

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ДУДЕЦЬКА ГАЛИНА ВАДИМІВНА

УДК 57.086.13:576.53:612.451.014

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЗОНАЛЬНО
ДИФЕРЕНЦІЙОВАНІ ПОПУЛЯЦІЇ АДРЕНОЦИТІВ ТВАРИН**

09 – Біологія

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ (підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Бондаренко Тетяна Петрівна, доктор біологічних наук,
професор

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Дудецька Г.В. Вплив факторів кріоконсервування на зонально диференційовані популяції адреноцитів тварин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 09 – Біологія (091 – Біологія). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

У дисертаційній роботі проведено теоретичне та експериментальне дослідження впливу різних концентрацій розчинів диметилсульфоксиду (ДМСО), температури на етапі насичення кріопротектором та режимів кріоконсервування на кількість, життєздатність та функціональну активність загальної суспензії клітин (ЗСК), фракцій загальної суспензії клітин (ФР), клітин коркової речовини (ККР) та клітин мозкової речовини (КМР) надниркових залоз тварин.

Наднирникові залози включають до свого складу різні типи клітин, що представляє інтерес з точки зору вивчення їх функціональних характеристик як у вигляді загальної суспензії, так і у вигляді окремих фракцій. Метод розподілу загальної суспензії в градієнті щільності фіколу дозволяє отримати фракції клітин, збагачені клітинами певної зональності. Ступінчастий градієнт щільності фіколу дозволив виділити 3 основні фракції клітин: ФР 1 (1,025 – 1,033 г/см³), ФР 2 (1,033 – 1,045 г/см³) і ФР 3 (1,066 – 1,076 г/см³). Так, у ФР 2 в основному знаходяться КМР, що підтверджується гістохімічним методом на виявлення гранул, що містять аміни. У ФР 1 і ФР 3 в основному сконцентровані стероїдпродукуючі клітини, які характеризуються високим вмістом ферменту 3 β – гідроксістероїддегідрогенази (3 β -ГСД) і клітин, які містять ліпідні краплі, забарвлені нільським червоним. Вимірювання альдостерону в середовищі культивування радіоімунологічним методом показало достовірно високі значення продукції альдостерону для ФР 3 на першу добу культивування, що дає можливість припустити, що у інтерфазі

фіколу зі щільністю 1,066 – 1,076 г/см³ зосереджуються в основному альдостеронпродукуючі клітини.

На сьогоднішній день кріоконсервування є єдиним доступним способом довгострокового зберігання біологічного матеріалу. Розробка оптимальних режимів кріоконсервування потребує врахування процесів масообміну в системі «клітина-навколишнє середовище». Відомо, що зміни клітинного об'єму при осмотичній реакції залежать від концентрації і температури кріозахисного розчину. Було виявлено, що зі збільшенням концентрації ДМСО і зменшенням температури інкубації клітини зазнавали значних об'ємних змін. При використанні розчинів ДМСО в концентраціях 5, 7 та 10 % об'єм ККР зменшувався на 10 – 28 %. При цьому час відновлення 95 % початкового об'єму при 4 °С становив приблизно 4 хв, а при 37 °С – 1 хв. КМР виявилися більш чутливими до зміни осмотичного тиску. Це проявлялося в зменшенні об'єму клітин на 13 – 47 %. Час відновлення 95 % початкового об'єму при 4 °С складав близько 6 хв, а при 37 °С – 2 хв. Таким чином, встановлено, що температура впливала не тільки на тривалість врівноваження, а й на величину змін об'єму клітини.

Значення коефіцієнтів проникності мембран клітин для молекул ДМСО збільшуються з підвищенням температури і концентрації кріопротектору в розчині. Встановлено, що проникність плазматичної мембрани ККР при температурі 22 і 37 °С вище, ніж у КМР, причому при 37 °С цей показник значно зростає.

Коефіцієнт фільтрації мембран ККР для води при температурі 4 °С складав $2,35 \pm 0,83 \times 10^{14}$ м³/Нхс, при 22 °С – $2,71 \pm 0,31 \times 10^{14}$ м³/Нхс, при 37 °С – $4,28 \pm 1,91 \times 10^{14}$ м³/Нхс. Для КМР коефіцієнт фільтрації мембран складав $2,51 \pm 0,83 \times 10^{14}$ м³/Нхс – при 4 °С, $2,82 \pm 0,95 \times 10^{14}$ м³/Нхс – при 22 °С, $2,85 \pm 1,03 \times 10^{14}$ м³/Нхс – при 37 °С. Найменша енергія активації встановлена в температурному інтервалі 4 – 22 °С для обох типів клітин. Більш високі значення енергії активації спостерігаються в діапазоні температур 22 – 37 °С. Було зроблено припущення, що проникнення молекул ДМСО крізь

плазматичну мембрану ККР відбувається крізь ліпідний бішар і білкові водні канали, а у КМР проникнення молекул ДМСО відбувається переважно крізь ліпідний бішар.

При насичені ККР, ФР 1 та ФР 3 найбільш виражений цитотоксичний ефект для розчину 10 % ДМСО проявлявся при температурі 37 °С, що супроводжувалось зниженням кількості, життєздатності та функціональної активності клітин.

Для клітин мозкової речовини (КМР, ФР 2), отриманої двома різними способами, залежності від підвищення температури (37 °С) для показників кількості клітин, життєздатності і функціональної активності не спостерігались. Суспензія КМР виявилася більш чутливою до змін осмотичного тиску середовища інкубації в порівнянні з суспензією ККР. Максимальний ступінь дегідратації для КМР було встановлено при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО, що супроводжувалося зниженням кількості клітин в зразку.

Вперше показано наявність відмінностей за ступенем кріостійкості для різних типів клітин наднирників та розроблено оптимальний режим кріоконсервування ЗСК, який дозволяє зберегти понад 70 % клітин, з яких 56,6 % належать до стероїдопродукуючих клітин, здатних до секреції альдостерону при наступному культивуванні. Даний режим кріоконсервування, який дозволяє зберегти гетерогенність ЗСК надниркових залоз та її здібність до проліферації після відігрівання, включає насичення кріопротектором ДМСО в концентрації 7 % при 4 °С та кріоконсервування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв.

Культивування деконсервованої ЗСК в присутності 10 % ЕТС сприяло формуванню клітинного моношару на 3 добу культивування. Морфологічно первинна культура ЗСК складалася з фібробластоподібних, полігональних і округлих клітин. Після кріоконсервування ЗСК зберігала морфологічні ознаки нативної культури. Встановлено, що на протязі 14 діб нативні та кріоконсервовані ЗСК зберігали здатність до синтезу та секреції альдостерону.

Показано, що кріоконсервована ЗСК зі швидкістю охолодження 10 °С/хв здатна до продукції альдостерону на рівні 433,39 пг/мл на першу добу культивування. Максимальний рівень альдостерону кріоконсервованої культури зберігався до 2 доби культивування, після чого спостерігалось поступове зниження даного показника. При чому профілі кривих з динаміки секреторної активності співпадали для нативної і кріоконсервованої культури.

Ключові слова: загальна суспензія клітин наднирників, насичення, кріопротектор, диметилсульфоксид, кріоконсервування, культивування, стероїдпродукуючі клітини, альдостерон, 3 β -ГСД, нільський червоний.

ANNOTATION

Dudetska GV. Influence of cryopreservation factors on zonally differentiated populations of animal adrenocytes. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the Doctor of Philosophy degree in specialty 09 - Biology (091 - Biology). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

In the thesis the theoretical and experimental studies of influence of various concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions, temperature at a stage of saturation with cryoprotectant and cryopreservation modes on quantity, viability and functional activity of the adrenal cells total suspension (AdCTS), fractions (FR) of the total suspension of adrenal cells, adrenal cortical cells (AdCC) and medulla cells (MC) of animal adrenal gland were performed.

The adrenal glands include different types of cells, which is of interest in terms of studying their functional characteristics both as a total suspension and as individual fractions. The method of distribution of the total suspension in the ficoll density gradient allows the obtaining of cell fractions enriched in cells of a certain zonation. The step gradient of ficoll density enabled the allocation of 3 main fractions of cells: FR 1 (1.025 – 1.033 g/cm³), FR 2 (1.033 – 1.045 g/cm³) and FR 3 (1.066 – 1.076 g/cm³).

So, FR 2 predominantly are composed with MC, that is histochemically confirmed to detect granules containing amines. In FR 1 and FR 3 the steroid-producing cells are mainly concentrated, which are characterized with a high content of enzyme 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) and cells containing lipid droplets stained with Nile red. Measurement of aldosterone in the culture medium by radioimmunological method demonstrated significantly high values of aldosterone production for FR3 on the first day of cultivation, that suggests that in the interphase of ficoll with a density of 1.066 – 1.076 g/cm³ mainly aldosterone-producing cells are concentrated.

To date, cryopreservation is the only available way for a long-term storage of biological material. The development of optimal cryopreservation regimens requires consideration of mass transfer processes in the "cell-environment" system. It is known that changes in cell volume during the osmotic reaction depend on the concentration and temperature of cryoprotectant solution. It was found that with increasing concentration of DMSO and decreasing incubation temperature, the cells underwent significant volume alterations. When using 5, 7 and 10 % DMSO solutions the volume of AdCC decreased by 10 – 28%. The recovery time of 95 % of the initial volume at 4 °C was approximately 4 minutes, and at 37 °C this was 1 minute. MCs were more sensitive to changes in osmotic pressure. This was manifested in a decrease of cell volume by 13 – 47%. The recovery time of 95 % of the initial volume at 4 °C was about 6 minutes, and at 37 °C it made 2 minutes. Thus, it was found that temperature affected not only the duration of equilibration, but also the rate of changes in cell volume.

The values of the cell membrane permeability coefficients to DMSO molecules increase with a rise in temperature and concentration of cryoprotectant in solution. It was found that the permeability of the plasma membrane of the AdCC at a temperature of 22 and 37 °C was higher than in the MC, and at 37 °C this value increased strongly.

The filtration coefficient of AdCC membranes to water at a temperature of 4 °C was $2.35 \pm 0.83 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$, at 22 °C – $2.71 \pm 0.31 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$, at 37 °C – $4.28 \pm 1.91 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$. For MC, the filtration coefficient of the membranes made $2.51 \pm 0.83 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$ – at 4 °C, $2.82 \pm 0.95 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$ – at 22 °C, $2.85 \pm 1.03 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$ – at 37 °C. The lowest activation energy was revealed within the temperature range of 4 – 22 °C for both cell types. Higher values of activation energy were observed within the temperature range of 22 – 37 °C. It has been suggested that the penetration of DMSO molecules via the plasma membrane of AdCC occurs via lipid bilayer and protein water channels, and in MCs the DMSO molecules penetrate mainly through the lipid bilayer.

During saturation of AdCC, FR 1 and FR 3 the most pronounced cytotoxic effect for a solution of 10 % DMSO was manifested at a temperature of 37 °C, that was accompanied with a reduction in the number, viability and functional activity of cells.

For the medulla cells (MCs, FR 2), obtained in two different ways, there was no dependence on an increase in temperature (37 °C) for the indices of cell number, viability and functional activity. The MC suspension was more sensitive to changes in osmotic pressure of incubation medium, compared with the suspension of AdCC. The maximum degree of dehydration for MC was found at 4 °C in the presence of 10 % DMSO, which was accompanied with a decrease in the number of cells in a sample.

For the first time there were shown the differences in the degree of cryostability for different types of adrenal cells and the optimal regime of cryopreservation of AdCTS was developed, that enabled to save more than 70 % of cells, among which 56.6 % were referred to steroid-producing cells capable of aldosterone secretion during subsequent cultivation. This mode of cryopreservation, allowing the maintaining of heterogeneity of the adrenal glands and its ability to proliferate after heating, includes the saturation with DMSO cryoprotectant at a concentration of 7 % at 4 °C and cryopreservation with a cooling rate of 10 °C/min.

Culturing of warmed AdCTS in the presence of 10% ETS contributed to the formation of cell monolayer on day 3 of cultivation. Morphologically, the primary culture of AdCTS consisted of fibroblast-like, polygonal and rounded cells. After cryopreservation, AdCTS retained morphological features of native culture. It was found that for 14 days the native and cryopreserved AdCTS kept the ability to synthesize and secrete aldosterone. It has been shown that cryopreserved AdCTS with a cooling rate of 10 °C/min is capable of aldosterone production at the level of 433.39 pg/ml on the first day of cultivation. The maximum level of aldosterone in cryopreserved culture was maintained for up to 2 days of cultivation, after which

there was a gradual decrease in this index. Moreover, the profiles of curves as for the dynamics of secretory activity coincided for native and cryopreserved culture.

Key words: total adrenal cell suspension, saturation, cryoprotectant, dimethyl sulfoxide, cryopreservation, cultivation, steroid-producing cells, aldosterone, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, Nile red

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах України

1. Дудецька ГВ, Божок ГА, Зубов ПМ, Гуріна ТМ, Бондаренко ТП. Вплив різних швидкостей охолодження на життєздатність та клітинний склад суспензії клітин надниркових залоз при кріоконсервуванні. Проблеми криобіології. 2012; 22(1): 30–8. (Внесок здобувача: отримання суспензії клітин наднирників, оцінка життєздатності клітин до та після кріоконсервування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

2. Дудецкая ГВ, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Изучение возможности кріоконсервирование клеток надпочечников взрослых крыс. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, серія біологія. 2010; 12(920): 111–17. (Внесок здобувача: отримання суспензії клітин наднирників, оцінка життєздатності клітин до та після кріоконсервування, проведення гістохімічного аналізу, аналіз мікрофотографій, отриманих за допомогою флюоресцентного мікроскопу, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

3. Дудецкая ГВ, Коваленко ИФ, Бондаренко ТП. Влияние температуры и различных концентраций диметилсульфоксида на проницаемость мембран клеток надпочечников для воды и криопротектора. Вісник проблем біології і медицини. 2011; 4(90): 85–8. (Внесок здобувача: отримання суспензії клітин наднирників, оцінка життєздатності клітин, аналіз мікрофотографій, визначення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин коркової речовини і клітин мозкової речовини надниркових залоз для молекул води і ДМСО, підготовка матеріалів до друку).

4. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Влияние скорости охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс. Проблеми криобіології. 2010; 20(4): 379–87. (Внесок здобувача: отримання суспензії клітин наднирників, оцінка

життєздатності клітин до та після кріоконсервування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку).

Статті у фахових зарубіжних журналах

5. Alabedalkarim NM, Bozhok GA, Legach EI, Ustichenko VD, Zubov PM, Bilyavskaya SB, Dudetskaya GV, et al. Outcome of adrenal tissue fragments allotransplantation: The impact of cryopreservation. *Cryobiology*. 2012; 65(3): 188–5. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.05.013> Scopus. (Внесок здобувача: отримання суспензії клітин наднирників, оцінка життєздатності клітин до та після кріоконсервування, проведення цитофлуориметричного аналізу, підготовка матеріалів до друку).

Тези наукових конференцій

6. Дудецкая ГВ, Юрчук ТА, Устиченко ВД, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Регидратированные адренкортикоциты как модель кріоконсервированных стероидпродуцирующих клеток. *Холод в биологии и медицине – 2006: мат. 30-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 24-25 мая 2006 г.)*. Проблемы криобиологии. 2006; 16(4): 43.

7. Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Дудецкая ГВ, Колот НВ, Погребняк НЛ, Легач ЕИ. Использование флуоресцентных полиметиновых красителей в клеточной трансплантации. *Материалы III Міжнар. симпозіуму «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»*; 2007 квіт. 25–26; Москва; с. 56.

8. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД, Алабедаькарим НМ. Цитофлуориметрическая оценка эффективности кріоконсервирования цельной суспензии и различных субпопуляций адреноцитов новорожденных поросят. *Холод в биологии и медицине – 2007: мат. 31-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 16-17 мая 2007 г.)*. Проблемы криобиологии. 2007; 17(2): 204.

9. Dudetska GV, Yurchuk TA, Alabedalkarim NM. Fluorescent and radioimmunological investigation of native and cryopreserved adrenocytes: mitochondrial potential and hormone secretion. International workshop of the physiological society “Molecular physiology of membrane transport and cell excitability”; 2007 Sep 19-23; Yaremche, Ukraine; p. 22.

10. Дудецкая ГВ, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Гормонпродуцирующая активность клеток надпочечников новорожденных поросят, выделенных в градиенте плотности сахарозы. Експериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики, Шості Данилевські читання; 2007 лют. 22-23; Харків; с. 40.

11. Dudetska GV, Ustichenko VD, Yurchuk TA, Alabedalkarim NM, Bondarenko TP. Rehydrated Adrenocorticocytes as a Model of Cryopreserved Steroido–Producing Cells Cell Preservation Teshnology. 2008; 6(1): 99.

12. Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Боровой ИА, Пахомов АВ, Билявская СБ, Дудецкая ГВ, Легач ЕИ. Культивирование и трансплантация клеток эндокринных желез, меченных флуоресцентным полиметиновым красителем, на коллагеновом матриксе. Матеріали Всеросійської конференції з міжнародною участю ”Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток”; 2008 черв. 18-20; Самара; с.148-150.

13. Дудецкая ГВ, Алабедаькарим НМ. Характеристика популяций адренокортикоцитов новорожденных поросят, выделенных в градиенте фикола. Матеріали I міжнародної наукової конференції “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології”; 2009 лют. 23-26; Донецьк; с. 29.

14. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Влияние факторов криоконсервирования на сохранность клеток надпочечников крыс. Холод в биологии и медицине – 2010: мат. 34-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 27-28 мая 2010 г.). Проблемы криобиологии. 2010; 20(2): 193.

15. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД, Бондаренко ТП. Влияние температуры инкубации и растворов, содержащих различные концентрации диметилсульфоксида, на жизнеспособность клеток надпочечников крыс. Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті. Проблемні питання”; 2010 жовт. 28-29; Харків; с. 36-37.

16. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД. Сохранность клеток надпочечников крыс после криоконсервирования в средах различного композиционного состава. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології”; 2011 3-4 берез. Харків; с. 43.

17. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Подбор условий культивирования клеток надпочечников взрослых крыс. Холод в биологии и медицине. Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии – 2011: мат. 35-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 27-28 мая 2011 г.). Проблемы криобиологии. 2011; 21(2): 216.

18. Бондаренко ТП, Легач ЕИ, Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Устиченко ВД, Билявская СБ, Пахомов АВ, Дудецкая ГВ, Сидоренко ОС. Получение криоконсервированных культур клеток и тканей эндокринных желез для лечения гормональной недостаточности методом трансплантации. IV щорічна науково-практична конференція з міжнародною участю «Новое в практической криомедицине» 2010 листоп. 9 Москва, с. 20–21.

19. Дудецкая ГВ, Ден Бо, Алабедаькарим НМ. Разделение различных субпопуляций клеток надпочечников крысы в градиенте сахарозы. Матеріали ІХ українського біохімічного з'їзду, 2006 жовтня 24-27 Харків, Т. 2, с.183.

20. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Оценка функциональной активности клеток надпочечников с помощью флуоресцентных красителей. Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті”, 2011 жовт. 27-28 Харків, с. 31-32.

21. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Диференціальна чутливість клітин кіркової і мозкової речовини наднирників щурів при кріоконсервуванні з різними швидкостями охолодження Матріали Міжнародної науково-практичної конференції «Modern methods, innovations and operational experience in the field of psychology and pedagogics», 2017 груд. 27-28; Люблін, с.199–201.

22. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Вплив кріоконсервування на збереження альдостеронпродукуючих клітин наднирників Науково-практична конференція «Медична наука та практика: виклики і сьогодення», 2018 серп. 24-25; Львів, с. 84–7.

23. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Підбір умов культивування кріоконсервованих клітин кори надниркових залоз щурів. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології», Вісімнадцяті Данилевські читання; 2019 28 лют-1 бер; Харків, с. 37.

24. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Вплив розчинів диметилсульфоксиду і температури інкубації на функціональну активність окремих популяцій клітин наднирників щурів. Холод у біології і медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології: мат. 44-ї щорічн. конф. молодих учених Харків; 2020; 30(3): 287. Scopus.

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	18
ВСТУП	19
Розділ 1. Огляд літератури	26
1.1. Морфофункціональні особливості надниркових залоз	26
1.2. Регуляція гормонопродукуючої активності надниркових залоз	28
1.3. Культивування суспензії клітин надниркових залоз і окремих її популяцій	34
1.4. Клітини і тканини надниркових залоз як об'єкти кріоконсервування	36
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи дослідження	43
2.1. Отримання ЗСК надниркових залоз	43
2.2. Розподіл ЗСК в градієнті щільності фіколу	43
2.3. Отримання суспензій ККР і КМР	44
2.4. Визначення кількості клітин	44
2.5. Визначення життєздатності клітин шляхом фарбування трипановим синім	44
2.6. Визначення життєздатності клітин методом флуоресцентної мікроскопії	45
2.7. Визначення кількості ядровмісних і без'ядерних клітин методом проточної цитофлуориметрії	46
2.8. Колориметричний метод визначення метаболічної	47

активності клітин (МТТ-тест)	
2.9. Визначення в клітинах ліпідних включень методом флуоресцентної мікроскопії	47
2.10. Оцінка активності ферменту 3β -гідроксистероїддегідрогенази (3β -ГСД)	48
2.11. Імуноцитохімічне дослідження визначення експресії TER-119	48
2.12. Умови додавання і видалення кріопротектору ДМСО	49
2.13. Кріоконсервування клітин	49
2.14. Вимірювання секреції альдостерону	49
2.15. Визначення коефіцієнтів проникності мембран ККР і КМР для молекул ДМСО і води	50
2.16. Гістохімічний метод виявлення гранул амінів	52
2.17. Оцінка функціональної активності мітохондрій за допомогою флуоресцентної мікроскопії	53
2.18. Приготування колагенової підложки	53
2.19. Культивування ЗСК	53
2.20. Визначення адгезивної здібності ЗСК	55
2.21. Забарвлення гематоксилином і еозином	55
2.22. Статистична обробка результативкових залоз	55
2.23. Реактиви	56
РОЗДІЛ 3. Розподіл та характеристика зонально диференційованих популяцій клітин, отриманих із ЗСК надниркових залоз	57

РОЗДІЛ 4. Вплив розчинів диметилсульфоксиду і температури інкубації на метаболічну активність та осмотичну поведінку клітин надниркових залоз	72
4.1. Вплив розчинів ДМСО і температури інкубації на кількість, життєздатність та метаболічну активність клітин надниркових залоз	72
4.2. Вплив розчинів ДМСО і температури інкубації на осмотичну поведінку клітин надниркових залоз	85
РОЗДІЛ 5. Вплив кріоконсервування у присутності різних концентрацій ДМСО і швидкостей охолодження на властивості ЗСК надниркових залоз і на окремі фракції клітин	95
5.1. Дослідження впливу швидкості охолодження на збереженість ЗСК, ККР, КМР, ФР1 і ФР3 клітин, виділених в градієнті щільності фіколу	95
5.2. Цитофлуориметричний і флуоресцентний аналіз впливу умов кріоконсервування на ЗСК надниркових залоз	103
5.3. Морфологічні характеристики первинної культури ЗСК наднирників до та після кріоконсервування в присутності 7% ДМСО	108
Узагальнення	118
Висновки	130
Список використаних джерел	132
Додаток А	
Додаток Б	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

3 β -ГСД – 3 β – гідроксістероїддегідрогеназа

DMEM/F12 (англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) – середовище Ігла у модифікації Дюльбекко з додаванням поживної суміші Ham's F-12

TER-119 – Антитіла R- Phycoerythrin (R-PE)-Conjugated Rat Anti-Mouse TER-119/Erythroid Cells (Ly-76) Monoclonal Antibody

IC-1 – (5,5',6,6' -тетрахлор-1,1',3,3' -тетраетилбензимидазолілкарбоціаніну йодид)

L_p – коефіцієнт проникності для води

АКТГ – адренкортикотропний гормон

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

E_a – енергія активації

ЕТС – ембріональна теляча сироватка

ЗСК – загальна суспензія клітин

ККР – клітини коркової речовини

КМР – клітини мозкової речовини

K_p – коефіцієнт розподілу в системі «октанол-вода»

МТТ – реактив – (3 - [4,5 - діметілтiazол-2-іл] -2,5 - діфенілтетразоліум бромід

НЧ – нільський червоний

ПЙ – пропідіум йодид

ФДА – флуоресцеїндіацетат

ФР – фракція

ВСТУП

Актуальність теми. Дисфункція надниркових залоз залишається однією із актуальних проблем сучасної медицини. Традиційна гормонозамісна терапія, яка використовується при наднирковій недостатності, провокує численні негативні наслідки в результаті ініціації каскаду метаболічних порушень. Альтернативним способом корекції гормональної недостатності є трансплантація ендокринних тканин і клітин [1, 2, 3]. Також культури клітин надниркових залоз широко використовуються у багатьох галузях і є багатоцільовим засобом у фундаментальних дослідженнях, клінічній практиці, медичній діагностиці та фармацевтичній промисловості [4, 5].

Кріоконсервування є найбільш оптимальним способом довгострокового зберігання клітин та тканин біологічних об'єктів, в тому числі і для надниркових залоз. Для цього режими кріоконсервування повинні забезпечувати високі показники життєздатності та функціональної активності клітин. Існують протоколи кріоконсервування для надниркових залоз у вигляді кластерів хромафінних клітин [6], первинної культури клітин [7, 8], фрагментів [9, 10, 11], органотипових культур [12, 13, 14].

Однак, переважна кількість наукових даних щодо ефективності кріоконсервування надниркових залоз стосується збереження гормональної активності за рівнем глюкокортикоїдів. Щодо впливу кріоконсервування на мінералопродукуючу функцію клітин наднирників інсують лише поодинокі дані [15, 16].

Секреція альдостерону клітинами клубочкової зони кори надниркових залоз контролюється циркулюючими факторами, включаючи ренін-ангіотензинову систему та калій [17, 18]. Виробництво мінералокортикоїдів також регулюється за допомогою аутокринного-паракринного механізму широким спектром біоактивних сигналів, що виділяються адренкортикальними та хромафінними клітинами [19, 20], нервовими закінченнями, клітинами імунної системи [21], ендотеліальними клітинами [22] та адипоцитами [23]. Їх фізіологічна роль у контролі секреції

альдостерону до кінця не з'ясована, але останні спостереження вказують на те, що аутокринні та паракринні процеси беруть участь у патофізіології альдостеронізму, надниркових гіперплазій та пухлин [17]. З цієї точки зору культура клітин, отримана з надниркових залоз, може бути використана як модельний об'єкт для досліджень взаєморегуляції між клітинами морфологічно та біохімічно різних зон надниркових залоз.

В зв'язку з цим виникає інтерес до вивчення впливу осмотичних факторів, кріопротекторів та різних швидкостей охолодження на морфофункціональні особливості зонально диференційованих клітин надниркових залоз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і медицини НАН України в рамках науково-дослідної теми «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (шифр 2.2.6.104, номер держреєстрації 0116U003494).

Мета дослідження – вивчення впливу складу кріозахисного середовища, що містить різні концентрації диметилсульфоксиду (ДМСО), температури насичення клітин ДМСО та різних швидкостей охолодження на морфофункціональні особливості загальної суспензії клітин, фракцій загальної суспензії клітин та клітин коркової і мозкової речовин наднирників.

Відповідно поставленої мети передбачалося вирішити такі задачі:

1. Відпрацювати метод розподілу загальної суспензії клітин наднирників у градієнті щільності фіколу та оцінити морфофункціональну належність отриманих фракцій до відповідних зон надниркових залоз.

2. Оцінити вплив температури насичення в кріозахисному середовищі, що містить різні концентрації ДМСО, на збереженість, життєздатність та функціональну активність загальної суспензії клітин, клітин коркової речовини, клітин мозкової речовини, а також фракцій клітин отриманих з загальної суспензії клітин.

3. Вивчити коефіцієнти проникності плазматичних мембран клітин коркової речовини і клітин мозкової речовини надниркових залоз для молекул води і ДМСО і їх температурні залежності в зоні температур 37 – 4 °С.

