному буфері. Флуоресценцію реєстрували при збудженні світловим пучком з довжиною хвилі 455–500 нм. Вивчення клітин до та після кріоконсервування проводили за вмістом ліпідних включень у цитоплазмі клітин забарвлених включень і виражали у відсотках по відношенню до загальної кількості клітин у зразку після відігріву.

Для виявлення активності 3 $\beta$ -гідроксистероїддегідрогенази (3 $\beta$ HSD) у клітинах клітинну суспензію ( $10^6$  кл/мл) інкубували в 2,5 мл PBS (рН 7,4) з 0,2 мг/мл нітроблугого тетразолію (Chemapol, Poland), 1 мг/мл НАД (Fluka, Germany) і 0,12 мг/мл дегідроепіандростерону (Sigma) протягом 90 хв при 37°C. Позитивно забарвлені клітини (3 $\beta$ HSD<sup>+</sup> клітини) мали фіолетове забарвлення тетразолію, їх підрахунок здійснювали в полі зору мікроскопа і виражали у відсотковому співвідношенні до загальної кількості клітин у зразку після відігріву.

Для виявлення еритроцитів у суспензії КНЗ проводили мічення моноклональними антитілами, а саме фенотиповим маркером еритроцитів «TER119 PE-conjugated» (BD Biosciences, USA). Клітини відмивали фізіологічним розчином на фосфатному буфері і інкубували з антитілами 20 хв при 4°C. Зразки повторно відмивали і аналізували, клітина була розглянута як життєздатна, а забарвлена з червоною флуоресценцією була нежиттєздатною. Розрахунок флуорескуючих об'єктів при збудженні світловим пучком з довжиною хвилі 488 нм і одночасно загальної кількості клітин в прохідному світлі дозволяв виявити наявність без'ядерних клітин.

Для виявлення активності 3 $\beta$ -гідроксистероїддегідрогенази (3 $\beta$ HSD) у клітинах клітинну суспензію ( $10^6$  кл/мл) інкубували в 2,5 мл PBS (рН 7,4) з 0,2 мг/мл нітроблугого тетразолію (Chemapol, Poland), 1 мг/мл НАД (Fluka, Germany) і 0,12 мг/мл дегідроепіандростерону (Sigma) протягом 90 хв при 37°C. Позитивно забарвлені клітини (3 $\beta$ HSD<sup>+</sup> клітини) мали фіолетове забарвлення тетразолію, їх підрахунок здійснювали в полі зору мікроскопа і виражали у відсотковому співвідношенні до загальної кількості клітин у зразку після відігріву.

## Results and discussion

At the first stage to evaluate the cryopreservation efficiency we had to determine the AGC survival and viability after the use of different DMSO concentrations and cooling rates. The cells exposed to all the stages of processing except supplementation with DMSO and freeze-thawing served as the control.

The highest cell survival was observed after using cooling rates of 1; 5; 10 deg/min and 5 and 7% DMSO; 10 deg/min with 10% DMSO; 15 deg/min with 7% DMSO and 40 deg/min and  $\downarrow$ LN<sub>2</sub> with 10%DMSO (Fig. 1).

зували на проточному цитофлуориметрі BD FACS Calibur («BD Biosciences») з використанням програмного забезпечення WinMDI Version 2.8.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу і t-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

На першому етапі роботи для оцінки ефективності кріоконсервування необхідно було визначити збереженість та життєздатність КНЗ після використання різних концентрацій ДМСО і швидкостей охолодження. Контролем були клітини, які проходили всі етапи обробки, крім додавання ДМСО і процесів заморожування-відігріву.

Найбільшу збереженість клітин виявлено при швидкостях охолодження 1; 5; 10 град/хв з 5 і 7% ДМСО; 10 град/хв з 10% ДМСО; 15 град/хв з 7% ДМСО та 40 град/хв і  $\downarrow LN_2$  з 10% ДМСО (рис. 1).

