

## ... КРИОБИОЛОГИЯ ... CRYOBIOLOGY ...

УДК: 615.014.41:611.451.018.1.086.82

### Изучение возможности криоконсервирования клеток надпочечных желез крыс

Г.В.Дудецкая, Т.М.Гурина, Т.П.Бондаренко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)  
dudetska@mail.ru*

С помощью методов флуоресцентной микроскопии и гистохимического окрашивания были исследованы клетки надпочечников взрослых крыс до и после криоконсервирования. Медленные скорости охлаждения позволяют сохранить наибольшее количество клеток в суспензии после замораживания–отогрева. Для получения суспензии адренортикоцитов, обогащенной стероидпродуцирующими клетками, предпочтительно использовать режим замораживания с медленной скоростью охлаждения (1°C/мин) и проведением температурной инициации кристаллообразования.

**Ключевые слова:** *флуоресцентные красители, 3β-гидроксистероиддегидрогеназа, криоконсервирование, скорость охлаждения, адренортикоциты.*

### Вивчення можливості криоконсервування клітин надниркових залоз щурів

Г.В.Дудецька, Т.М.Гуріна, Т.П.Бондаренко

За допомогою методів флуоресцентної мікроскопії і гістохімічного забарвлення було вивчено клітини наднирників дорослих щурів до та після криоконсервування. Повільні швидкості охолодження дозволяють зберегти найбільшу кількість клітин в суспензії після заморожування–відігріву. Для отримання суспензії адренортикоцитів, збагаченої стероїдпродукуючими клітинами, треба віддавати перевагу режимам заморожування з повільною швидкістю охолодження (1°C/хв) і температурною ініціацією кристалоутворення.

**Ключові слова:** *флуоресцентні барвники, 3β-гидроксистероїддегидрогеназа, криоконсервування, швидкість охолодження, адренортикоцити.*

### The study of the possibility of rat adrenal gland cells cryopreservation

G.V.Dudetskaya, T.M.Gurina, T.P.Bondarenko

By means of methods of fluorescent microscopy and histochemical staining cells of adrenal glands of adult rats have been studied before and after cryopreservation. Slow cooling rate allows saving the most amount of cells in suspension after freeze–thawing. In order to get a suspension of adrenocytes, enriched by steroid producing cells, it is necessary to use preferably the mode of freeze with slow cooling rate (1°C/min) and temperature initiation of crystal formation.

**Key words:** *fluorescent dyes, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, cryopreservation, cooling rate, adrenal cells.*

#### Введение

В связи с развитием и внедрением в клиническую практику трансплантационных методов лечения надпочечниковой недостаточности возрос интерес к созданию криобанков гормонпродуцирующих клеток и тканей (Тронько и др., 1990; Бондаренко, Легач, 1999; Lee, Bae, 2000; Ларін та ін., 2003; Grodstein et al., 2009). На протяжении долгого времени ведутся поиски метода криоконсервирования адренортикоцитов, который обеспечил бы уровень биологической полноценности этих клеток, достаточный для практического использования. На сегодняшний день успешный режим криоконсервирования разработан для фрагментов (Гурина та ін., 2005) и органной культуры (Бондаренко, Легач, 2001) надпочечников новорожденных поросят. В литературе представлены экспериментальные данные по криоконсервированию клеток медуллярной зоны фетальных надпочечников человека (Silani et al., 1988). Однако отсутствуют данные о возможности криоконсервирования одиночных клеток надпочечных желез при условии сохранения их стероидпродуцирующей активности.

Одним из важных условий получения максимального уровня сохранности деконсервированных клеток является оптимальный режим их замораживания. В связи с этим возникает необходимость проведения исследований, направленных на оценку влияния скорости охлаждения клеток как повреждающего фактора при криоконсервировании.

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

### Материалы и методы

Объектом исследования служили надпочечники крыс. Животных забивали с применением эфирного наркоза, надпочечные железы были немедленно извлечены, порезаны на фрагменты 1–2 мм<sup>3</sup> и помещены в охлажденную среду 199. Суспензию клеток получали ферментативным методом путем 3-кратного инкубирования фрагментов надпочечников в среде 199, содержащей коллагеназу (1 мг/мл) и ДНКазу (0,2 мг/мл) при 37°C (Hines, Azziz, 1999). Суспензии клеток, полученные на всех этапах коллагенизации, объединяли и центрифугировали 2 раза в среде 199, содержащей 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) при 225 g в течение 3 минут, фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм, после чего снова отмывали средой 199 с 0,2% БСА.