4. Оцінити вплив кріоконсервування з різними швидкостями охолодження на збереженість, життєздатність та функціональні властивості загальної суспензії клітин, клітин коркової речовини, клітин мозкової речовини, а також отриманих фракцій клітин.

5. Вивчити морфологічні особливості і гормональну активність первинної культури загальної суспензії клітин, і оцінити збереженість деяких клітинних популяцій після кріоконсервування.

Об'єкт дослідження – вплив умов кріоконсервування на морфофункціональні властивості загальної суспензії клітин, клітин коркової речовини, клітин мозкової речовини, фракцій клітин загальної суспензії клітин.

Предмет дослідження – загальна суспензія клітин, клітини коркової речовини, клітини мозкової речовини, фракції клітин загальної суспензії клітин до та після кріоконсервування.

Методи дослідження. В роботі використані наступні методи дослідження: метод ферментативної дезагрегації наднирників, метод кріоконсервування з різними швидкостями охолодження, культивування клітин, світлова та флуоресцентна мікроскопія, гістохімічний метод, радіоімунологічний метод, морфометричний аналіз, волюмометричний метод, метод проточної цитофлуориметрії, статистичний метод.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше проведений розподіл загальної суспензії клітин наднирників у градієнті щільності фіколу, який дозволив виділити фракції клітин, кожна з яких збагачена зоноспецифічним типом клітин, що підтверджувалось гістохімічними методами. Встановлено, що насичення в розчинах ДМСО при температурі 4 °С є найбільш сприятливим для загальної суспензії клітин і для суспензії клітин кори надниркових залоз. Вперше були визначені коефіцієнти

проникності мембран клітин коркової і мозкової речовини надниркових залоз для молекул води і ДМСО. Визначені значення енергій активації процесів переносу цих речовин крізь мембрани клітин. Вперше була зроблена спроба зв'язати збереженість загальної суспензії клітин після кріоконсервування в розчинах ДМСО з різними швидкостями охолодження зі значеннями коефіцієнтів проникності клітинних мембран. Встановлено, що низькі швидкості охолодження (1, 5, 10 °C/хв) дозволяють зберегти найбільшу кількість загальної суспензії клітин і клітин коркової речовини. Вперше встановлено, що кріоконсервування загальної суспензії клітин зі швидкістю охолодження 10 °C/хв в присутності 7 % ДМСО (насичення при 4 °C) забезпечувало максимальну кількість збережених стероїдпродукуючих клітин, які після відігріву зберігали морфологічні та функціональні властивості, подібні нативній культурі клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Визначення умов насичення зонально диференційованих клітин надниркових залоз кріопротектором ДМСО дозволять в подальшому скоротити час для розробки оптимальних способів кріоконсервування певної популяції клітин. Отримані в роботі значення коефіцієнтів проникності мембран клітин коркової і мозкової речовин для води і кріопротектору і їх температурні залежності можуть бути використані при розробці нових і вдосконалення існуючих режимів кріоконсервування. Вперше встановлено, що режим кріоконсервування, який включає 2 етапи охолодження (I етап – зі швидкістю 10 °C/хв до -40 °C; II етап – занурення у рідкий азот) та використання кріозахисного середовища на основі 7 % ДМСО, є прийнятним для кріоконсервування загальної суспензії клітин. Отримані нові дані про чутливість загальної суспензії клітин до дії низьких температур, можуть бути використані для курсів лекцій і практичних занять студентів навчальних закладів біологічного профілю.

Особистий внесок здобувача. Автором роботи самостійно проведено аналіз літературних даних, отримано результати експериментальних досліджень з визначення морфофункціональних характеристик загальної

суспензії клітин наднирників, впливу умов кріоконсервування на ці показники, проведена статистична обробка даних. Автором спільно з д.б.н. Гуріною Т.М. проведені експерименти щодо впливу швидкості охолодження при кріоконсервуванні загальної суспензії клітин. Здобувачем спільно з к.б.н. Ковалено І.Ф. проведені дослідження з використанням методу флуоресцентної мікроскопії і морфометрії. Автором спільно з Зубовим П.М. проведені цитофлюориметричні дослідження загальної суспензії клітин. Роботи, які мають відношення до теми дисертації, опубліковані у співавторстві з науковим керівником д.б.н., проф. Бондаренко Т.П. і співробітниками відділу кріоендокринології ІПКіК НАН України, і відображають результати спільних експериментів.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

– у роботах [24, 25, 26, 27, 28] – у плануванні експериментів, отриманні загальної суспензії клітин, клітин коркової речовини, клітин мозкової речовини, розподілі загальної суспензії клітин в градієнті щільності фіколу;

– у роботах [29, 30, 31, 32] – у вивчанні впливу складу кріозахисного середовища і швидкостей охолодження на збереженість, життєздатність, функціональну активність клітин надниркових залоз, збереження популяційного складу загальної суспензії клітин до та після кріоконсервування;

– у роботах [33, 34, 35, 36, 37] – у вивчанні впливу швидкості охолодження на збереження зонально-диференційованих популяцій клітин надниркових залоз до та після кріоконсервування;

– у роботах [38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45] – в отриманні суспензії клітин наднирників, оцінці життєздатності клітин до та після кріоконсервування, проведенні гістохімічного аналізу, в проведенні культивування клітин надниркових залоз, аналізі мікрофотографій, отриманих за допомогою флуоресцентного мікроскопу, аналізі отриманих даних, підготовці матеріалів до друку;

– у роботах [46, 47] – в отриманні суспензії клітин наднирників, оцінці життєздатності клітин, аналізі мікрофотографій, визначенні коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин коркової речовини і клітин мозкової речовини наднирникових залоз для молекул води і ДМСО і визначенні їх температурних залежностей в зоні температур 37–4 °С, підготовці матеріалів до друку.

Апробація роботи. Результати даної роботи були представлені на наступних конференціях: конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині» (Харків, Україна, 2005, 2006, 2007, 2008, 2010, 2011, 2018, 2019, 2020 роки); Міжнародній конференції «Molecular physiology of membrane transport and cell excitability» (Яремче, Україна, 2007), І міжнародній науковій конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, Україна, 2009). Результати роботи були представлені на заочних заходах: Всеукраїнській конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми відновлювальної хірургії» (Київ, 2001), І з'їзді фізіологів СНД «Москва-здоров'я» (Сочі, Росія, 2005), ІХ українському біохімічному з'їзді (Київ, Україна, 2006), Симпозіумі «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва, Росія, 2007), Міжнародному симпозіумі «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва, Росія, 2007), Шостих Данилевських читаннях «Експериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики» (Харків, Україна, 2007), Всеросійській конференції з міжнародною участю «Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток» (Самара, Росія, 2008), Всеросійський з'їзд трансплантологів пам'яті академіка В.І. Шумакова (Москва, Росія, 2008), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті. Проблемні питання» (Харків, Україна, 2010), ІV щорічній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Новое в практической криомедицине» (Москва, Росія, 2010), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології»

(Харків, Україна, 2011), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті» (Харків, Україна, 2011), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, Україна, 2016), Міжнародній науково-практичній конференції «Modern methods, innovations and operational experience in the field of psychology and pedagogics» (Люблін, Польща 2017), Науково-практичній конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» (Львів, Україна, 2018), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Харків, Україна, 2019).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 24 роботи, серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях (1 з них цитується у міжнародній базі Scopus) та 4 статті у інших наукових виданнях, 19 тез доповідей міжнародних і національних наукових конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 169 сторінках друкованого тексту містить наступні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, 3 розділи результатів власних досліджень, узагальнення, висновки, список літератури. Список літератури включає 278 джерел. Робота проілюстрована 43 рисунками, 7 мікрофотографіями і 7 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Морфофункціональні особливості надниркових залоз

Надниркові залози ссавців складаються з двох структур – коркової і мозкової речовини, які відрізняються як за морфофункціональними характеристиками, так і за ембріональним походженням. Коркова речовина, що продукує стероїди, має мезодермальне походження, а мозкова речовина належить до похідних нервового гребеня і є джерелом катехоламінів [48]. Коркову речовину надниркових залоз в свою чергу розділяють на три концентричні зони: клубочкову, пучкову і сітчасту [49].

Клубочкова зона складається зі щільно упакованих клітин з порівняно невеликою цитоплазмою, які розташовані в дискретних клітинних кластерах – клубочках, оточених білками базальної мембрани і капілярною мережею, що тягнеться від капсули. Пучкова зона, складається з клітин з рясною цитоплазмою, що містить численні ліпідні краплі. Сітчаста зона, розташована поруч з мозковою речовиною, складається з клітин меншого, ніж у пучкової зони розміру, розташованих у вигляді мережі [50].

Мозкова речовина знаходиться в центрі надниркової залози, оточена корковою речовиною, містить великі секреторні клітини округлої форми. Найважливішим структурно-функціональним елементом хромафінних клітин є секреторні гранули (везикули). Гранули мають властивість змінювати колір при обробці солями хрому, тому клітини називаються хромафінними. У дорослих ссавців існує 3 типи клітин в мозковій речовині: адреналіновмісні (66 – 75%), норадреналіновмісні (25 – 33%) і невеликі грануловмісні клітини [51].

Окрім хромафінних клітин, в мозковій речовині розташовані також гангліозні та підтримуючі клітини. Гангліозні клітини містяться в меншій кількості та представляють собою вегетативні нейрони. Підтримуючі клітини мають гліальне походження та характеризуються наявністю відростків [52, 53]. Деякі з них утворюють променеподібні структури, що тягнуться від

мозкової речовини надниркових залоз через всю коркову речовину. Інші утворюють невеликі островці або просто розсіюються в пучковій та сітчастій зоні, повністю оточені стероїдпродукуючими клітинами. У клубочковій зоні хромафінні клітини часто розповсюджуються до капсули, утворюючи субкапсулярні гнізда клітин [54].

Зональна диференціація та сталість клітинного складу наднирників підтримується пулами стовбурових клітин і клітин-попередників. Вони забезпечують підтримку фізіологічних і гомеостатичних вимог залози [55, 56, 57]. Крім того, важливими детермінантами анатомічної і функціональної зональності наднирників є паракринні взаємодії між клітинами мозкової речовини та різних шарів кори наднирників [58]. Капсула складається з тонких шарів SF1-негативних мезенхімальних клітин, які різняться за своїм походженням [59]. Субкапсулярна зовнішня кора також є місцем розташування адренокортикальних попередників, які залучаються у відповідь на ендокринні та паракринні чинники. Субкапсулярні та кортикальні популяції клітин-попередників утворюють реципрокні сигнальні мережі, здатні координувати відновлення і диференціювання кортикальних клітин у відповідь на паракринну і ендокринну передачу сигналів, тим самим підтримуючи гомеостаз кори надниркових залоз [22, 50, 60, 61]. Вважається, що нащадки периферичних адренокортикальних стовбурових клітин і клітин-попередників диференціюються та мігрують у напрямку центра залози, започатковуючи клітини клубочкової (CYP11B2) та пучкової (CYP11B1) зони, та піддаються апоптозу на межі з адреномедулярними клітинами [62-64].

В організмі людини основним глюкокортикоїдним гормоном є кортизол. У мишей і щурів відсутність фермента 17 α -гідроксилази призводить до неможливості синтезу кортизолу, тому основним глюкокортикоїдним гормоном надниркових залоз цих тварин є кортикостерон [48, 60].

Головною функцією клітин кори надниркових залоз є синтез і секреція стероїдних гормонів. Стероїдні гормони поділяються на три групи: мінералокортикоїди (альдостерон та ін.), які синтезуються в клубочковій зоні;

глюкокортикоїди (кортизол, кортикостерон, 11-дезоксикортизол, 11-дезоксикортикостерон), які синтезуються пучковою і сітчастою зонами; андрогени (дегідроепіандростерон, андростендіон), які синтезуються сітчастою зоною [48].

Глюкокортикоїдні гормони впливають на вуглеводний, білковий і жировий обміни [65], грають важливу роль в адаптації до хронічного стресу; стимулюють експресію ферментів глюконеогенезу; збільшують рівень вмісту глікогену в печінці і м'язах; підвищують рівень глюкози в крові; мають протизапальні та імуносупресивні властивості; впливають на розвиток плоду і формування гонад, об'єм циркулюючої крові [66, 67]. Кортикостерон також може зв'язуватися з рецепторами мінералокортикоїдів а, отже, надавати додаткові мінералокортикоїдні функції [68]. Мінералокортикоїдні гормони є важливими регуляторами водно-електролітного і кислотно-лужного балансів, контролюють рівень артеріального тиску, посилюють запалення і реакції імунної системи [17, 69].

1.2. Регуляція гормонопродукуючої активності надниркових залоз

Біосинтез стероїдних гормонів у корі наднирників регулюється декількома механізмами: транскрипційним, посттрансляційним і транспортом субстрату [70]. Стероїдні гормони синтезуються в корі надниркових залоз із холестерину в процесі низки реакцій, які каталізуються ферментами суперсімейства цитохрому P450 та 3β - гідроксистероїддегідрогеназою типу 2 (HSD3B2) [71]. Перша ферментативна реакція відбувається в мітохондріях, де фермент P450_{scs} (CYP11A1) перетворює холестерин в прегненолон. Після утворення прегненолону він потрапляє в ендоплазматичний ретикулум, де може гідроксилуватися за допомогою фермента P450_{c17 α} (CYP17A1) з утворенням 17-гідроксипрегненолону або перетворюватися в прогестерон за допомогою фермента HSD3B2. CYP17A1 каталізує утворення 17-гідроксипрогестерону [72-75]. Фермент 17,20 ліаза каталізує утворення андрогенів надниркових залоз: дегідроепіандростерону та андростендіону.

Кінцеві реакції біосинтезу стероїдних гормонів відбуваються в мітохондріях, де 11-дезоксикортизол та дезоксикортикостерон перетворюються в кортизол та кортикостерон відповідно за допомогою фермента 11 β -гідроксилази (CYP11B1). Експресія фермента альдостеронсинтази (CYP11B2) в клубочковій зоні дозволяє перетворити кортикостерон в альдостерон [76].