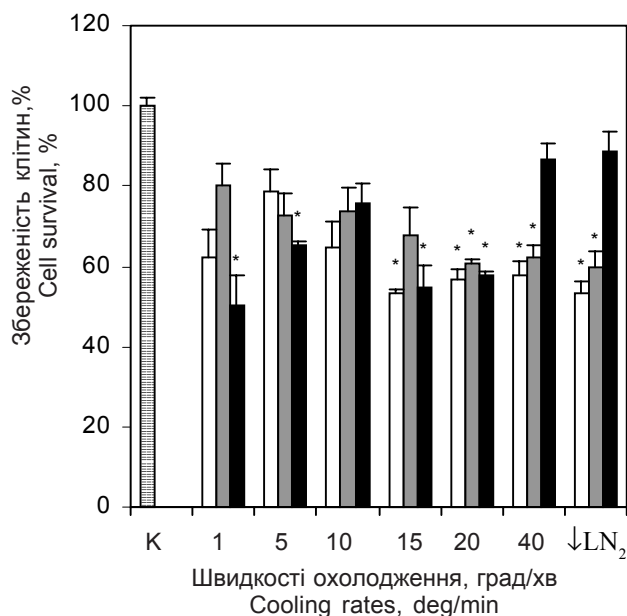
Найбільше зменшення життєздатності відносно незаморожених клітин було виявлено при швидкості охолодження 40 град/хв і охолодженні зануренням у рідкий азот при всіх використаних концентраціях ДМСО, найбільшу життєздатність клітин виявлено при швидкостях охолодження 1; 5; 10; 20 град/хв з 7% ДМСО і 10 град/хв з 10% ДМСО (рис. 2).

The maximum viability decrease if compared to the non-frozen cells was observed after using cooling rate of 40 deg/min and cooling by plunging into liquid nitrogen with all the used DMSO concentrations, the highest cell viability was at cooling rates of 1; 5; 10; 20 deg/min with 7% DMSO and 10 deg/min with 10% DMSO (Fig. 2).

Assessment with fluorescent dyes revealed that the cell viability decreased after cryopreservation by all the programs. But the maximum decrease of cell viability was found after using cooling rates higher than 10 deg/min. The highest number of viable cells was preserved after using cooling rates of 1; 5; 10 deg/min and 7% DMSO concentration (Fig. 3).

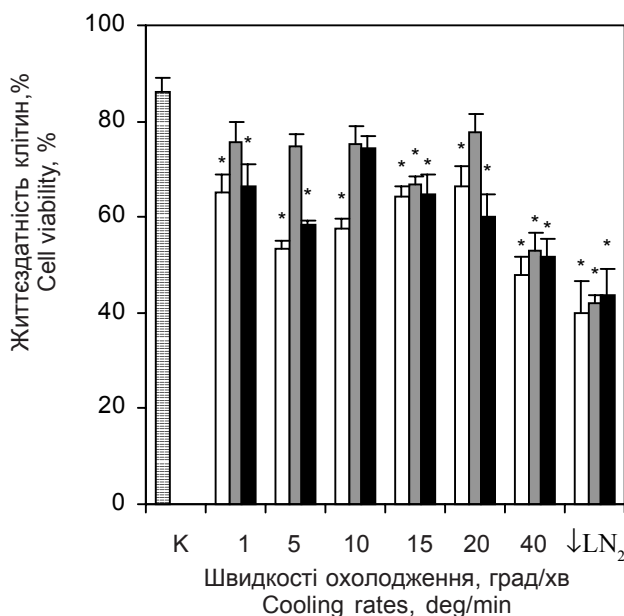
Generally the dynamics of viability change assessed by two methods coincided, *i. e.* the decrease of cell viability was observed along with increase of cooling rate. However, absolute values of viability were higher in the case of trypan blue staining ( $40.11 \pm 6.37$  to  $77.74 \pm 3.88\%$  in trypan blue test vs.  $9.85 \pm 0.91$  to  $56.45 \pm 5.65\%$  in fluorescent dye test). Higher cell viability index observed in trypan blue test was likely due to restrictions of the method, reflecting only the membrane integrity of both nucleated and non-nucleated cells [9].

The suspension obtained from adrenal glands contained several types of cells differing by their sensitivity



**Рис. 1.** Збереженість КНЗ після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження і концентраціями ДМСО: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; К – контроль; \* – відмінності вірогідні по відношенню до контролю,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** AGC survival after freeze-thawing with different cooling rates and DMSO concentrations: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; K – control; \* – the differences are significant if compared with the control,  $p < 0.05$ .