В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Раствор криопротектора готовили на среде 199, содержащей 20% сыворотку крупного рогатого скота (КРС) и ДМСО в концентрации 14%. Добавление криопротектора осуществляли поэтапно. Такой способ добавления защитного раствора для последующего замораживания позволяет повысить сохранность клеток при криоконсервировании (McKay, Karow, 1983; Lakey et al., 2001; Maruyama et al., 2004). К 500 мкл суспензии клеток надпочечников с интервалом 1 мин при температуре 0–4°C в 5 этапов добавляли по 100 мкл раствора ДМСО. Конечная концентрация ДМСО в образце составила 7%. Замораживание осуществляли в криоампулах фирмы "Nunc" (США) объемом 1,8 мл на программном замораживателе "Cryoson" (Германия). При замораживании образцов использовали следующие программы:

- программа 1: от 0° – 4°C до -40°C образцы охлаждали со скоростью 1°C/мин. После этого образцы погружали в жидкий азот (-196°C);

- программа 2: образцы охлаждали аналогично программе 1, но для предотвращения переохлаждения системы дополнительно проводили температурную инициацию кристаллообразования (Грищенко та ін., 2005), суть которой заключается в резком увеличении скорости охлаждения образца при температурах, близких к температуре кристаллизации криопротекторного раствора. Температура начала инициации кристаллообразования зависит, главным образом, от объема образца, и точное ее значение определяется индивидуально для данной геометрии и объема криоампулы. Процедура температурной инициации кристаллообразования предусмотрена возможностями программного замораживателя "Cryoson" (Германия). Известно, что уменьшение величины переохлаждения способствует увеличению сохранности клеток после замораживания (Белоус, Грищенко, 1994);

- программа 3: от 0° – 4°C до -40°C образцы охлаждали со скоростью 5°C/мин. После этого образцы погружали в жидкий азот;

- программа 4: от 0° – 4°C до -40°C образцы охлаждали со скоростью 10°C/мин с последующим погружением в жидкий азот;

- программа 5: от 0° – 4°C до -40°C – со скоростью 15°C/мин с последующим погружением в жидкий азот;

- программа 6: от 0° – 4°C до -40°C – со скоростью 20°C/мин с последующим погружением в жидкий азот;

- программа 7: от 0° – 4°C до -40°C – со скоростью 40° – 50°C/мин с последующим погружением в жидкий азот;

- программа 8: замораживание образцов проводили с неконтролируемой скоростью охлаждения путем прямого погружения в жидкий азот ( $\downarrow$ LN<sub>2</sub>).

Отогрев осуществляли на водяной бане (37°C) до исчезновения твердой фазы.

Удаление криопротектора после замораживания–нагрева проводили поэтапно (Криоконсервирование клеточных суспензий, 1983), с последующим центрифугированием в течение 3 минут при 225 g. Отмывочная среда содержала 10% КРС и 2,5% БСА. Процент жизнеспособных клеток определяли с помощью флуоресцентных красителей (Jones, Senft, 1985) – флуоресцеин диацетата (ФДА) и пропидиум йодида (ПИ). Образцы дважды отмывали средой 199 и далее оценивали их жизнеспособность на люминесцентном микроскопе Olympus IX-71 при длине волны возбуждения флуоресценции 488 нм.

Наличие значительного количества липидных включений и активность 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы (3 $\beta$ -ГСД) являются неотъемлемой характеристикой стероидпродуцирующих клеток в надпочечниках.