Існує два типи регулювання стероїдогенезу: короткострокове та тривале. Короткострокове регулювання характеризується швидкою мобілізацією холестерину з ліпідних крапель і прискореною доставкою в мітохондрії до цитохрому P450_{scc} з наступним швидким синтезом нових стероїдів. Тривале регулювання стероїдогенезу відбувається на рівні транскрипції/трансляції генів, що кодують стероїдогенні ферменти (3 β HSD, P450_{c21}, P450_{c11A}, P450_{c11B1}, P450_{cB2}) [22, 77].

Головними регуляторами продукції альдостерону в клітинах клубочкової зони кори є система ренін-ангіотензин, калій, натрій, АКТГ і нейрональні механізми [78]. Позаклітинний калій є потужним регулятором синтезу альдостерону, він підтримує клітини адренокортикоцитів у гіперполяризованих умовах. Двопорові доменні канали TASK-1 і TASK-2 в нормі експресуються в корі надниркових залоз людини і генерують фонові потоки калію, пригнічуючи продукцію альдостерону. Інгібування каналів TASK за допомогою ангіотензину II призводило до їх деполяризації, і як було показано на мишах з делеціями TASK-1, TASK-2 призводило до гіперальдостеронізму [79-81].

Крім цього, комплексний контроль функції кори надниркових залоз включає пряму іннервацію, регуляцію кровопостачання залози і міжклітинні взаємодії [20, 82, 83]. Міжклітинний зв'язок через щілинні контакти грає важливу роль в регуляції величезної кількості нормальних і патологічних клітинних процесів, включаючи процеси розвитку, диференціювання і функціонування багатьох клітин організму. Щілинні контакти являють собою мембранні канали, що складаються з білків, які називають коннексинами [84, 85]. Коннексини – це сімейство інтегральних мембранних білків, які

утворюють міжклітинні канали, що дозволяють клітинам безпосередньо обмінюватися іонами і невеликими молекулами. Канали щілинних контактів зазвичай утворюються між клітинами одного і того ж типу, але вони також можуть утворюватися між клітинами різних типів [86, 87].

Існування міжклітинних щілинних контактів в надниркових залозах було встановлено за допомогою застосування інгібітора міжклітинних контактів, що істотно знижувало чутливість клітин надниркових залоз до низьких концентрацій АКТГ [88]. Також відомо, що порушення тропної регуляції наднирників за допомогою гіпофізектомії призводить до зменшення числа щілинних контактів [89].

Для хромафінних клітин наднирників показано, що міжклітинні контакти опосередковують додатковий маршрут, по якому біологічні сигнали (електрична активність, зміни внутрішньоклітинного Ca^{2+}) поширюються між сусідніми клітинами і викликають подальший катехоламіновий екзоцитоз [90-92].

У роботах Mugaу SA [93-96] було продемонстровано зворотню залежність між наявністю щілинних контактів і швидкістю проліферації в зонах наднирників. Найбільшу кількість білка коннексина було виявлено у внутрішніх кортикальних зонах, що більш повільно діляться (пучкова і сітчаста зона) [94]. Навпаки, клітини зовнішньої кортикальної зони (клубочкова), що діляться з більш високою швидкістю мали відносно мало щілинних контактів [96]. Крім того, при культивуванні клітин пучкової і сітчастої зон обробка АКТГ приводила до збільшення експресії білка щілинного контакту і відповідного зниження проліферації [94]. За допомогою методів заморожування-сколювання було продемонстровано, що кількість, розмір і частота розташування щілинних контактів була найбільшою на межі коркової та мозкової речовини наднирника. Це може вказувати на те, що міграція клітин клубочкової зони до більш глибоких шарів кори наднирника може бути полегшена відсутністю щілинних контактів між клітинами в даній зоні [94].

Елементи цитоскелету також грають важливу роль в регуляції синтезу і секреції гормонів. Ліпідні краплі і мітохондрії з'єднані між собою проміжними нитками. Ці структури не є скоротливими, тому наявність інших елементів цитоскелету, таких як актинові філаменти, необхідна. Відомо, що проміжні філаменти перехресно пов'язані з нитками актину. Актинові мікрофіламенти скорочуючись, беруть участь в транспорті холестерину. Порушення цілісності проміжних ниток, викликане процесами скорочення, є першим кроком на шляху до стероїдогенезу, тобто відбувається передача холестерину до мітохондрії. У цитоскелеті клітин надниркових залоз були виявлені чотири ферменти протеїнкінази, а саме, Ca^{2+} /кальмодулін-залежна кіназа, протеїнкіназа (Ca^{2+} /фосфоліпід-залежна), міозинкіназа і цАМФ-залежна протеїнкіназа А. Ca^{2+} /кальмодулін-залежна кіназа в умовах фосфорилування ланцюгів віментину і міозину сприяє транспорту холестерину в мітохондрії. Фосфорилування викликає порушення структури віментину в проміжних філаментах, що сприяє стисненню кільця актоміозину. Протеїнкінази С активуються АКТГ і цАМФ і змінюють структуру ниток віментину, що викликає округлення клітин. Однак цей процес не супроводжується збільшенням синтезу стероїдів. Протеїнкіназа А також призводить до збільшення транспорту холестерину і, отже, до стимуляції синтезу стероїдів. Процес фосфорилування змінює морфологію і функції цитоскелету, а це, в свою чергу, пов'язано з прискоренням транспорту холестерину [97, 98, 99].

Важливе значення для гормонопродуруючої активності надниркової залози має також зовнішнє оточення, а саме жировою тканиною. Адипоцити представлено ізольовано або у вигляді невеликих острівців [23, 100]. Подібно клітинам імунної системи, адипоцити виділяють широкий спектр цитокінів, що дозволяє припустити, що вони можуть впливати на функцію кори надниркових залоз через процес міжклітинної комунікації. Наприклад, було показано, що адипоцити активують секрецію альдостерону шляхом секреції розчинних біоактивних факторів [101-105]. І навпаки, лептин інгібує АКТГ-

індуковану секрецію кортикостероїдів в клітинах кори надниркових залоз, не впливаючи на їх життєздатність і проліферацію [106, 107].

На сьогодні існує достатньо літературних даних про двоспрямовану взаємодію між клітинами коркової і мозкової речовини [108-111]. Близька локалізація визначає можливість забезпечення як прямих міжклітинних контактів, так і паракринної взаємодії між адренкортикальними і хромафінними клітинами, що відбувається за участю таких біологічно активних речовин, як стероїдні гормони, цитокіни, нейромедіатори і нейропептиди [112-114]. Адренкортикальні стероїди впливають на диференціацію клітин-попередників норадреналін-продукуючих клітин мозкової речовини, у напрямку адреномедулярних хромафінних клітин, що продукують адреналін. Крім того, стероїди також спрямовують розвиток фенотипів хромафінних клітин надниркових залоз [115].

В свою чергу основні секреторні продукти хромафінних клітин, адреналін та норадреналін, стимулюють адренкортикальну функцію ссавців *in situ* у перфузованих надниркових залозах [116] та в адренкортикальних клітинах первинної культури *in vitro* [117] шляхом посилення транскрипційної активності декількох стероїдогенних ферментів [118].

In vitro було показано, що адренкортикальні клітини в спільній культурі з хромафінними клітинами продукують в десять разів більше гормонів, ніж така ж кількість клітин при окремому культивуванні [119]. У спільній культурі клітин була виявлена підвищена експресія мРНК ферменту цитохрому P450 і StAR, в той час як в ізольованих клітинах експресія була значно нижчою [22]. Було показано підвищення рівню секреції кортикостерону, за рахунок контакту плазматичних мембран обох видів клітин. Це приводило до зміщення ліпідних крапель до мітохондрій, лізосом і гладкого ендоплазматичного ретикулуму, що було свідомством посилення стероїдогенезу [120].

Значний внесок у регуляцію стероїдогенезу в надниркових залозах вносять також нейро-імуно-ендокринні взаємодії. Сітчаста і пучкова зони

наднирників є основними джерелами цитокінів. Цитокіни надають перехресний вплив на взаємозв'язок імунної системи і гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі [121]. Інтерлейкіни IL-1, IL-2, IL-3, IL-1 α , IL-1 β і фактор некрозу пухлини (TNF- α) стимулюють секрецію кортикостероїдів та інгібують ангіотензин II-індуковану секрецію гормонів [122]. IL-6 регулює синтез андрогенів, глюко- і мінералокортикоїдів *in vitro* [123]. Трансформуючий ростовий фактор-бета (TGF- β) впливає на гормонсекретуючу функцію клітин і їх проліферативну активність [124].

Очевидно, окремі зони не автономні в продукції гормонів, специфічних для кожної окремої зони. Це особливо стосується клітин клубочкової зони, які не володіють повним набором ферментів, необхідних для біосинтезу альдостерону. Існують дані про те, що для синтезу і секреції альдостерону в надниркових залозах щурів необхідно принаймні два типи клітин [125]. Доказом цього є насамперед те, що у щурів ефективна продукція альдостерону *in vitro* відбувається у випадку інтактної залози, а у випадку ферментативно диспергованих клітин секреція альдостерону поступово зменшуються, в той час як секреція кортикостерону залишається незмінною [126, 127], або збільшується [128]. Стає все більш очевидним, що надниркові залози являють собою багатогранну систему, в якій ендокринні, аутокринні і паракринні фактори збігаються для досягнення різноманітних фізіологічних потреб. Для детального дослідження сигнальних регуляторних шляхів, що контролюють долю стовбурових клітин і клітин-попередників, особливостей міжклітинної взаємодії в надниркових залозах широко використовується метод клітинного культивування.

1.3. Культивування суспензії клітин надниркових залоз і окремих її популяцій

Культура клітин наднирників у вигляді загальної суспензії або окремих її популяцій використовується в якості об'єкту дослідження в різних галузях біології і медицини. Враховуючи взаємні впливи, які чинять клітини різних шарів наднирників на прояви їх фенотипових рис та функціональні характеристики, описані в попередньому розділі, стає зрозумілою актуальність кількісної і якісної оцінки клітин наднирників при культивуванні загальної суспензії або окремих клітинних популяцій.

Клітинний скринінг (ідентифікація клітин з певними властивостями) на сьогодні все частіше використовується в наукових і медичних дослідженнях. Можливість сортувати клітини в окремі популяції дозволяє вивчати певні типи клітин, виділені з гетерогенної популяції, з мінімальною або взагалі відсутньою домішкою інших типів клітин. Ця технологія лежить в основі багатьох досягнень в клітинній біології та сприяє подальшим дослідженням в таких різноманітних галузях, як регенеративна медицина, терапія раку, патогенез ВІЛ [129-131].

В даний час для поділу клітин доступні різні методи, починаючи від неафінних методів, таких як центрифугування в градієнті щільності, діелектрофорез і фільтрація, до методів афінності, таких як хроматографія, двофазний поділ і магнітне/флуоресцентне сортування клітин. Мета дослідника визначає найбільш оптимальний метод, оскільки кожен метод пропонує різний баланс між виходом, чистотою та біологічною активністю клітинного продукту. Крім того, час і вартість – це два ключових моменти, які теж необхідно враховувати [132, 133]. В даний час центрифугування є найбільш поширеним і доступним методом поділу та виділення клітин і субклітинних часток. Цей метод може бути використаний для широкого спектра досліджень [134].

Вимоги, які надаються до градієнтів щільності, це низький осмотичний тиск, непроникність крізь мембрану клітини, нетоксичність. Ще однією

умовою центрифугування є необхідність створення по всьому градієнту умов, які однаково добре переносяться усіма клітинами присутніми в гетерогенній суспензії. В іншому випадку можлива втрата клітинами біологічної активності.

Для виділення окремих популяцій клітин шляхом центрифугування створюють градієнт щільності з таких речовин як перкол, цукроза, бичачий сироватковий альбумін, метрізамід, фікол та інші [135-139].

В роботі [140] представлено метод виділення хромафінних гранул з клітин мозкової речовини з надниркових залоз морської свинки ізопікнічним центрифугуванням в градієнті метрізаміду. Більше 90 % клітин в препараті були життєздатні (за трипановим синім). В роботі [141] за допомогою центрифугування в градієнті щільності перколу були виділені препарати клітин клубочкової зони наднирників щурів, які зберігали здатність до базального стероїдогенезу.

В роботі [142] була показана здатність клітин клубочкової зони до морфологічних змін в первинній культурі, проте в них зберігалася здібність до секреції гормонів. В іншій роботі [143] було показано, що тільки при культивуванні загальної суспензії клітин, яка містила стромальні, ендотеліальні клітини і клітини паренхіми, забезпечувалося мікрооточення, яке приводило до отримання клітин з властивостями стовбурових.

В роботі Сидоренко О.С. [7, 144]. було зазначено, що при культивуванні загальної суспензії клітин з надниркових залоз новонароджених поросят клітини мали високу проліферативну активність, формували моношар. При подальшому пересіві клітин з них мігрували клітини нейроноподібної морфології. Цей процес відбувався на фоні зниження концентрації кортизолу і не залежав від присутності фактора росту нервів в середовищі культивування [144].

В роботі [8] було проведено культивування клітин, які були кріоконсервовані в присутності 10 % ДМСО. Деконсервовані клітини мали здібності до диференціювання в нейробласто- і фібробластоподібні клітини.

В роботі Ушакової Е.М. [145] культивування клітин наднирників поросят дозволило виявити симпато-адреналові прогеніторні клітини, які були спроможні диференціюватися в нейробластоподібні клітини. При культивуванні клітин наднирників мишей в середовищах з додаванням або без додавання сироватки були отримані клітини різних морфологічних типів. Додавання сироватки сприяло отриманню клітин фібробластоподібної морфології, безсироваткове середовище дозволяло отримати клітини полігональної форми, які зростали повільно і з часом формували кластери. Було показано, що активно проліферуючі клітини, які формують моношар, не є стероїдпродукуючими. Вони пригнічують розвиток гормонпродукуючих клітин в культурі.

При культивуванні хромафінних клітин наднирників була показана низька їх спроможність до адгезії. Вони мали округлу, полігональну і веретеноподібну форми, містили гранули попередників амінів. Такі клітини в культурі не формували моношар і переважно скупчувались. Але при сумісному культивуванні з адренокортикальними клітинами вони формували тісні клітинні контакти [146].