**Рис. 2.** Життєздатність КНЗ (за трипановим синім) після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження і концентраціями ДМСО: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; К – контроль; \* – відмінності вірогідні по відношенню до контролю,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** AGC viability (trypan blue test) after freeze-thawing with different cooling rates and DMSO concentrations: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; K – control; \* – the differences are significant if compared with the control,  $p < 0.05$ .

Аналіз з використанням флуоресцентних барвників виявив зниження життєздатності клітин після кріоконсервування за всіма програмами. Однак найбільше падіння життєздатності суспензії клітин було виявлено після використання швидкостей охолодження вище 10 град/хв. Найбільша кількість життєздатних клітин зберігалась при використанні швидкостей 1; 5; 10 град/хв і концентрації ДМСО 7% (рис. 3).

У цілому динаміка зміни життєздатності, яка була оцінена двома методами, співпадала, тобто спостерігалось зменшення життєздатних клітин з ростом швидкості охолодження. Однак абсолютні значення життєздатності були вищими у випадку, коли цей показник вимірювали за допомогою трипанового синього (від  $40,11 \pm 6,37$  до  $77,74 \pm 3,88\%$  за забарвленням трипановим синім та від  $9,85 \pm 0,91$  до  $56,45 \pm 5,65\%$  – флуоресцентними барвниками). Це може бути пов'язано з тим, що при забарвленні трипановим синім спостерігається підвищення показника життєздатності клітин, оскільки цей метод відображає цілісність клітинної мембрани як ядровмісних, так і без'ядерних клітин [9].

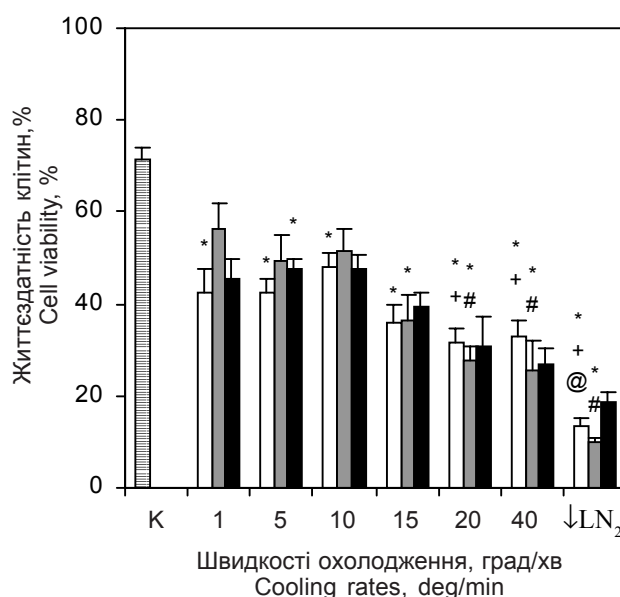
Суспензія, яка отримана з надниркових залоз, містить декілька типів клітин, які можуть відрізнятися за своєю чутливістю до факторів кріоконсервування. Це, в свою чергу, може підвищувати або знижувати результат кріоконсервування щодо «субпопуляції інтересу», наприклад гормонопродукуючих клітин.

Відомо, що надниркові залози мають високий рівень кровопостачання. Тому еритроцити складають значну кількість у суспензії, отриманої з залоз. Для оцінки вмісту без'ядерних клітин в суспензії ми застосували метод проточної цитофлуориметрії. Суспензію КНЗ було помічено антитілами TER119, який експресується на клітинах еритроїдного ряду [8].

За допомогою метода проточної цитофлуориметрії було встановлено, що клітини надниркових залоз розподілені на 2 клітинні популяції з різним розміром клітин (рис. 4, А, В): R1 (85–94%) та R2 (6–15%). Популяція клітин середнього розміру має значну кількість TER119<sup>+</sup>-клітин, що ідентифікує ці клітини як еритроцити. Встановлено, що початкова контрольна суспензія КНЗ містить біля 77% TER119<sup>+</sup>-клітин з популяції середнього розміру (рис. 4, С).

