

## Влияние криоконсервирования на формирование j-агрегатов в клетках коры надпочечников крыс

Т.А. Юрчук<sup>1</sup>, Г.А. Божок<sup>2</sup>, И.А. Боровой<sup>3</sup>, Т.М. Гурина<sup>2</sup>, Т.П. Бондаренко<sup>2</sup>

<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

## Cryopreservation Effect on Formation of J-Aggregates in Rat Adrenal Cortex Cell

T.A. YURCHUK<sup>1</sup>, G.A. BOZHOK<sup>2</sup>, I.A. BOROVY<sup>3</sup>, T.M. GURINA<sup>2</sup>, T.P. BONDARENKO<sup>2</sup>

<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

Одним из способов коррекции гипокортицизма является трансплантация клеток коры надпочечников (ККН), а криоконсервирование решает вопрос хранения биологического материала. Однако остается проблема сохранения гормон-продуцирующей активности ККН. Для обеспечения этой функции необходимо наличие электрохимического градиента (ЭХГ) на митохондриях ККН. ЭХГ можно оценить, используя катионный флуоресцентный краситель JC-1.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования в криозащитных средах с различным содержанием ДМСО и эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) на ЭХГ митохондрий ККН крыс с помощью флуоресцентного красителя JC-1.

Клетки коры надпочечников получали ферментативным способом из коры надпочечников половозрелых крыс. Для получения криозащитных сред использовали концентрации ДМСО 5; 7; 10 и 15%. Часть сред, кроме ДМСО, содержала добавку в виде 25% ЭТС. Токсичность различных концентраций криопротектора определяли путем оценки жизнеспособности и сохранности ККН после 30 мин инкубации в криозащитных средах. Показатели жизнеспособности во всех пробах колебались в среднем от 70 до 80%, а сохранность оставалась на уровне контроля в пробах с концентрацией 7 и 10% ДМСО с ЭТС и в 10% ДМСО без ЭТС ( $p < 0,05$ ). Эти показатели оценивали также после отогрева и установили, что жизнеспособность ККН после криоконсервирования с 7 и 10% ДМСО с ЭТС составила 70%, тогда как с этими же концентрациями ДМСО, но без ЭТС в криозащитных средах – 50% ( $p < 0,05$ ). Самая высокая сохранность наблюдалась в суспензии, криоконсервированной с 7% ДМСО и ЭТС (80%).

После размораживания клетки садили на планшет с коллагеновой подложкой и культивировали в течение суток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После этого клетки окрашивали JC-1, отмывали, подсчитывали количество клеток, содержащих j-агрегаты. Клетки, криоконсервированные в криозащитной среде с 7% ДМСО, содержали наибольшее количество j-агрегатов – 40%, а с концентрациями ДМСО 5; 10 и 15% их количество колебалось в пределах 10–20% по сравнению с 5% в нативной суспензии. Количество j-агрегатов в клетках, криоконсервированных в средах с комбинацией ДМСО/ЭТС, не отличалось от нативной суспензии.

Таким образом, в ККН, криоконсервированных в криозащитной среде только с ДМСО, после отогрева формируется больше j-агрегатов по сравнению с клетками, криоконсервированными в средах с комбинацией ДМСО/ЭТС.

The transplantation of adrenal cortex cells (ACC) is one of efficient approaches in hypocorticism treatment, and cryopreservation solves the problem of storage of biological materials. However, there have been remained the problems of preserving hormone-producing activity in ACC. Providing of this function requires the electrochemical gradient (ECG) on ACC mitochondria. ECG can be estimated by using the cationic fluorescent dye JC-1.

The research aim was to study the effect of cryopreservation with the cryoprotective media with various DMSO concentrations and fetal calf serum (FCS) on rat ACC mitochondria ECG by fluorescent dye JC-1.

Adrenal cortex cells were obtained by enzymatic method from the adrenal cortex of adult rats. We used several concentrations of DMSO (5, 7, 10 and 15%) to obtain the cryoprotective media. The part of the media were supplemented with 25% FCS. The toxicity of different concentrations of cryoprotectants was determined by assessing the viability and survival of ACC 30 min later the incubation in cryoprotective media. The viability in all the samples ranged from 70 to 80%, and the survival remained at the control level in the samples with 7 and 10% DMSO solutions supplemented with FCS and in 10% DMSO solutions without FCS ( $p < 0.05$ ). These indices were also evaluated after thawing and there was found that the viability of ACC after cryopreservation in 7 and 10% DMSO solutions supplemented with FCS was 70%, whereas with the same concentrations of DMSO, but without FCS in the cryoprotective media it made 50% ( $p < 0.05$ ). The highest survival was observed in the cell suspension cryopreserved with 7% DMSO and FCS and made 80%.

Cells were placed in the plate with the collagen substrate after thawing and cultured overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards they were stained with JC-1, washed, the amount of cells containing j-aggregates was counted. The cells, frozen-thawed in cryoprotective medium with 7% DMSO, contained the highest number of j-aggregates (40%), with concentrations of DMSO 5; 10 and 15% their number varied between 10–20% if compared to 5% in native suspension. The number of j-aggregates did not differ from the native suspension in the cells frozen-thawed with DMSO/FCS combination.

Thus, ACC frozen-thawed in cryoprotective medium with solely DMSO contained more j-aggregates after thawing if compared with the cells frozen-thawed in the media with a combination of DMSO/FCS.