Таким чином, метод культивування клітин наднирників *in vitro* широко використовується для вивчення як секреторної активності клітин, так і процесів їх формування і оновлення в надниркових залозах. При цьому дослідженні характеристики суттєво відрізняються в залежності від клітинного складу культури – являє вона собою загальну клітинну суспензію чи окремі її популяції.

1.4 Клітини і тканини надниркових залоз як об'єкти кріоконсервування

Першими об'єктами низькотемпературного консервування були цілі наднирники, фрагменти і зрізи, оскільки розвивалася ідея про те, що збереження нативної архітекtonіки залози після кріоконсервування є більш ефективним з точки зору збереження гормонпродукуючої активності [147 –

155]. Успішна спроба кріоконсервування цілих фетальних надниркових залоз щурів описана в роботі [156]. Наднирники охолоджували за трьохетапною програмою (1 °С/хв до -40 °С на першому етапі, 2 °С/хв до -80 °С на другому етапі, 5 °С/хв до -120 °С на третьому етапі і подальше занурення в рідкий азот -196 °С) у присутності 20 % ДМСО. Електронно-мікроскопічний аналіз показав відсутність значних порушень кріоконсервованої тканини. Трансплантати були здатні підтримувати рівень кортикостерону на 3-й місяць після алотрансплантації.

В ІПКіК НАН України проводились дослідження щодо кріоконсервування тканини наднирників бика, дорослих свиней і новонароджених поросят. При заморожуванні фрагментів наднирників бика в присутності кріопротектору 5 % ДМСО було відзначено, що після охолодження зі швидкістю 1-3 °С/хв та подальшого відігрівання зберігається стимульована активність мембрано-зв'язаного ферменту аденілатциклази. При збільшенні швидкості охолодження до 85-100 °С/хв і концентрації ДМСО до 10 % активність аденілатциклази зберігалася [157].

Було показано, що фрагменти наднирників новонароджених поросят є більш кріорезистентними в порівнянні з тканиною наднирників дорослих свиней і синтезують в 1,4 рази більше гормонів після заморожування-відігрівання та видалення кріопротектора [158]. Після кріоконсервування фрагментів наднирників новонароджених поросят за двоетапною програмою в присутності 5 % ДМСО синтез стероїдних гормонів зберігався на рівні 85 % від контрольних значень [159].

Також був розроблений повільний режим заморожування для органної культури надниркових залоз новонароджених поросят. Даний режим припускав двоетапне заморожування під захистом 5 % ДМСО зі швидкістю охолодження 1-3 °С/хв до -70,5 °С на першому етапі і подальше швидке охолодження до -196 °С на другому етапі [150], але згодом було встановлено, що режим швидкого заморожування зі швидкістю охолодження 85-100 °С/хв під захистом 10 % ДМСО дозволяє підвищити життєздатність і рівень

глюкокортикоїдної активності адренкортикальних клітин в органній культурі [160].

З точки зору оцінки збереження кріоконсервованого матеріалу дуже важливим є зберегти здатність кріоконсервованих ендокринних тканин і клітин відповідати збільшенням секреції гормонів на введення специфічних (синактен) і неспецифічних (фторид натрію, дібутирил цАМФ) стимуляторів стероїдогенезу. У зв'язку з цим у ряді досліджень вивчалось введення різних стимуляторів для оцінки функціональної активності кріоконсервованого матеріалу [161].

В роботах [162, 163] були проведені порівняльні дослідження ефективності гомогената гіпофіза і синактена на рівень 11-ОКС (11-оксикортикостероїдів) після інкубації зрізів адренкортикальної тканини в кріозахисних середовищах, що містять ДМСО і 1,2-ПД. Було встановлено, що обидва кріопротектори пригнічували стимулюючий ефект синактену і гіпофіза на продукцію 11-ОКС зрізами адренкортикальної тканини новонароджених поросят, а також тканинними і клітинними культурами кори надниркових залоз новонароджених і статевозрілих свиней. В роботі [157] було показано відсутність стимулюючого ефекту фториду натрію на активність ферменту аденілатциклази при низьких концентраціях кріопротектора (1 % ДМСО) і відновлення ефекту при підвищенні концентрації ДМСО до 10 %. Відсутність ефекту фториду натрію при екваляції з ДМСО супроводжувалося зниженням базальної активності аденілатциклази адренкортикальної тканини [164].

Вивчення впливу вище названих стимуляторів на кріоконсервований матеріал показало, що синактен мав більш високий стимулюючий вплив в порівнянні з екстрактами гіпофізу. Причому цей ефект був більш вираженим для адренкортикальної тканини новонароджених поросят у порівнянні з тканиною дорослих свиней [159]. В роботі [165] з метою вивчення стимульованої секреції кріоконсервованих фрагментів і органотипових культур надниркових залоз новонароджених поросят застосовували дібутіріл

цАМФ. Було відзначено збільшення внутрішньоклітинного вмісту кортизолу в зразках, кріоконсервованих з 10 % ДМСО [166].

Активізація базального стероїдогенезу кріоконсервованих органних культур новонароджених поросят була встановлена рядом авторів [155, 158, 163]. Так, був показаний більш високий рівень утилізації різних фракцій екзогенного і ендогенного холестерину консервованими органними культурами надниркових залоз новонароджених поросят [163]. Встановлено, що інкубація з кріопротектором ДМСО може впливати на рівень гормональної активності стероїдогенних клітин. Інкубація клітин у середовищі з 5 % ДМСО приводила до стимуляції базальної секреції кортизолу клітинами наднирників новонароджених поросят. У той же час більш високі концентрації ДМСО (7 та 10 %) не приводили до такого ефекту.

В роботах [166–169] було показано, що кріоконсервовані фрагменти і органні культури компенсували гормональні потреби організму реципієнта на 30–45 добу після трансплантації. В роботі [166] було встановлено, що найбільш високий рівень кортизолу, що поєднується з кращою збереженістю гістоструктури графтів, був досягнутий при трансплантації матеріалу, рекультивованого після кріоконсервування з високою швидкістю охолодження (100 °С/хв). Поряд з високим рівнем глюкокортикоїдів також була встановлена можливість компенсації мінералокортикоїдної недостатності реципієнтів. Фрагменти, кріоконсервовані зі швидкістю охолодження 1 і 100 °С/хв, а також фрагменти, які після кріоконсервування рекультивували в SIS при 26 °С забезпечували достовірне підвищення рівня альдостерону у адреналектомованих тварин [15].

Ефективність режиму кріоконсервування тканини ендокринних залоз визначається збереженням морфологічної структури і функціональної активності *in vitro*, а також здатністю відновлювати гормональний рівень після трансплантації у реципієнтів з ендокринною недостатністю. Трансплантація нативних і кріоконсервованих фрагментів наднирників приводила до значного

збільшення вмісту кортизолу в плазмі крові тварин-реципієнтів на 30-у добу після операції в порівнянні з адреналектомованими [13].

Крім ДМСО, який у вище наведених режимах охолодження заявлено як ефективний кріопротектор, були проведені спроби використання інших кріопротекторів. Так, в роботах [164, 168] була проведена порівняльна оцінка кріозахисної ефективності ДМСО і 1,2-ПД при заморожуванні адренокортикальної тканини і кори надниркових залоз. Було встановлено, що при використанні двохетапної програми (1 – 3 °С/хв до -70 °С і подальше занурення в рідкий азот) ефективна захисна дія 1,2-ПД досягалася при більш високих концентраціях у порівнянні з ДМСО (5 і 10 %).

Цілий ряд досліджень присвячених розробці режимів кріоконсервування суспензії клітин наднирників показав, що поодинокі клітини наднирників є більш чутливими до факторів кріоконсервування в порівнянні зі зрізами чи фрагментами.

Для кріоконсервування кластерів хромафінних клітин фетальних надниркових залоз успішно використовували 10 % ДМСО (але без зазначення режиму охолодження) [6]. При цьому, більше 90 % деконсервованих культивованих кластерів виявилися морфологічно неушкодженими. Вони забарвлювалися антитілами до тирозингідроксилази та мали функціональну відповідь на NGF. Це дало авторам можливість зробити висновок, що кріоконсервування клітин мозкової речовини наднирників у вигляді кластерів підвищує їх стійкість до факторів кріоконсервування.

У ряді робіт вивчалися умови кріоконсервування, які дозволяють зберегти здатність клітин надниркових залоз до проліферації при подальшому культивуванні [7, 8]. Так було встановлено, що клітини, отримані з фрагментів, кріоконсервованих зі швидкістю охолодження 1 °С/хв в присутності 5 – 10 % ДМСО, при культивуванні не розпластувалися і не утворювали моношар. У той час як зниження швидкості охолодження фрагментів до 0,5 °С/хв (в присутності 10 % ДМСО) дозволило отримати

популяцію клітин, які формують сфероїди і зберігають їх здатність до диференціювання в нейрональному напрямку [144].

Кріочутливість клітин наднирників різних тварин також має відрізнятися. Так, навіть на етапі еквілібрації з кріопротектором було встановлено, що 10–15 % розчин ДМСО сприяє різкому зниженню кількості клітин в суспензії [170, 171]. Було встановлено, що суспензія клітин з наднирників мишей та новонароджених свиней є досить стійкою до швидкості охолодження та може бути кріоконсервована зі швидкістю 40 °С/хв у присутності 10 % ДМСО. Причому було встановлено, що клітини наднирників дорослих мишей були менш чутливі до осмотичного впливу, ніж клітини наднирників новонароджених поросят [172]. У роботі [173] було встановлено, що даний ефект був пов'язаний з високою чутливістю клітин при переносі з гіпертонічного розчину в гіпотонічний. Так, для клітин надниркових залоз дорослих мишей було показано, що різке зниження кількості і життєздатності клітин в суспензії, відігрітих після кріоконсервування з різними режимами заморожування, відбувається саме після видалення кріопротектору і відновлення ізотонії.

Для суспензії клітин надниркових залоз новонароджених мишей було встановлено можливість кріоконсервування зі швидкістю 1 °С/хв до -40°С в присутності високих концентрацій ДМСО (15 і 20 %), проте не дозволяло зберегти стероїдогенну і проліферативну функцію клітин. В роботі [173] було показано, що в присутності 15 і 20 % ДМСО, з ЕТС і без неї для клітин наднирників мишей були характерні високі показники життєздатності та збереженості. Найвищі показники секреції альдостерону були в зразках, кріоконсервованих з 20 % ДМСО та 25 % ЕТС. Було встановлено, що додавання 25 % ЕТС хоча і надає позитивний ефект з точки зору збереження і життєздатності клітин, але не зберігається здібність до проліферації при подальшому культивуванні.

У той же час кріоконсервування первинної культури клітин надниркових залоз новонароджених поросят зі швидкістю охолодження 1 °С/хв в

середовищі, яке містило 10 % ДМСО і 10 % ЕТС дозволяло зберегти найкращий показник життєздатних клітин [7].

Як показує аналіз наукової літератури, численні фактори в процесі кріоконсервування впливають на збереження клітин і тканин надниркових залоз, а саме: час насичення з кріопротектором, зміна об'ємних і транспортних характеристик клітин, неоднаковий градієнт температур на периферії та у центрі фрагментів чи цілих залоз при охолодженні та інші. Суспензія клітин надниркових залоз є неоднорідною завдяки присутності значної кількості типів клітин – кортикоцити, хромафінні клітини, фібробласти, ендотеліоцити, клітини крові, шванівські клітини. У зв'язку з цим актуальним є вивчення впливу різних факторів кріоконсервування на збереження різних популяцій клітин надниркових залоз. В залежності від чутливості тієї чи іншої популяції клітин до певних факторів заморожування–відігрівання можливо створити передумови для розробки режиму кріоконсервування, ефективного для певної популяції клітин. Більш того, кріоконсервування може бути фактором, який селективно впливає на субпопуляційний склад суспензії клітин з надниркових залоз.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження були виконані на базі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) у відділі кріоендокринології. В роботі використовували нативну суспензію клітин надниркових залоз 4-х місячних мишей C57B1/6 вагою $25 \pm 2,7$ г (30 шт) та нативну і кріоконсервовану суспензію клітин надниркових залоз 4-х місячних щурів лінії Вістар вагою $200 \pm 25,34$ г (240 шт). Експерименти були проведені відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики [174], при дотриманні вимог Комітету з біоетики ІПКіК НАН України.

2.1. Отримання ЗСК надниркових залоз

Тварин декапітували під ефірним наркозом. Надниркові залози вилучали в стерильних умовах, поміщали в охолоджене середовище 199, яке містило 100 од/мл пеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину і 5 мкг/мл амфотерицину В. Подрібнені на фрагменти ($1-3 \text{ мм}^3$) надниркові залози поміщали в середовище 199, яке містило колагеназу типу V (1 мг/мл) і ДНКазу I (0,1 мг/мл) та інкубували на водяній ванні при температурі 37°C в 3 етапи: 30, 10, 10 хв. Після кожного етапу інкубації суспензію клітин збирали та додавали до неї 0,5 мл ЕТС. Отримані суспензії об'єднували і відмивали середовищем 199, яке містило 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Суспензію клітин фільтрували крізь нейлоновий фільтр з діаметром пор 100 мкм і знов відмивали середовищем 199, яке містило 0,2 % БСА.

2.2. Розподіл ЗСК в градієнті щільності фіколу

Розчини фіколу готували на середовищі 199 з додаванням 10 % ЕТС. Для отримання градієнту щільності фіколу використовували наступні розчини: 5 % ($1,017 \text{ г/см}^3$); 7 % ($1,025 \text{ г/см}^3$); 9 % ($1,033 \text{ г/см}^3$); 12,6 % ($1,045 \text{ г/см}^3$); 15 % ($1,058 \text{ г/см}^3$); 17 % ($1,066 \text{ г/см}^3$); 19 % ($1,076 \text{ г/см}^3$); 21 % ($1,084 \text{ г/см}^3$). Розчини

фіколу, у порядку зменшення щільності, нашаровували піпеткою у пластикову пробірку, утворюючи ступінчастий градієнт. Зверху на сформований градієнт нашаровували загальну суспензію клітин надниркових залоз. Центрифугування проводили при 900 g протягом 20 хв. У результаті центрифугування були отримані 8 фракцій клітин, які збирали, двічі відмивали середовищем 199 з додаванням 10 % ЕТС. Після розподілу фракції клітин характеризували на належність до відповідної популяції клітин наднирників.