Аналіз клітинної суспензії методом проточної цитофлуориметрії показав, що субпопуляції без'ядерних та ядровмісних клітин у суспензії мають неоднакову чутливість до режимів кріоконсервування.

Встановлено, що зі збільшенням швидкості охолодження зменшується кількість ядровмісних і зростає кількість без'ядерних клітин (таблиця).



**Рис. 3.** Життєздатність КНЗ (за включенням ФДА і ПІ) після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження і концентраціями ДМСО: □ – 5%; ▤ – 7%; ■ – 10%; К – контроль; відмінності вірогідні ( $p < 0,05$ ) по відношенню до: \* – контролю; + – зразків, кріоконсервованих з 5% ДМСО зі швидкістю охолодження 10 град/хв; # – 7% ДМСО та 1; 10 град/хв; ^ – 10% ДМСО та 1; 5; 10 град/хв.; @ – 5% ДМСО та 5; 20; 40 град/хв.

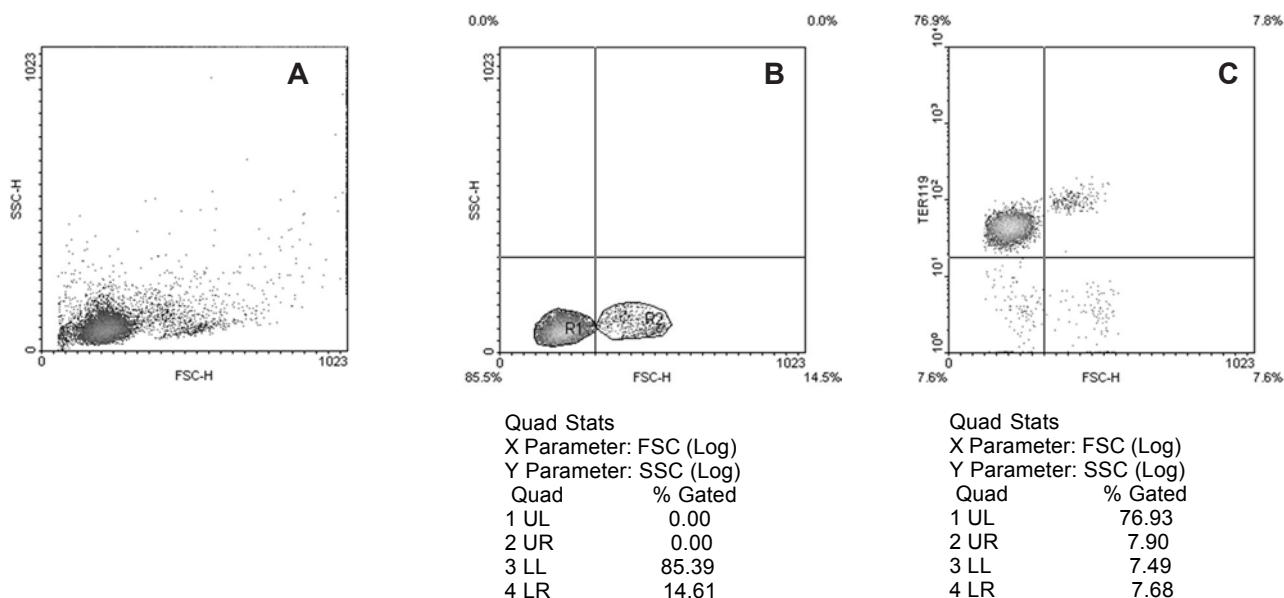
**Fig. 3.** AGC viability (FDA/PI test) after freeze-thawing with different cooling rates and DMSO concentrations: □ – 5%; ▤ – 7%; ■ – 10%; K – control; the differences are significant ( $p < 0.05$ ) if compared with: \* – the control; + – 5% DMSO with 10 deg/min cooling rate; # – 7% DMSO with 1; 10 deg/min cooling rates; ^ – 10% DMSO with 1; 5; 10 deg/min cooling rates; @ – 5% DMSO with 5; 20; 40 deg/min cooling rate.

to the cryopreservation factors. In its turn this may increase or decrease the post-thaw yield after cryopreservation as for target subpopulations, for example of hormone-producing cells.

