

## Влияние факторов криоконсервирования на сохранность клеток надпочечников крыс

Г.В. ДУДЕЦКАЯ, Г.А. БОЖОК, Т.М. ГУРИНА, Т.П. БОНДАРЕНКО  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### Effect of Cryopreservation Factors on Integrity of Rat Adrenal Cells

G.V. DUDETSKAYA, G.A. BOZHOK, T.M. GURINA, T.P. BONDARENKO  
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В связи с развитием и внедрением в клиническую практику трансплантационных методов лечения возрос интерес к созданию криобанков клеток и тканей. Одним из важных условий получения максимального уровня сохранности деконсервированных клеток является оптимальный режим их замораживания. Поэтому возникает необходимость проведения исследований, направленных на оценку влияния скоростей охлаждения на клетки как повреждающего фактора при криоконсервировании.

Цель работы – исследовать влияние различных режимов замораживания на сохранность деконсервированных клеток надпочечников крыс в суспензии.

Суспензию клеток получали ферментативным методом. В качестве криопротектора использовали 7%-й раствор диметилсульфоксида. Для замораживания образцов применяли постоянные скорости охлаждения: 1, 5, 10, 15, 20 и 40°C/мин (до –40°C), затем образцы погружали в жидкий азот. Также замораживание образцов проводили с неконтролируемой скоростью охлаждения путем прямого погружения в жидкий азот. Отогрев осуществляли на водяной бане (37°C) до исчезновения твердой фазы. Криопротектор после замораживания-отогрева удаляли поэтапно с последующим центрифугированием. Процент жизнеспособных клеток определяли с помощью флуоресцентных красителей – флуоресцеин диацетат и пропидиум йодид. Для выявления в клетках липидных включений проводили окрашивание нильским красным. Для определения в клетках активности 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-ГСД) проводили гистохимическое окрашивание. Наличие в клетках хроматинных гранул определяли иммуногистохимическим методом для выявления хромогранина А (антитела кроличьи поликлональные к хромогранину А, Abcam, США; антитела овечьи поликлональные к кроличьему IgG, конъюгированные с Texas Red, Abcam, США).

Охлаждение образцов со скоростью 10°C/мин дает возможность получить наибольшее количество (50,9%) клеток, обладающих активностью 3β-ГСД, которая является одним из маркеров стероидпродуцирующих клеток. Использование скорости охлаждения 15°C/мин способствует сохранности наибольшего количества клеток мозгового вещества надпочечников, содержащих хромоаффинные гранулы и являющихся клетками.

Учитывая полученные данные, можно сделать заключение о селективном действии скоростей охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс.

Due to the development and introduction into clinical practice of transplantation treatment methods the interest to establishing the cryobanks of cells and tissues has increased. One of important conditions of obtaining the maximum integrity rate of frozen-thawed cells is optimal protocol of their freezing. In this connection there has appeared the need in the studies directed to the assessment of the cooling rates effect as damaging factor for cells during cryopreservation.

The research aim is to investigate the effect of different freezing protocols on integrity of frozen-thawed rat's adrenal cells in suspension.

Cell suspension was derived by enzymatic method. As cryoprotectant 7% dimethyl sulfoxide solution was used. During freezing of the samples there were applied constant cooling rates: 1, 5, 10, 15, 20, 40°C/min (down to –40°C) and following plunging into liquid nitrogen. Additionally the samples were frozen with uncontrolled cooling rate by a direct plunging into liquid nitrogen. Warming was performed on water bath (37°C) till the disappearance of solid phase. After freeze-thawing the cryoprotectant was removed stepwise with following centrifugation. The percentage of viable cells was found by means of staining with fluorescent dyes, Fluorescein Diacetate and Propidium Iodide. To reveal lipid inclusions the cells were stained with Nile Red dye. To examine the activity of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) in the cells the histochemical staining was performed. The presence of chromaffin granules in the cells was examined by immunohistochemical method for revealing chromogranin A (rabbit polyclonal antibodies to chromogranin A, Abcam, USA; sheep polyclonal antibodies to rabbit IgG, conjugated with Texas Red, Abcam, USA).

Cooling of the samples with the rate of 10°C/min makes possible to obtain the highest amount (50.9%) of cells with 3β-HSD activity, that is one of the markers steroid-producing cells. Application of cooling rate of 15°C/min contributes to the survival of the highest amount of adrenal medulla cells containing chromaffin granules.

Taking into account our findings we could hypothesize the selective effect of cooling rates on integrity of zone-differentiated populations of rat adrenal cells.