2.3. Отримання суспензій ККР і КМР

Під бінокулярним мікроскопом цільну надниркову залозу розділяли на коркову і мозкову речовини за допомогою мікрохірургічного інструментарію. Суспензію клітин з кожного шару отримували ферментативним способом (див. 2.1.).

2.4. Визначення кількості клітин

Кількість клітин в суспензії підраховували в гемоцитометрі [175]. Збереженість кількості клітин після кріоконсервування визначали як загальну їх кількість після відігріву і видалення кріопротектору по відношенню до загальної кількості клітин до заморожування, виражену у відсотках.

2.5. Визначення життєздатності клітин шляхом фарбування трипановим синім

Відсоток життєздатних клітин визначали за допомогою суправітального забарвлення з використанням 0,4 %-го водного розчину трипанового синього. Принцип методу заснований на здібності проникнення барвника в клітини з ушкодженою мембраною, що реєструється за допомогою світлового мікроскопу. Життєздатність клітин розраховували як кількість незабарвлених клітин по відношенню до загальної їх кількості, виражену у відсотках. Кількість життєздатних клітин (ЖК) визначали за формулою:

$$\text{Ж/К} = \frac{\sum_{\text{незабарвл}}}{\sum_{\text{загал}}} \times 100 \%$$

де $\sum_{\text{незабарвл}}$ – кількість незабарвлених клітин, $\sum_{\text{загал}}$ – загальна кількість клітин. Підрахунок клітин здійснювали у гемоцитометрі згідно методики [176].

2.6. Визначення життєздатності клітин методом флуоресцентної мікроскопії

Оцінку життєздатності клітин проводили за методом [177]. Для визначення життєздатності суспензію клітин наднирників інкубували протягом 10 хв при 37 °С з 1 мкг/мл флуоресцеїндіацетату (ФДА). Після чого додавали пропідіум йодид (ПЙ), кінцева концентрація якого складала 2 мкг/мл, інкубували при 4 °С протягом 10 хв, та фіксували в 0,75 % розчині глютарового альдегіду протягом 30 хв в тих же умовах. Потім зразок двічі відмивали середовищем 199.

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 активність внутрішньоклітинних естераз, при забарвленні клітин ПЙ спостерігалась червона флуоресценція, що було ознакою їх нежиттєздатності. Включення ФДА і ПЙ одночасно, свідчило про життєздатність ядровмісних клітин. Підрахунок флуоресцюючих об'єктів і загальної кількості клітин дозволяв виявити наявність без'ядерних клітин.

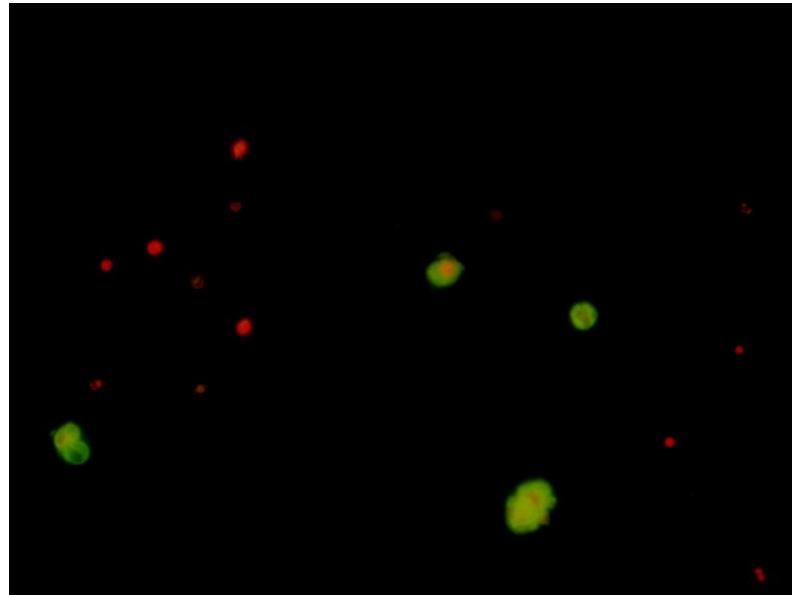


Рис. 2.1. Суспензія клітин наднирників щурів, забарвлених ФДА/ПІЙ. Збільшення x 200.

2.7. Визначення кількості ядровмісних клітин і без'ядерних клітин методом проточної цитофлуориметрії

Кількість ядровмісних і без'ядерних клітин в ЗСК визначали за забарвленням ФДА/ПІЙ (див. розділ 2.6). оцінювали на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD).

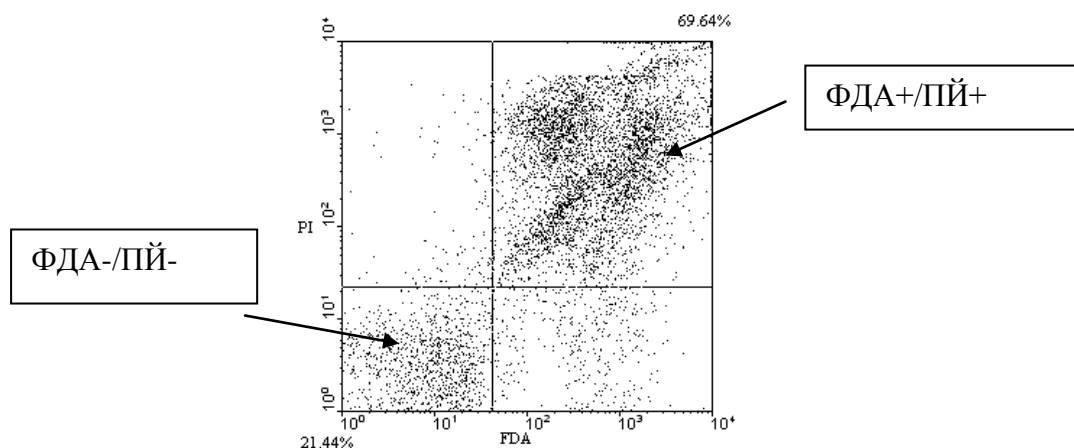


Рис. 2.2. Цитограма розподілу клітин наднирників щурів, забарвлених ФДА/ПІЙ.

Аналіз клітинної суспензії методом проточної цитофлуориметрії показав, що були наступні групи клітин: ФДА⁺/ПЙ⁺ – життєздатні ядровмісні клітини, ФДА⁻/ПЙ⁻ – без'ядерні клітини.

2.8. Колориметричний метод визначення метаболічної активності клітин (МТТ-тест)

Оцінку метаболічної активності клітин проводили за допомогою МТТ-тесту [178]. МТТ – це жовтий водорозчинний тетразолієвий барвник, який перетворюється під дією живих клітин в фіолетовий формазановий продукт, нерозчинний в водних розчинах. До суспензії клітин (0,5 мл) було додано реактив МТТ (5 мг/мл). Інкубація клітин з реактивом МТТ тривала 4 години при 37 °С, після чого клітини осаджували центрифугуванням (500 g) 3 хв. Після цього надосад відбирали і додавали до осаду клітин 0,5 мл ДМСО, ретельно змішували і інкубували ще 15 хв при кімнатній температурі. Оптичну щільність зразків вимірювали на фотоколориметрі КФК – 2 – УХЛ 4.2 при довжині хвилі 540 нм. Результати представлені в умовних одиницях абсорбції, які визначалися як різниця між рівнями абсорбції дослідної і холостої (без клітин) проб.

2.9. Визначення в клітинах ліпідних включень методом флуоресцентної мікроскопії

Для встановлення в клітинах ліпідних включень проводили забарвлення нільським червоним (НЧ) [179, 180]. Маточний розчин НЧ готували шляхом розчинення 1 мг барвника в 1 мл ДМСО. 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 (10⁶ кл/мл). Забарвлення проводили протягом 10 хв при 37 °С, 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⁺ 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.

2.10. Оцінка активності ферменту 3 β -гідроксистероїддегідрогенази (3 β -ГСД)

Активність ферменту 3 β -ГСД в суспензії клітин визначали за допомогою гістохімічного методу [181]. До 50 мкл клітинної суспензії додавали 200 мкл фарбуючого розчину (50 мМ PBS (рН 7,4), 0,2 мг/мл нітросиній тетразолій, 0,12 мг/мл дегідроепіандростерон, 1 мг/мл нікотинамидденіндинуклеотид. Клітини інкубували протягом 90 хв при 37 °С. Позитивно забарвлені клітини (3 β -ГСД⁺) мали фіолетовий колір. Їх підрахунок здійснювали в полі зору мікроскопу і виражали у відсотковому співвідношенні до загальної кількості клітин у зразку.

2.11. Імуноцитохімічне дослідження визначення експресії TER-119

Для виявлення кількості еритроцитів в суспензії клітин наднирників мишей було проведено фарбування моноклональними антитілами, кон'югованими з флуорохромом TER-119 (PE-conjugated, BD Biosciences Pharmingen). Зразки клітин фіксували в 4 % розчині параформальдегіду на PBS протягом 15 хв, після чого тричі відмивали PBS. Пермеабілізацію клітин проводили в 0,3 % розчині Triton X – 100 (Sigma) на PBS протягом 10 хв. Блокували неспецифічне зв'язування антитіл розчином PBS, що містило 0,1% Triton X – 100, 1 % БСА, 0,3 М гліцин протягом 1 години при кімнатній температурі. Антитіла готували на розчині PBS, що містило 0,1 % Triton X – 100, 1 % БСА. Розведення 1:1600. Інкубацію з антитілами проводили при 4 °С протягом 20 хв потім відмивали PBS 3 рази. В якості негативного контролю використовувалися зразки клітин, які пройшли всі етапи імуноцитохімічного фарбування за винятком інкубації з антитілами (контроль аутофлуоресценції). Зразки повторно відмивали і аналізували на

проточному цитофлуориметрі BD FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA) з використанням програмного забезпечення WinMDI Version 2.8.

2.12. Умови додавання і видалення кріопротектору ДМСО

Додавання і видалення кріозахисних середовищ проводили за методом [166]. До 0,5 мл суспензії клітин поступово додавали по 0,1 мл кріозахисного середовища, яке містило 10 % ЕТС. Кінцева концентрація ДМСО в зразках становила 5, 7, 10 %. Зразки інкубували при температурах 4, 22, 37 °С протягом 20 хв. Потім клітини відмивали від ДМСО середовищем 199, яке містило 10 % ЕТС і 0,2 % БСА. Відмивання проводили таким чином: до 1 мл суспензії клітин у розчині кріопротектору з інтервалом в 1 хв додавали в 3 етапи середовище відмивання (1, 1, 2 мл), потім центрифугували при 225 g 3 хв. Після відмивки від кріопротектору оцінювали кількість і життєздатність клітин.

2.13. Кріоконсервування клітин

Зразки охолоджували в кріоампулах об'ємом 1,8 мл ("Nunc", США) на програмному заморозувачі „Cryoson” (Німеччина). При заморожуванні зразків використовували режими кріоконсервування, кожен з яких включав 2 етапи охолодження (I етап – з постійною швидкістю охолодження 1, 5, 10, 15, 20 °С/хв до температури -40 °С, II етап – занурення у рідкий азот (-196 °С)). Кріоконсервування зі швидкістю охолодження 40 °С/хв здійснювали над дзеркалом рідкого азоту (\downarrow LN₂) при постійній температурі довкілля 145–150 °С. Зразки заморожували також прямим зануренням у \downarrow LN₂. Відігрівання зразків здійснювали на водяній ванні при температурі 37 °С до зникнення твердої фази.

2.14. Вимірювання секреції альдостерону

Вміст альдостерону в середовищі інкубації вимірювали радіоімунологічним методом за допомогою набору «RIA Aldosterone»

(«Immunotech», Чехія) і нормували на кількість клітин в зразку. Середовище для визначення концентрації альдостерону, збирали на 1, 2, 3, 6, 14 добу культивування.

2.15. Визначення коефіцієнтів проникності мембран ККР і КМР для молекул ДМСО і води

Зміни об'єму клітини (V) і концентрацій розчинених в середині її речовин в часі описує система диференціальних рівнянь (1) [182]:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt} V = SL_p \left[\pi_1^{in} - \pi_1^{out} \right] + \left[\pi_2^{in} - \pi_2^{out} - \Delta p \right] \\ \frac{d}{dt} \pi_1^{in} = - \left[SK_1 \left(\pi_1^{in} - \pi_1^{out} \right) + \sigma_1 \pi_1^{in} \frac{dV}{dt} \right] \frac{1}{V - \alpha V_0} \\ \pi_2^{in} = \pi_{20}^{in} \frac{1 - \alpha}{1 - \alpha} \end{array} \right. \quad (1)$$

де t – час, π_1^{out} і π_1^{in} – осмотичний тиск проникної крізь плазматичну мембрану речовини поза і всередині клітини, π_2^{out} і π_2^{in} – сумарний осмотичний тиск непроникаючої крізь плазматичну мембрану речовини поза і всередині клітини, Δp перепад гідростатичного тиску на клітинній мембрані, S і L_p – площа поверхні і коефіцієнт фільтрації мембрани, K_1 і σ_1 – коефіцієнт проникності і коефіцієнт відображення плазматичної мембрани для проникної крізь мембрану речовини, π_{20}^{in} і V_0 – початкове значення сумарного осмотичного тиску непроникаючих речовин всередині клітини і її початковий об'єм, α – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин ($\alpha = 0,4027$).