Adrenal glands are known to have a high level of blood supply. So erythrocytes are the significant population among the suspension obtained from the glands. To estimate the content of non-nucleated cells in suspension we applied the method of flow cytofluorimetry. AGC suspension was labeled with antibodies to TER119, expressed on the erythroid cell membranes [8].

Flow cytofluorimetry analysis revealed within adrenal cell suspension two cell populations with different cell size: R1 (85–94%) and R2 (6–15%) (Fig. 4A, B). Cell population of middle size had a significant amount of TER119<sup>+</sup> cells, *i. e.* erythrocytes. It has been established that initial control AGC suspension contained about 77% of TER119<sup>+</sup> cells within the population of middle sized cells (Fig. 4C).

Flow cytofluorimetry analysis of cell suspension showed that subpopulations of nucleated and non-



**Рис. 4.** Цитофлуориметричний аналіз суспензії КНЗ: А, В – пряме та бокове світлорозсіювання клітин; С – TER119<sup>+</sup>-клітини у суспензії КНЗ.

**Fig. 4.** Cytofluorimetric analysis of AGC suspension: A, B – forward and side light scattering of cells; C – TER119<sup>+</sup>-cells in AGC suspension.

Вміст ядровмісних і без'ядерних клітин (%) в суспензії КНЗ до (контроль) і після кріоконсервування  
 Amount of nucleated and non-nucleated cells (%) in AGC suspension prior to (control) and after cryopreservation

Концентрація ДМСО, % DMSO concentration, %	Швидкість охолодження, град/хв Cooling rate, deg/min						LN <sub>2</sub>	Контроль Control
	1	5	10	15	20	40		
Ядровмісні клітини, % Nucleated cells, %								
5	87,3 ± 1,92	82,27 ± 3,21	48,25 ± 2,98*	35,76 ± 4,10*	31,43 ± 3,11*	24,89 ± 0,85*	3,61 ± 1,42*	69,64 ± 1,21
7	88,96 ± 0,10*	84,5 ± 1,06*	56,54 ± 4,3	22,08 ± 0,11*	17,4 ± 2,26*	25,85 ± 4,31*	4,91 ± 0,47*	
10	80,65 ± 8,55	50,44 ± 1,94*	41,54 ± 2,76*	15,6 ± 6,99*	28,41 ± 2,83*	25,3 ± 4,17*	8,25 ± 1,06*	
Без'ядерні клітини, % Non-nucleated cells, %								
5	7,3 ± 1,92*	9,27 ± 1,02*	35,75 ± 0,55*	45,26 ± 3,40*	56,43 ± 3,95*	62,89 ± 3,38*	63,61 ± 1,42*	21,44 ± 1,18
7	4,99 ± 0,72*	14,5 ± 1,06*	41,41 ± 1,66*	66,59 ± 8,42*	72,9 ± 4,10*	79,4 ± 3,11*	86,85 ± 3,32*	
10	11,24 ± 1,29*	30,44 ± 1,94*	52,79 ± 3,11*	69,2 ± 5,73*	75,91 ± 0,69*	71,8 ± 1,69*	74,55 ± 3,60*	

**Примітка:** \* – відмінності вірогідні по відношенню до контролю,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – the differences are significant if compared to the control,  $p < 0.05$ .

Формування цитоплазматичних ліпідних крапель у стероїдпродукуючих клітинах надниркових залоз є обов'язковим процесом. Це скупчення нейтральних ліпідів, в основному тригліцеридів або холестеринових ефірів, які застосовують як засоби запасаєння енергії в організмі або як депо холестерину

nucleated cells in suspension had different sensitivity to cryopreservation regimens.

We have established that along with the increasing of the cooling rate the number of nucleated cells decreased and number of non-nucleated ones increased (Table).

для синтезу стероїдних гормонів у стероїдогенних тканинах [10]. Для візуалізації клітин, які мають ліпідні включення, використовували флуоресцентний барвник нільський червоний.