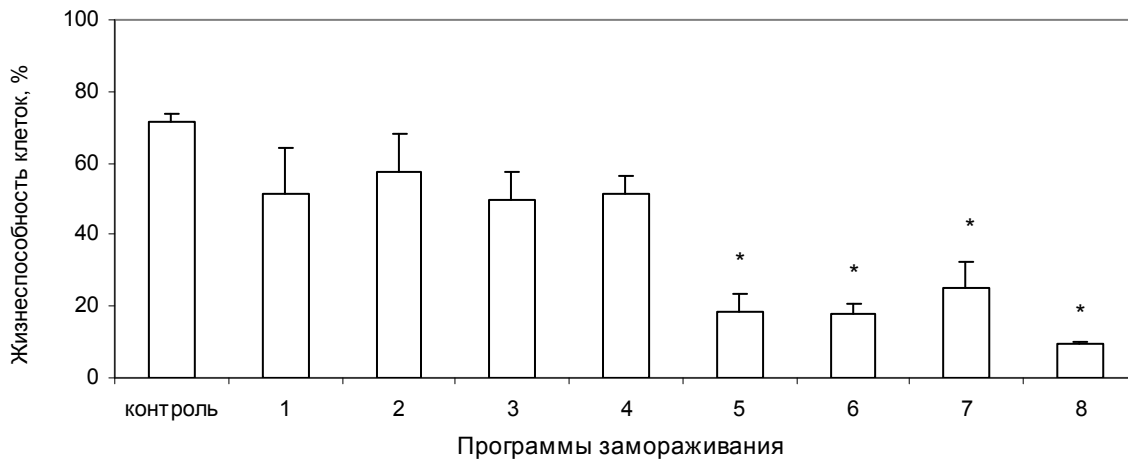
Для выявления в клетках липидных включений проводили окрашивание нильским красным (НК) по методу, описанному в (Tchoukalova et al., 2003). В 1 мл ДМСО растворяли 1 мг красителя. Перед окрашиванием раствор красителя разводили 1:100 физиологическим раствором на фосфатном буфере (рН=7,4) и добавляли 15 мкл данного раствора к 1 мл клеточной суспензии ( $1 \times 10^6$  кл/мл). Окрашивали 10 мин при 37°C. После окрашивания клетки однократно отмывали от избытка красителя физиологическим раствором на фосфатном буфере. Регистрацию флуоресценции проводили при помощи люминесцентного микроскопа Olympus IX-71, при возбуждении световым пучком с длиной волны 455–500 нм. Сохранность НК(+)-клеток после криоконсервирования выявляли по содержанию в цитоплазме клеток окрашенных включений и выражали в процентах по отношению к общему количеству клеток в образце после нагрева. Для выявления в клетках активности 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы проводили гистохимическое окрашивание (Benton et al., 1995). Для этого  $1 \times 10^6$  кл/мл инкубировались в 2,5 мл забуференного физиологического раствора (рН=7,4), содержащего 0,2 мг/мл нитросинего тетразолия, 1 мг/мл НАД и 0,12 мг/мл дегидроэпиандростерона, в течение 90 мин при 37°C. Позитивно окрашенные клетки (ГСД(+)-клетки) имели фиолетовую окраску восстановленного тетразолия. Подсчет 3 $\beta$ -ГСД(+)-клеток осуществляли в поле зрения микроскопа и выражали в процентном соотношении к общему количеству клеток в образце. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента с помощью пакета программ Excel. Разницу показателей считали достоверной при значении  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Криоконсервирование непременно приводит к повреждению части клеток. Поэтому для оценки эффективности криоконсервирования важным является определение количества жизнеспособных клеток. Существующие методы оценки жизнеспособности ядерных клеток основаны на таких параметрах, как наличие ядра, целостность клеточной мембраны и уровень 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 (Armour et al., 2008), а окрашивание ПИ свидетельствует о наличии ядра. Известно, что ПИ обладает способностью специфически окрашивать нуклеиновые кислоты (Jones, Senft, 1985), а использование глутарового альдегида облегчает доступ ПИ и обеспечивает его связывание с ДНК/РНК в клетках, сохранивших ядра. Исходя из этого, при использовании метода окрашивания флуоресцентными красителями, окрашивание ПИ проводили в присутствии фиксатора глутарового альдегида. Формирующаяся при этом красно-зеленая флуоресценция может визуализироваться при помощи флуоресцентного микроскопа (Bachtel et al., 1999; Diaz, Pertega, 2004).