Перехід до безрозмірних величин призводить рівняння (1) до виду:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma_1 (\pi_1^{in} - \pi_1^{out}) \left(\frac{1-\alpha}{y-\alpha} - 1 \right) \right] \\ \frac{d\pi_1^{out}}{dt} = -\frac{1}{\tau_1} \left[\pi_1^{in} - \pi_1^{out} \right] + \sigma_1 \pi_1^{in} \frac{dy}{dt} \end{cases} \quad (2)$$

$$\pi_2^{in} = \pi_2^{in} \left(\frac{1-\alpha}{y-\alpha} \right)$$

де $y = \frac{V}{V_0}$; $\tau_0 = \frac{1}{L_p \gamma \pi_0^{in}}$; $\tau_1 = \frac{1}{K_i \gamma}$; $\pi_0^{in} = 7,8$ атм. – осмотичний тиск

ізотонічного розчину, $\pi_{1,2}^{in,out} = \pi_{1,2}^{in,out} / \pi_{20}^{in}$ – приведений осмотичний тиск прониклого (1) і непрониклого (2) компонентів всередині і поза клітиною, γ – поверхнево-об'ємне відношення клітини.

$$\gamma = \frac{S_0}{V_0} = \frac{4\pi r^2}{\frac{4}{3}\pi r^3} = \frac{3}{r} = \frac{6}{D},$$

де D – початковий діаметр клітини, виміряний експериментально. Коефіцієнт відображення клітинної мембрани σ_1 у всіх розрахунках брали рівним 0,95. Розрахунок коефіцієнтів проникності мембран клітин розраховували, вирішуючи диференціальні рівняння (2). Варіюючи параметрами τ_0 і τ_1 , визначали значення L_p і K_1 , домагаючись збігу теоретичних кривих з експериментальними даними.

Використана фізико-математична модель досить адекватно описує і осмотичну поведінку клітин на етапі заморожування. Рішенням моделі при відомих значеннях L_p і K_1 є: залежності $y(T)$, $\pi_1^{in}(T)$ і $\pi_2^{in}(T)$ від температури. Такі рішення були отримані для лінійних режимів охолодження.

Вважаючи, що зміна коефіцієнтів фільтрації і проникності плазматичної мембрани для розчиненої речовини підпорядковується арреніусовим залежностям:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_{a_0}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right],$$

$$K(T) = K(T_0) \exp \left[\frac{E_{a_1}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right]$$

де T_0 – вихідна температура клітинної суспензії в градусах Кельвіна, E_{a_0} і E_{a_1} – відповідно енергії активації процесу переносу крізь плазматичну мембрану молекул води і розчиненої речовини, R_0 – універсальна газова постійна – 8,314 кДж/моль·град.

Осмотичні реакції досліджених ККР і КМР вивчали шляхом їх мікроскопічного фотографування, реєструючи час контакту з розчинами ДМСО. Визначення об'єму клітин здійснювали методом волюмометрії [183]. Відносний об'єм клітини $V(t)/V_0$ (де $V(t)$ – об'єм клітини в момент часу t , V_0 – вихідний об'єм клітини) визначали шляхом вимірювання діаметрів фотографічних зображень клітин, отриманих за допомогою мікроскопу Axio Observer. Z1 ("Carl Zeiss", Німеччина) з термостатичним столиком при температурах 4, 22, 37 °С. Діаметри (d) клітин вимірювали, використовуючи програму AxioVision 4.8.

2.16. Гістохімічний метод виявлення гранул амінів

Для визначення наявності в хромафінних клітинах наднирників гранул амінів до 50 мкл клітинної суспензії додавали 0,5 мл розчину, який містив суміш 5% $K_2Cr_2O_7$ і 5% K_2CrO_4 , яку готували у співвідношенні 10:1 на фізіологічному розчині (рН 5,6). Інкубацію клітин проводили протягом 4 годин при 22 °С, після чого зразок відмивали фізіологічним розчином. Клітини, які містили аміни, забарвлювалися в жовтувато–коричневий або темно–коричневий колір. Їх підрахунок здійснювали в полі зору мікроскопу і виражали у відсотковому співвідношенні до загальної кількості клітин у зразку [184].

2.17. Оцінка функціональної активності мітохондрій за допомогою флуоресцентної мікроскопії

Для оцінки наявності потенціалу на мембрані мітохондрій клітин наднирників використовували флуоресцентний зонд JC-1. При наявності $\Delta\psi_m$ молекули JC-1 проходять всередину органели і акумулюються на внутрішній мембрані. При низькому $\Delta\psi_m$, молекули барвника знаходяться в формі мономерів і флуоресціюють в зеленій області спектру. Підвищення $\Delta\psi_m$ приводить до реорганізації молекул барвника в димери, що формують j-агрегати, які флуоресціюють в червоно-оранжевій області спектру. В культуру клітин (початкова посівна концентрація 1×10^5 кл/мл, об'єм середовища культивування 1 мл) додавали 20 мкл зонду JC-1 (4 мг/мл). Інкубацію клітин проводили протягом 30 хв при 37 °С в темряві, після чого зразки відмивали середовищем DMEM/F12. Спостереження і фотографування люмінесцюючих клітин здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus IX71 і цифрової камери Olympus C-5060 (Японія). Довжина хвилі збудження становила 488 нм, емісії в зеленій області спектру – 510 нм, в червоній – 585 нм. У кожному полі зору підраховували кількість клітин, які містили j-агрегати (зелена/оранжева флуоресценція) і клітини, які мали тільки зелену флуоресценцію. Дані представлені у відсотковому відношенні до загальної кількості клітин в полі зору [185].

2.18. Приготування колагенової підложки.

Для приготування колагенової підложки використовували розчин колагену I типу в кінцевій концентрації 1 мг/мл. 1 мг колагену розчиняли в 0,25 мл 0,1 н оцтової кислоти і доводили до 1 мл середовищем з 0,2 % БСА. Отриманим розчином покривали дно 24-лункового планшету ("Sarstedt", США). Після чого планшет залишали висихати на 24 години [175].

2.19. Культивування ЗСК

Суспензію клітин наднирників у концентрації 1×10^5 кл/мл висівали у 24-лунковий планшет ("Sarstedt", США). Культивування клітин проводили в середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % ETC, 100 од/мл пеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину, 5 мкг/мл амфотерицину при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Після 1 доби культивування культуру ЗСК ополіскували середовищем культивування, для видалення клітин, які не прикріпилися, та проводили зміну живильного середовища. В подальшому середовище культивування змінювали кожні 3 доби. На 3 та 7 добу культивування первинну культуру ЗСК характеризували за наступними параметрами: за формою клітин (рис. 2.3.А) [186, 187] і за кількістю клітин в стані мітозу (рис. 2.3.Б).

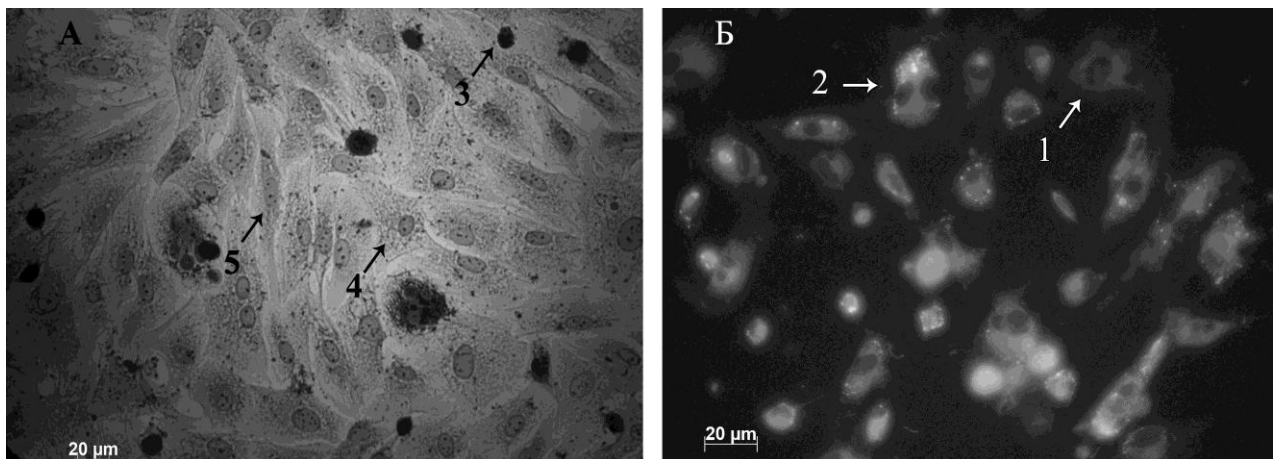


Рис. 2.3. Первинна культура ЗСК на 3 добу культивування. А – світлова мікроскопія, Б – флуоресцентна мікроскопія (зabarвлення НЧ). Стрілками вказано: 1 – приклад клітини з 1 ядром; 2 – приклад клітини з 2 ядрами; 3 – приклад клітини з округлою формою; 4 – приклад клітини полігональної форми; 5 – приклад клітин фібробластоподібної форми.

Спостереження в культурі ЗСК, а також фотозйомку здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus IX71 і цифрової камери Olympus C-5060 (Японія). Морфометричний аналіз проводили з використанням програми «AxioVisionRel.4.8» (CarlZeiss, Німеччина). Для кожного зразку підраховували не менше 100 клітин. Статистичну обробку проводили з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні.

2.20. Визначення адгезивної здібності ЗСК

Однією з основних властивостей культури ЗСК, що є ключовою для її нормального функціонування, належить адгезія. Для кількісної оцінки даної властивості, після відігрівання і видалення розчину ДМСО, ЗСК у концентрації 1×10^5 кл/мл висівали у 24-лунковий планшет ("Sarstedt", США). Через 1 добу культивування обережно видаляли культуральне середовище разом з клітинами, які не прикріпились, та підраховували їх кількість.

Адгезивні властивості клітин оцінювали за формулою ефективності прикріплення (E)

$$E = [(ПК-НК)/ПК] \times 100 \%,$$

де ПК – кількість клітин, які посадили на культивування, НК – кількість клітин, які не прикріпились після 1 доби культивування [188].

2.21. Забарвлення гематоксиліном і еозином

Клітинний моношар фіксували у 4 % розчині параформальдегіду протягом 15 хв, потім відмивали фізіологічним розчином і послідовно витримували по 1 хв у розчинах етилового спирту 96, 80 і 70 %. Після видалення спирту зразки фарбували у розчині гематоксиліну. Потім гематоксилін видаляли, зразки промивали проточною водою і фарбували у розчині еозину протягом 3 хв. Після видалення еозину зразки послідовно витримували по 1 хв у розчинах етилового спирту 70, 80 і 95 %, після чого проводили мікроскопічне дослідження.

2.22. Статистична обробка результатів

Дані представлені як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення ($M \pm m$). Значимість відмінностей між числовими показниками оцінювали, використовуючи непараметричний критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

2.23. Реактиви

В роботі використовувалися реактиви марки х.ч., ч.д.а., діагностичні радіоімунологічні набори РІА-СТ (Білорусь) і «RIA Aldosterone» («Immunotech», Чехія), №6, O2-dibutyryladenosine-3'-5'-monophosphate cyclic «Serva» (Німеччина), стрептоміцин (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна), бензилпеніцилін (ПАТ «Київмедпрепарат», Україна), колагеназа, ДНКаза, глютаровий альдегід (Sigma, США), Ficoll-400 (Sigma, США), флуоресцеїн діацетат (Sigma, США), пропідіум йодид (Sigma, США), TER-119 (BD Biosciences Pharmingen), нітросиній тетразолій (Sigma, США), живильне середовище 199 (Росія), живильне середовище DMEM/F12 (Росія), нільський червоний (Acros Organics), Амфотеріцин В («Biowest», Франція), колагеназа типу V (Sigma, США), ДНКаза I (Sigma, США), трипановий синій («Fluka», Індія), диметилгіазол дифенілтетразоліум бромід (МТТ-реактив) (Sigma, США), ембріональна теляча сироватка (Sigma, США), бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США), диметилсульфоксид (ВАТ «Луганський ХФЗ», Україна), зонд JC-1 (синтезований у лабораторії нанодисперсних матеріалів ІСМА НАН України, м. Харків).

РОЗДІЛ 3. РОЗПОДІЛ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗОНАЛЬНО ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИХ ПОПУЛЯЦІЙ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ ІЗ ЗСК НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

На теперішній час в літературі існують дані щодо трансплантації ЗСК надниркових залоз [2, 186, 189, 190], а також зонально-диференційованих ККР наднирників – пучкової і клубочкової зон [1, 191, 192] та КМР – хромафінних клітин [193]. У зв'язку з цим виникає потреба в накопиченні і довгостроковому зберіганні донорського матеріалу. Також потреба в створенні запасів клітинних суспензій обумовлена необхідністю їх безпосереднього застосування для фармакологічних і біомедичних досліджень.

Кріоконсервування є сучасним способом довгострокового зберігання біологічного матеріалу. Першим етапом низькотемпературного кріоконсервування є визначення складу і початкових функціональних характеристик суспензії, яка буде піддаватися кріоконсервуванню. Суспензії клітин кріоконсервують як у вигляді гетерогенного складу, так і у вигляді окремих популяції клітин. Одним із методів, що широко використовуються, є розподіл клітин в розчинах з різною щільністю. Традиційно для розподілу ендокринних клітин на фракції застосовують градієнти щільності перколу, фіколу, сахарози, БСА та інш [187, 227, 246, 256]. Для оцінювання функціональних і фенотипових характеристик отриманих клітинних фракцій використовують ряд наступних методів дослідження: імунофлуоресцентний метод (анти-P-450_{scs} антитіла), гістохімічний метод (виявлення ферменту 3 β -ГСД та гранул, що містять аміни), світлову та флуоресцентну мікроскопію (ФДА, ПЙ, НЧ, JC1), культивування, визначення рівню гормонів.

Для проведення дослідження необхідно було отримати ЗСК з надниркових залоз і оцінити її популяційну гетерогенність. На рис. 3.1 представлена мікрофотографія ЗСК, що отримана методом ферментативної дезінтеграції тканини. Видно, що отримана ЗСК містила різні за розміром і

морфологією клітини: ККР, КМР, сполучнотканинні та епітеліальні клітини, еритроцити.