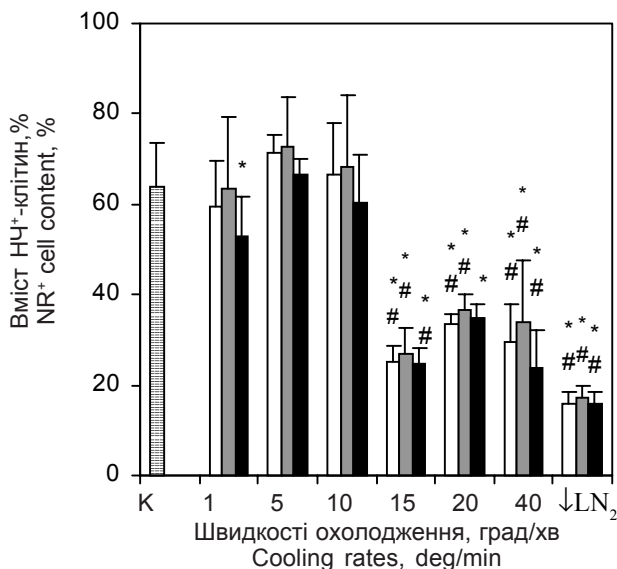
Отримані дані (рис. 5) свідчать про значне зниження кількості клітин, що містять ліпідні краплі, після заморожування зі швидкостями 15; 20; 40 град/хв і неконтрольованою швидкістю охолодження ( $\downarrow LN_2$ ). Зразки, кріоконсервовані зі швидкістю охолодження нижче 10 град/хв і концентрацією ДМСО 5; 7 і 10%, в цілому зберігають кількість клітин, забарвлених нільським червоним, на рівні контрольних значень ( $63,98 \pm 9,52\%$ ).

Одним з методів оцінки гормональної функції стероїдопродукуючих клітин в суспензії є визначення активності ферменту  $3\beta$ ГСД, який забезпечує один з ключових етапів синтезу стероїдних гормонів – конверсію прегненолону в прогестерон. Як видно з рис. 6, вміст  $3\beta$ ГСД<sup>+</sup>-клітин після кріоконсервування залишалася на рівні контрольних значень ( $42,05 \pm 2,40\%$ ) у разі охолодження зі швидкостями до 15 град/хв в присутності 5 та 7% ДМСО. При використанні 10% ДМСО цей показник був дещо нижче. Охолодження суспензії зі швидкостями 20; 40 град/хв і занурення в рідкий азот призвело до зниження

Formation of cytoplasmic lipid drops in steroid-producing cells of adrenal glands is a mandatory process. This is the accumulation of neutral lipids, usually triglycerides and cholesterol esters which are used as the energy accumulation means of an organism or depot of cholesterol for synthesis of steroid hormones in steroidogenic tissues [10]. To visualize the cells with lipid inclusions we used a fluorescent dye Nile Red.

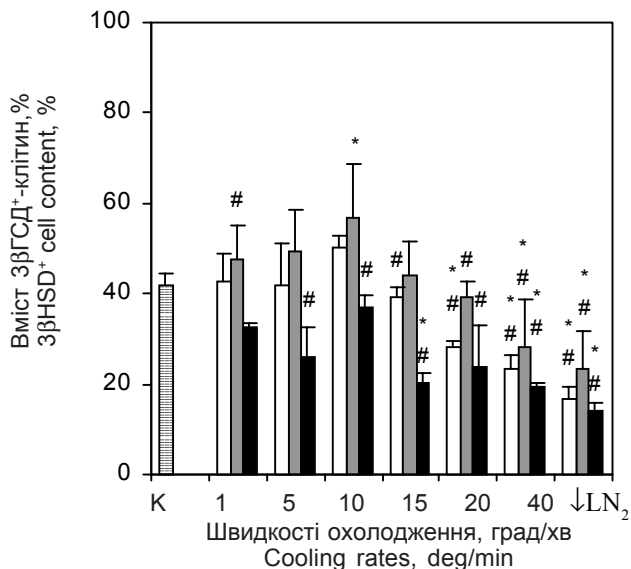
The obtained data (Fig. 5) testified to a significant decrease of cell number having lipid drops after freezing with cooling rates of 15; 20; 40 deg/min and non-controlled cooling rate ( $\downarrow LN_2$ ). Generally the samples cryopreserved with cooling rate below 10 deg/min and DMSO concentration of 5; 7; 10% preserved the number of cells stained with Nile Red at the level of control indices ( $63.98 \pm 9.52\%$ ).