Как видно из рис. 1, исходя из процентного соотношения ФДА/ПИ положительно окрашенных клеток в суспензии, относительно количества ФДА/ПИ положительно окрашенных клеток до замораживания (контроль), жизнеспособность клеток понижалась после криоконсервирования по всем программам. Однако наиболее выраженное падение жизнеспособности суспензии клеток было выявлено при использовании программ 5 (18,7%), 6 (17,9%), 7 (25,4%), 8 (9,6%). Наибольшее количество жизнеспособных клеток сохранилось при использовании программ 1 (51,4%), 2 (57,4%), 3 (49,5%), 4 (51,5%). Следовательно, при криоконсервировании суспензии клеток надпочечников крыс необходимо использовать медленные (до 10°C/мин) скорости охлаждения. Замораживание с контролируруемыми скоростями охлаждения более 10°C/мин и использование неконтролируемых скоростей охлаждения (прямое погружение в жидкий азот) значительно снижает показатели жизнеспособности клеток надпочечных желез крыс.

Формирование цитоплазматических липидных капель в стероидпродуцирующих клетках надпочечников является неотъемлемым процессом. Они представляют собой скопление нейтральных липидов, обычно триглицеридов или холестерина эфиров, которые используются как средство запасания энергии в организме или как депо холестерина для синтеза стероидных гормонов в случае со стероидогенными тканями (Renold, Cahill, 1965; Goldstein, Brown, 1977; Greenspan et al., 1985a, b; Dunn et al., 2009).

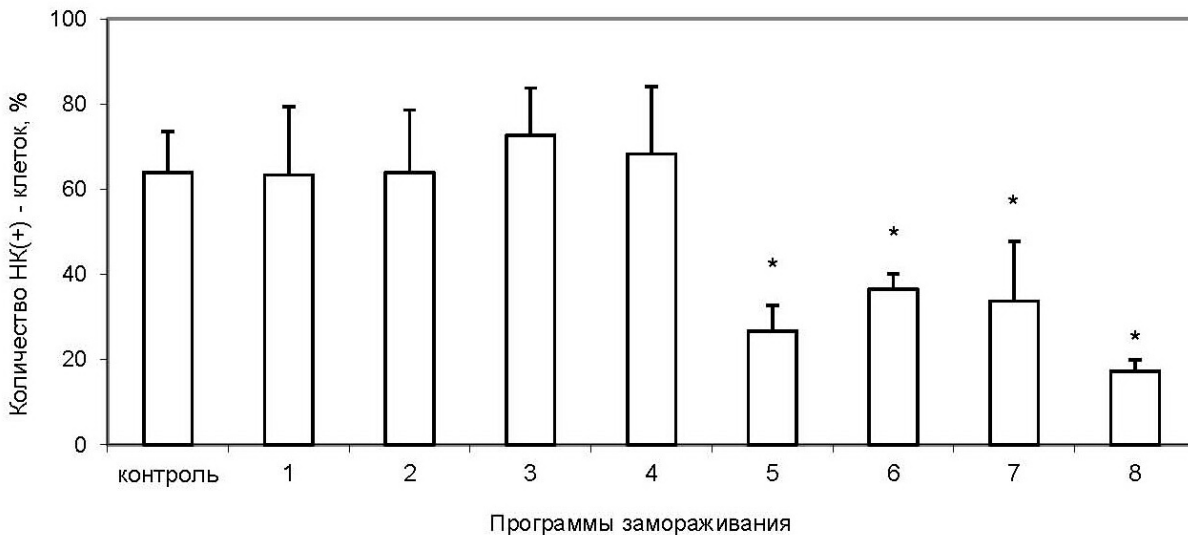


**Рис. 1. Жизнеспособность клеток (по включению ФДА/ПИ) до (контроль) и после кріоконсервирования по программам (1–8)**

\* – различия достоверны по отношению к контролю,  $p < 0,05$ .

Для визуализации липидных включений в стероидпродуцирующих клетках и для определения их наличия после кріоконсервирования использовали флуоресцентный краситель нильский красный.

Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о значительном снижении количества НК(+)–клеток после замораживания по программам 5 (26,7%), 6 (36,5%), 7 (33,7%), 8 (17,2%). Образцы, кріоконсервированные по программам 1 (63,3%), 2 (63,9%), 3 (72,6%), 4 (68,3%), сохраняют количество НК(+)–клеток на уровне контрольных значений (64%). Таким образом, оценка функциональной активности клеток надпочечных желез крыс после кріоконсервирования по количеству НК(+)–клеток показала, что достоверных отличий между контрольным значением и данными по этому показателю после замораживания по режимам с медленными контролируруемыми скоростями охлаждения (до 10°С/мин) нет. В то время как режимы с быстрыми и неконтролируемыми скоростями охлаждения снижают этот показатель практически вдвое.



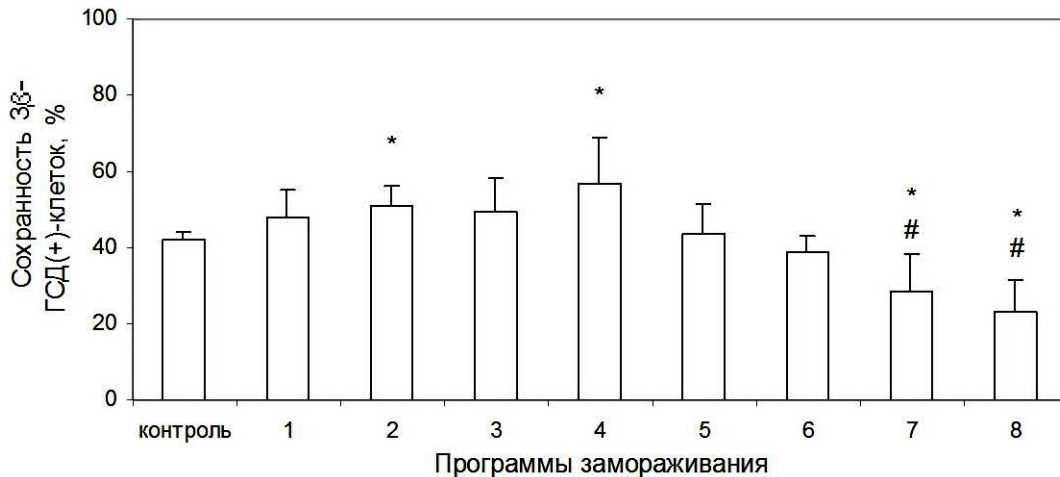
**Рис. 2. Количество клеток, включающих нильский красный до (контроль) и после кріоконсервирования по программам (1–8)**

\* – различия достоверны по отношению к контролю,  $p < 0,05$ .

Одним из методов оценки жизнеспособности стероидпродуцирующих клеток в суспензии является определение активности фермента 3β-ГСД. Этот фермент обеспечивает конверсию

прегненолона в прогестерон и характеризует функциональную активность стероидпродуцирующих клеток (Simard et al., 2005). Поэтому наличие позитивно окрашенных клеток, имеющих фиолетовую окраску восстановленного тетразолия, свидетельствует о сохранности стероидпродуцирующих клеток в суспензии.

Как видно из рис. 3, сохранность  $3\beta$ -ГСД-положительных клеток после криоконсервирования оставалась на уровне контрольных значений (42%) в случае замораживания по программам 1 (47,6%), 3 (49,4%), 5 (43,8%), 6 (39,1%). Охлаждение суспензии по программам 7 (28,2%) и 8 (23,1%) привело к снижению количества  $3\beta$ -ГСД-положительных клеток. В случае замораживания суспензии по программам 2 (56,6%) и 4 (50,9%) сохранность  $3\beta$ -ГСД-положительных клеток по сравнению с контролем была достоверно выше.



**Рис. 3. Количество  $3\beta$ -ГСД-положительных клеток до (контроль) и после криоконсервирования по программам (1–8)**

\* – различия достоверны по отношению к контролю,  $p < 0,05$ ;