One of the methods for evaluation of steroid-producing cells' hormonal function in suspension is revealing the activity of enzyme  $3\beta$ HSD providing one of the key stages of steroid hormones synthesis, transformation of pregnenolone into progesterone. Fig. 6 shows that the content of  $3\beta$ HSD<sup>+</sup> cells after cryopreservation remained at the level of control indices ( $42.05 \pm 2.40\%$ ) in the case of cooling rate up to 15 deg/min and 5 and 7% DMSO. In the case of using 10% DMSO this in-



**Рис. 5.** Кількість НЧ<sup>+</sup>-клітин до (контроль) і після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження і концентраціями ДМСО: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; К – контроль; відмінності вірогідні ( $p < 0,05$ ) по відношенню до: \* – контролю; # – до зразків, кріоконсервованих з 5; 7; 10% ДМСО зі швидкостями охолодження 1; 5; 10 град/хв відповідно.

**Fig. 5.** Number of NR<sup>+</sup>-cells prior to (control) and after freeze-thawing with different cooling rates and DMSO concentrations: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; K – control; the differences are significant ( $p < 0.05$ ) if compared with: \* – the control; # – data of freeze-thawing with 5; 7; 10% DMSO and with 1; 5; 10 deg/min cooling rates, correspondingly.



**Рис. 6.** Кількість  $3\beta$ -ГСД<sup>+</sup>-клітин до (контроль) і після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження і концентраціями ДМСО: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; К – контроль; відмінності вірогідні ( $p < 0,05$ ) по відношенню до: \* – контролю; # – до зразків, кріоконсервованих з 7% ДМСО зі швидкістю охолодження 10 град/хв.

**Fig. 6.** Number of  $3\beta$ -HSD<sup>+</sup>-cells prior to (control) and after freeze-thawing with different cooling rates and DMSO concentrations: □ – 5%; ■ – 7%; ■ – 10%; K – control; the differences are significant ( $p < 0.05$ ) if compared with: \* – the control; # – data of freeze-thawing with 7% DMSO and with 10 deg/min cooling rate.

кількості  $3\beta$ ГСД<sup>+</sup>-клітин. Слід підкреслити, що після заморожування-відігріву суспензії зі швидкістю охолодження 10 град/хв та в присутності 7% ДМСО збереженість  $3\beta$ ГСД<sup>+</sup>-клітин в порівнянні з контролем була достовірно вищою. Таким чином, використання швидкості охолодження 10 град/хв і 7% ДМСО для заморожування надниркових залоз щурів сприяє збереженню найбільшої кількості клітин, які мають активність  $3\beta$ ГСД.

Враховуючи дані про вплив швидкості охолодження на життєздатність та клітинний склад суспензії КНЗ щурів, можна зробити висновок, що заморожування зі швидкістю охолодження більше за 10 град/хв і використання прямого занурення у рідкий азот значно знижують показники життєздатності КНЗ щурів. Швидкості охолодження до 10 град/хв знижують показник життєздатних клітин після відтавання, однак дозволяють зберегти їх найбільшу кількість в суспензії. Цитофлуориметричний аналіз показав, що суспензія КНЗ, отримана з надниркових залоз щурів, містить значну частину еритроїдних клітин. Вміст цієї популяції змінюється залежно від використаної швидкості охолодження.

### Висновки

1. Кріоконсервування суспензії клітин надниркових залоз щурів має проводитися з використанням низьких (до 10 град/хв) швидкостей охолодження, які дозволяють отримати після відігріву найбільшу кількість життєздатних і функціонально активних клітин.

2. Встановлено, що зі збільшенням швидкості охолодження зменшується вміст ядровмісних і зростає – без'ядерних клітин.

3. Для отримання суспензії клітин надниркових залоз щурів, збагаченої стероїдпродукуючими клітинами, потрібно використовувати режим заморожування зі швидкістю охолодження 10 град/хв і концентрацією ДМСО 7%.

### Литература

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков – М.: Мир, 1983. – 263 с.
2. 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. 379–387.
3. Дудецкая Г.В., Гурина Т.М., Бондаренко Т.П. Изучение возможности кріоконсервирования клеток надпочечников взрослых крыс // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. – 2010. – Вып. 12, №920. – С. 111–117.
4. Dunn J.C., Chu Y., Lam M.M. et al. Adrenal cortical cell transplantation // J. Pediatr. Surg. – 2004. – Vol. 39, №12. – P. 1856–1858.
5. 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, №2. – P. 317–324.

dex was slightly lower. The cooling of suspension with the cooling rates of 20; 40 deg/min and plunging into liquid nitrogen resulted in the decrease of  $3\beta$ HSD<sup>+</sup> cells number. It should be emphasized that after freezing of suspension with 10 deg/min cooling rate and presence of 7% DMSO the  $3\beta$ HSD<sup>+</sup> cells content was significantly higher if compared to the control. So, using 10 deg/min cooling rate and 7% DMSO for freezing of rat adrenal glands contributed to the survival of highest number of cells with  $3\beta$ HSD activity.

Considering the data about effect of cooling rate on viability and cell population distribution in rat AGC suspension we may conclude that the freezing with cooling rates higher than 10 deg/min and the use of direct plunging into liquid nitrogen significantly decreases the indices of rat AGC viability. Cooling rates lower than 10 deg/min decrease the cell viability but enable to preserve the higher cell quantity in suspension. Cytofluorimetric analysis showed that AGC suspension obtained from rat adrenal glands contain a significant erythroid cell population. The post-thaw content of this population changes depending on the cooling rates used.

### Conclusions

1. Cryopreservation of rat adrenal cell suspension should be performed with low cooling rates (not higher than 10 deg/min) allowing obtaining the highest post thaw quantity of viable and functionally active cells.

2. We have established that increasing of cooling rate led to decrease in content of nucleated cells and to increased non-nucleated cell content.

3. Obtaining of rat adrenal cell suspension enriched with steroid-producing cells was provided by application of freezing regimen with 10 deg/min cooling rate and 7% DMSO concentration.

### References

1. Adams R. Methods of cell cultures for biochemists. – Moscow: Mir, 1983. – 263 p.
2. 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. 379–387.
3. Dudetskaya G.V., Gurina T.M., Bondarenko T.P. The study of the possibility of rat adrenal gland cells cryopreservation // Visnyk KhNU im. V.N. Karazina. Series: Biology. – 2010. – Issue 12, N920. – P. 111–117.
4. Dunn J.C., Chu Y., Lam M.M. et al. Adrenal cortical cell transplantation // J. Pediatr. Surg. – 2004. – Vol. 39, N12. – P. 1856–1858.
5. 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.
6. Hornsby P.J. Transplantation of adrenocortical cells // Rev. Endocr. Metab. Disord. – 2001. – Vol. 2, N3. – P. 313–321.
7. 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.



6. *Hornsby P.J.* Transplantation of adrenocortical cells // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2001. – Vol. 2, №3. – P. 313–321.
7. *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, №1. – P. 77–79.
8. *Kina T., Ikuta K., Takayama E. et al.* The monoclonal antibody TER119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage // *Br. J. Hematol.* – 2000. – Vol. 109, №2. – P. 280–287.
9. *Sharpe R.L., Milligan C.L.* Lactate efflux from sarcolemmal vesicles isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* white muscle is via simple diffusion // *J. Exp. Biol.* – 2003. – Vol. 206, Pt. 3. – P. 543–549.
10. *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, №8. – P. 833–836.
8. *Kina T., Ikuta K., Takayama E. et al.* The monoclonal antibody TER119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage // *Br. J. Hematol.* – 2000. – Vol. 109, №2. – P. 280–287.
9. *Sharpe R.L., Milligan C.L.* Lactate efflux from sarcolemmal vesicles isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* white muscle is via simple diffusion // *J. Exp. Biol.* – 2003. – Vol. 206, Pt. 3. – P. 543–549.
10. *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, №8. – P. 833–836.

*Accepted 10.01.2012*

*Надійшла 10.01.2012*