# – различия достоверны по отношению к программам замораживания 1, 2, 3, 4,  $p < 0,05$ .

Таким образом, использование программ 2 и 4 для замораживания надпочечных желез крыс способствует сохранности наибольшего количества клеток, обладающих активностью  $3\beta$ -ГСД(+), которая является одним из маркеров стероидпродуцирующих клеток. Учитывая представленные данные о влиянии скоростей охлаждения на сохранность и стероидогенный потенциал адренокортикоцитов взрослых крыс, можно предположить, что при довольно низких значениях общей сохранности клеток в суспензии конечный результат криоконсервирования при использовании программ 2 и 4 направлен на сохранение именно стероидпродуцирующих клеток в суспензии. Причем, при практически одинаковых показателях сохранности  $3\beta$ -ГСД(+)-клеток в случае использования программ 2 и 4, предпочтение стоит отдавать именно более медленному охлаждению ( $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) с использованием функции температурной инициации кристаллообразования (программа 2) по сравнению с режимом охлаждения с более высокой скоростью  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  (программа 4). Это связано с тем, что при более высоких скоростях охлаждения большая вероятность образования мелких зародышей кристаллов льда внутри клетки, которые на этапе нагрева за счет процесса рекристаллизации могут вызывать дополнительное повреждение клеток (Mazur, 1990; Maquyama, 2007). Также при медленной скорости охлаждения за счет значительного переохлаждения увеличивается время экспозиции клеток в криоконсервирующем растворе до начала его кристаллизации. В случае большой чувствительности клеток к токсичности криопротектора это может привести к дополнительной потере клеток при замораживании. Медленное охлаждение с инициацией кристаллообразования дает более стабильную структуру и большую повторяемость результатов за счет исключения переохлаждения образцов, величина которого, как известно, имеет вероятностный характер и непостоянную величину.

### Выводы

1. При криоконсервировании клеток надпочечных желез крыс предпочтительно использовать медленные скорости охлаждения.



2. Контролируемые скорости охлаждения до 10°C/мин позволяют получить более высокие показатели жизнеспособности (57,4%) и функциональной активности (72,6% НК(+)-клеток) клеток надпочечных желез крыс.

3. Установлено, что при криоконсервировании суспензии клеток надпочечников скорости охлаждения оказывают селективное действие на сохранность именно стероидпродуцирующих клеток в суспензии.

4. Для получения суспензии клеток надпочечников крыс, обогащенной стероидпродуцирующими ГСД(+)-клетками, предпочтительно использовать режим замораживания с медленным охлаждением (1°C/мин) и температурной инициацией кристаллообразования.

### Список литературы

- Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наукова думка, 1994. – 435с. /Belous A.M., Grishchenko V.I. Kriobiologiya. – Kiev: Naukova dumka, 1994. – 435s/
- Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Криоконсервирование адренкортикальной ткани и ее использование в клинике // Клінічна фармація. – 1999. – Т.3, №2. – С. 112–115. /Bondarenko T.P., Legach E.I. Kriokonservirovaniye adrenokortikal'noy tkani i yeye ispol'zovaniye v klinike // Klinichna farmatsiya. – 1999. – Т.3, №2. – С. 112–115/
- Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Патент України №34848, МПК<sup>5</sup>, С12N5/02. Спосіб криоконсервування культури клітин адренкортикальної тканини. Заявл. 13.07.99. Оpubл. 15.03.01. Бюл. №2. /Bondarenko T.P., Legach Ye.I. Patent Ukrainy №34848, MPK<sup>5</sup>, S12N5/02. Sposib kriokonservuvannya kul'tury klityn adrenokortyka'noi tkanyny. Zayavl. 13.07.99. Opubl. 15.03.01. Byul. №2/
- Грищенко В.И., Гольцев А.М., Гуріна Т.М., Бабенко Н.М. Патент України №4523, МПК<sup>7</sup>, А0N 1/02. Спосіб криоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини. Заявл. 24.05.04. Оpubл. 17.01.05. Бюл. №1. /Grishchenko V.I., Gol'tsev A.M., Gurina T.M., Babenko N.M. Patent Ukrainy №4523, MPK<sup>7</sup>, A0N 1/02. Sposib kriokonservuvannya suspenzii klityn embrional'noi nervovoi tkanyny. Zayavl. 24.05.04. Opubl. 17.01.05. Byul. №1/
- Гуріна Т.М., Алабедалькарім Н.М., Устиченко В.Д., Бондаренко Т.П. Патент України № 4567, МПК<sup>7</sup>, №12N5/08 А01N1/02. Спосіб криоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят. Заявл. 07.06.2004. Оpubл. 17.01.05. Бюл. №1. /Gurina T.M., Alabedal'karim N.M., Ustichenko V.D., Bondarenko T.P. Patent Ukrainy № 4567, MPK<sup>7</sup>, №12N5/08 A01N1/02. Sposib kriokonservuvannya organnoi kul'tury nadnyrkovykh zaloz novonarozhzenykh porosyat. Zayavl. 07.06.2004. Opubl. 17.01.05. Byul. №1/
- Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1983. – 240с. /Kriokonservirovaniye kletochnykh suspenziy / Pod red. A.A.Tsutsayevoy. – Kiev: Naukova dumka, 1983. –240s/
- Ларін О.С., Січінава Р.М., Сидоренко Л.М. Лікування гіпокортицизму методом алотрансплантації органних культур надниркових залоз плідів людини // Трансплантологія. – 2003. – Т.4, №1. – С. 160–162. /Larin O.S., Sichinava R.M., Sidorenko L.M. Likuvannya gipokortitsyzmu metodom alotransplantatsii organnykh kul'tur nadnyrkovykh zaloz plodiv lyudyny // Transplantologiya. – 2003. – Т.4, №1. – С. 160–162/
- Тронько Н.Д., Рыбаков С.И., Комиссаренко И.В. и др. Лечение хронического гипокортицизма методом трансплантации культур клеток коры надпочечных желез. Метод. реком. – Київ: Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця, 1990. – 24с. /Tron'ko N.D., Rybakov S.I., Komissarenko I.V. i dr. Lecheniye khronicheskogo gipokortitsizma metodom transplantatsii kul'tur kletok kory nadpochechnykh zhelez. Metod. rekom. – Kyiv: In-t fiziologii im. O.O.Bogomol'tsya, 1990. – 24s/
- 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, №1. – P. 89–96.
- 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, №12. – P. 3048–3051.
- Benton L., Shan L.X., Hardy M.P. Differentiation of adult Leydig cells // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 1995. – Vol.53, №1–6. – P. 61–68.
- Diaz T.M., Pertega S. FDA/PI flow cytometry assay of complement-mediated cytotoxicity of antibodies generated during xenotransplantation // Cytometry. – 2004. – Vol.62. – P. 54–60.
- Dunn J.C., Chu H.H., Zupekan T. Transplantation of adrenal cortical progenitor cells enriched by Nile red // J. Surg. Res. – 2009. – Vol.156 (2). – P. 317–324.
- 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.
- Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets // The Journal of Cell Biology. – 1985a. – Vol.100. – P. 965–973.
- Greenspan P., Mayer E.P., Fowler S.D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red // Journal of Lipid Research. – 1985b. – Vol.26. – P. 781–789.
- 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, №2. – P. 431–433.

- Hines G.A., Azziz R. Impact of architectural disruption on adrenocortical steroidogenesis in vitro // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1999. – Vol.84. – P. 1017–1021.
- 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.
- Lakey J.R., Anderson T.J., Rajotte R.V. Novel approaches to cryopreservation of human pancreatic islets // Transplantation. – 2001. – Vol.27, №72 (6). – P. 1005–1011.
- Lee M.K., Bae Y.H. Cell transplantation for endocrine disorders // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2000. – Vol.42. – P. 103–120.
- Maruyama H. Cryopreservation of living cells: principles and practice // Transfusion. – 2007. – Vol.47. – P. 935–945.
- 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, №4. – P. 1133–1134.
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // Cell Biophysics. – 1990. – Vol.17, №1. – P. 53–92.
- McKay D.B., Karow A.M.Jr. Factors to consider in the assessment of viability of cryopreserved islets of Langerhans // Cryobiology. – 1983. – Vol.20, №2. – P. 151–160.
- Renold A.E., Cahill G.F. Adipose tissue // In: Handbook of physiology. – Washington: American Physiological Society, 1965. – 824p.
- Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells // Brain Res. – 1988. – Vol.28, №454 (1–2). – P.383–386.
- Simard J., Ricketts M.L., Gingras S. et al. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family // Endocr. Rev. – 2005. – Vol.26, №4. – P. 525–582.
- 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, №9. – P. 1795–1801.

---

**Представлено: Г.Ф.Жегуновим / Presented: G.F.Zhegunov**

**Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко / Recommended for publishing by: V.V.Martynenko**

*Подано до редакції / Received: 24.03.2010.*