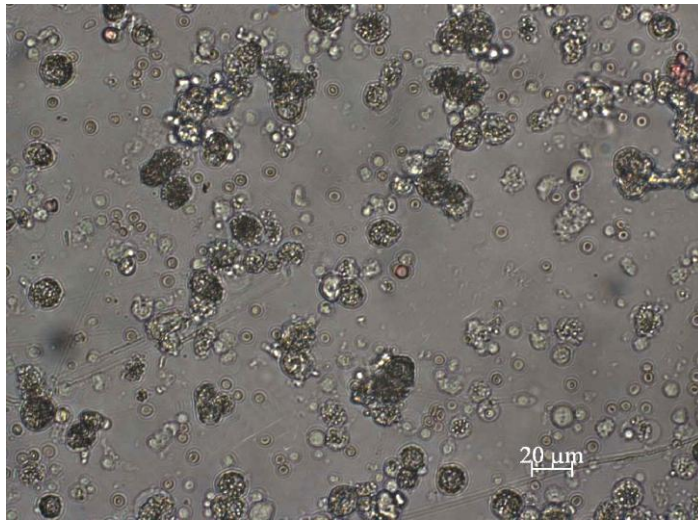


Рис. 3.1. ЗСК наднирників щурів. Світлова мікроскопія.

Для подальшого поділу ЗСК надниркових залоз був використаний градієнт щільності фіколу. Фікол є речовиною, яка широко використовується для створення градієнту щільності. Розчини даної речовини дозволяють сконцентрувати різні, але близькі за щільністю клітини в одному шарі. Це дозволяє підвищити однорідність одержаної популяції клітин із ЗСК. Розчини фіколу мають незначний осмотичний тиск, що дозволяє мінімізувати пошкодження клітин, які знаходяться на різних етапах диференціювання і функціонального стану [176].

На рис. 3.2 представлено розподіл ЗСК надниркових залоз щурів, розділеної в градієнті щільності фіколу. Видно, що клітини розподілялися відносно рівномірно в діапазоні щільності фіколу $1,025 - 1,033 \text{ г/см}^3$ і $1,066 - 1,084 \text{ г/см}^3$. Максимальну кількість клітин було локалізовано на межі зі щільністю $1,045 \text{ г/см}^3$. Мінімальна кількість клітин знаходилася на межах з щільністю $1,017$ і $1,058 \text{ г/см}^3$.

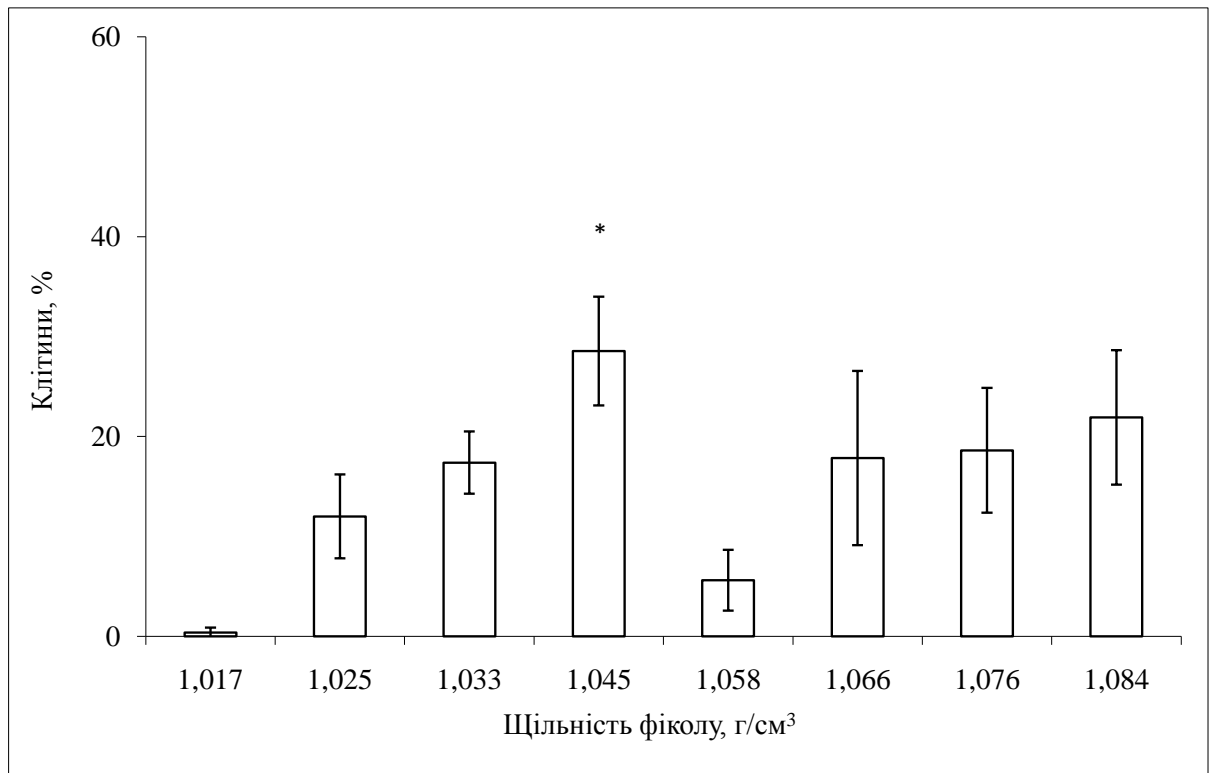


Рис. 3.2. Розподіл ЗСК надниркових залоз щурів у градієнті щільності фіколу. Кількість клітин у кожній інтерфазі подана у % від ЗСК до розподілу, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,017; 1,025; 1,033; 1,058; 1,066; 1,076; 1,084 г/см³, (p<0,05).

У зв'язку з тим, що надниркові залози всіх видів тварин мають високий рівень кровопостачання, було зроблено припущення, що еритроцити можуть становити значну частину клітин в ЗСК. Дійсно, при оцінці ЗСК надниркових залоз щурів візуалізувалася значна кількість еритроцитів (рис. 3.1). Оскільки еритроцити, будучи численною побічною популяцією в ЗСК надниркових залоз, впливають на оцінку відсоткового співвідношення клітин у виділених фракціях, ми вважали необхідним оцінити вміст еритроцитів у кожній інтерфазі градієнту. Специфічним маркером для еритроцитів є TER-119 – антитіло, що зв'язується з молекулою глікофорину А в клітинах еритроїдної

лінії мишей [194]. Тому методом проточної цитофлуориметрії було оцінено відсотковий вміст еритроцитів у ЗСК мишей за кількістю TER-119⁺ клітин.

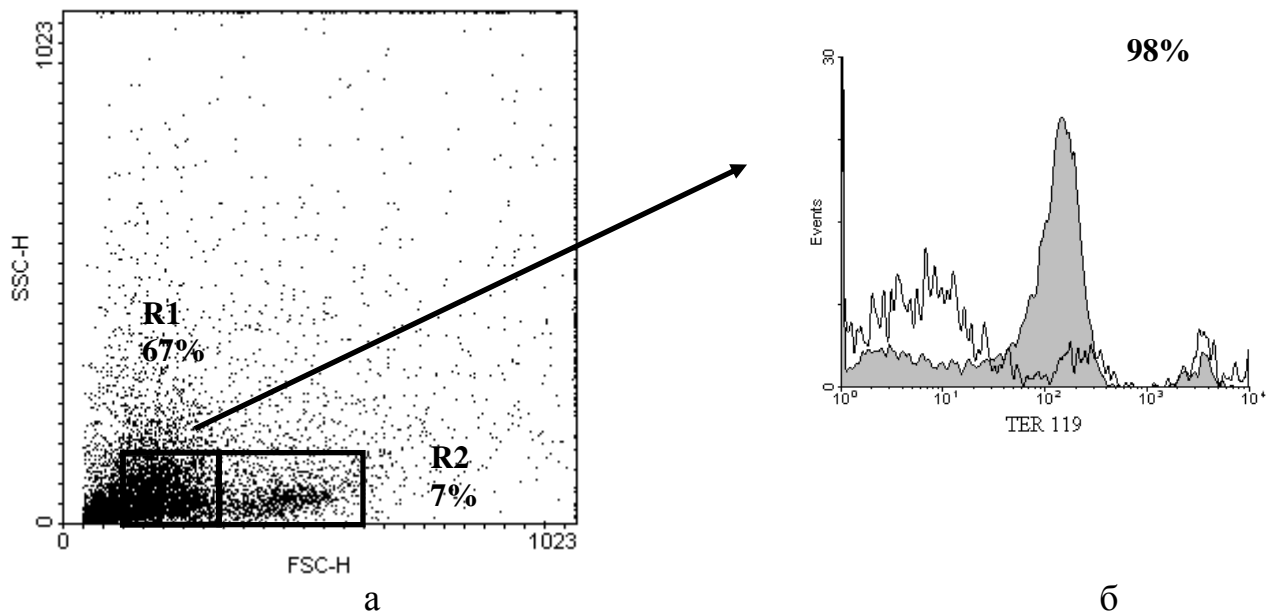


Рис. 3.3. Цитофлуориметричний аналіз суспензії клітин надниркових залоз мишей, де а – пряме та бокове світлорозсіювання клітин, б – TER-119⁺ клітини в суспензії клітин з надниркових залоз.

Аналіз цитограми ЗСК наднирників мишей у координатах SSC і FSC (рис. 3.3 а) дозволив виділити 2 головні групи клітин: R 1 – клітини середнього розміру та клітини R 2 – більшого розміру, що склали 67 та 7 %, відповідно від вмісту суспензії.

Гістограма інтенсивності флуоресценції (рис. 3.3 б) показала, що клітини з популяції R 1 специфічно зв'язуються з TER-119, що дозволяє ідентифікувати ці клітини як еритроцити. Статистичний аналіз за умов використання пакету WinMDI показав, що 98 % клітин популяції R 1 являють собою TER-119⁺ клітини.

Для подальшої роботи було потрібно розділити ЗСК наднирників мишей і оцінити як розподіляються клітини в градієнті щільності фіколу.

На рис. 3.4 видно, що ЗСК надниркових залоз мишей в діапазоні щільностей фіколу $1,017 - 1,045 \text{ г/см}^3$ співпадає з розподілом ЗСК надниркових залоз щурів.

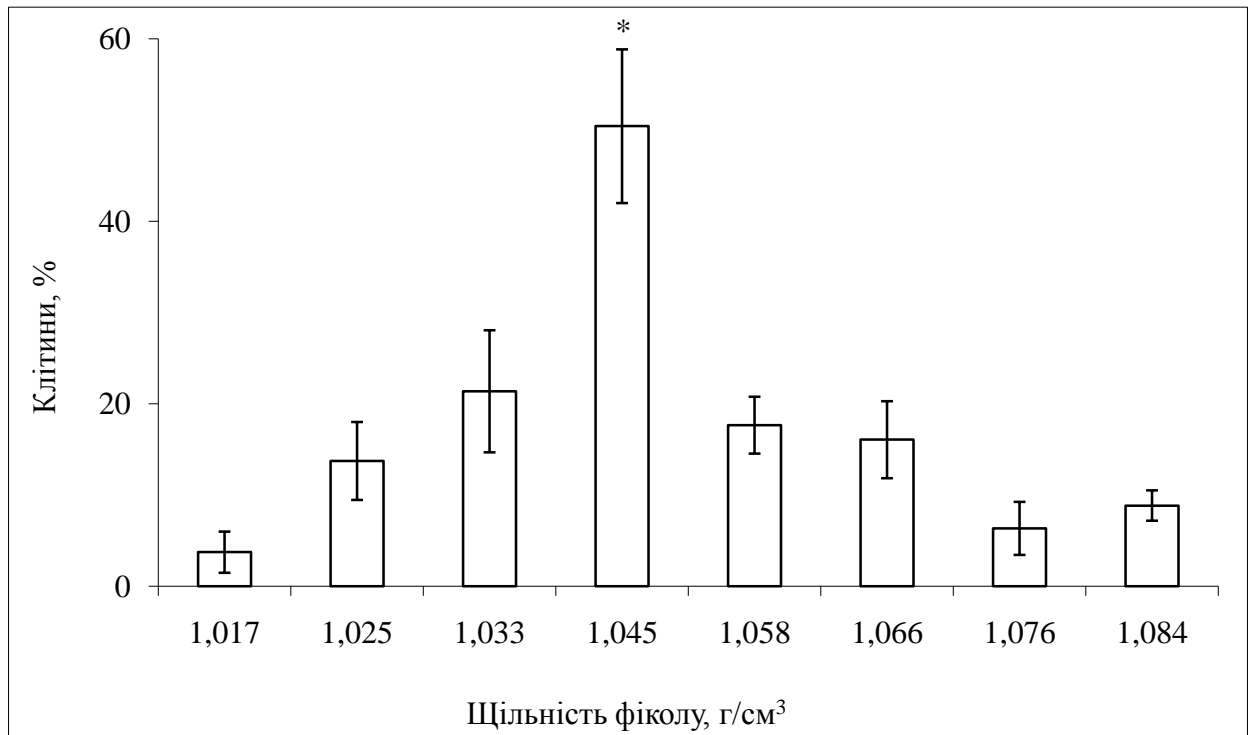


Рис. 3.4. Розподіл ЗСК надниркових залоз мишей у градієнті щільності фіколу. Кількість клітин у кожній інтерфазі подана у % від ЗСК до розподілу, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,017; 1,025; 1,033; 1,058; 1,066; 1,076; 1,084 г/см^3 , ($p < 0,05$).

Максимальна концентрація клітин знаходилась на межі зі щільністю $1,045 \text{ г/см}^3$, а мінімальна кількість клітин – на межах зі щільністю 1,017 та $1,076 \text{ г/см}^3$. В подальшому було досліджено, яким чином TER-119⁺ клітини розподіляються в градієнті щільності фіколу при розподілі ЗСК наднирників мишей.

Дослідження розподілу TER-119⁺ клітин на межах градієнту щільності фіколу (рис. 3.5) показало, що найменша кількість TER-119⁺ клітин ($3,66 \pm 1,25\%$) знаходилась на межі зі щільністю $1,025 \text{ г/см}^3$. В інших шарах

вміст TER-119⁺ клітин був вірогідно більшим. Найбільша кількість TER-119⁺ клітин (52,93±3,56 %) знаходилась на межі зі щільністю 1,045 г/см³. В діапазоні зі щільністю 1,066 – 1,084 г/см³ кількість еритроцитів вірогідно не відрізнялась між собою і складала 30,56±2,89 і 21,13±3,45 % відповідно.

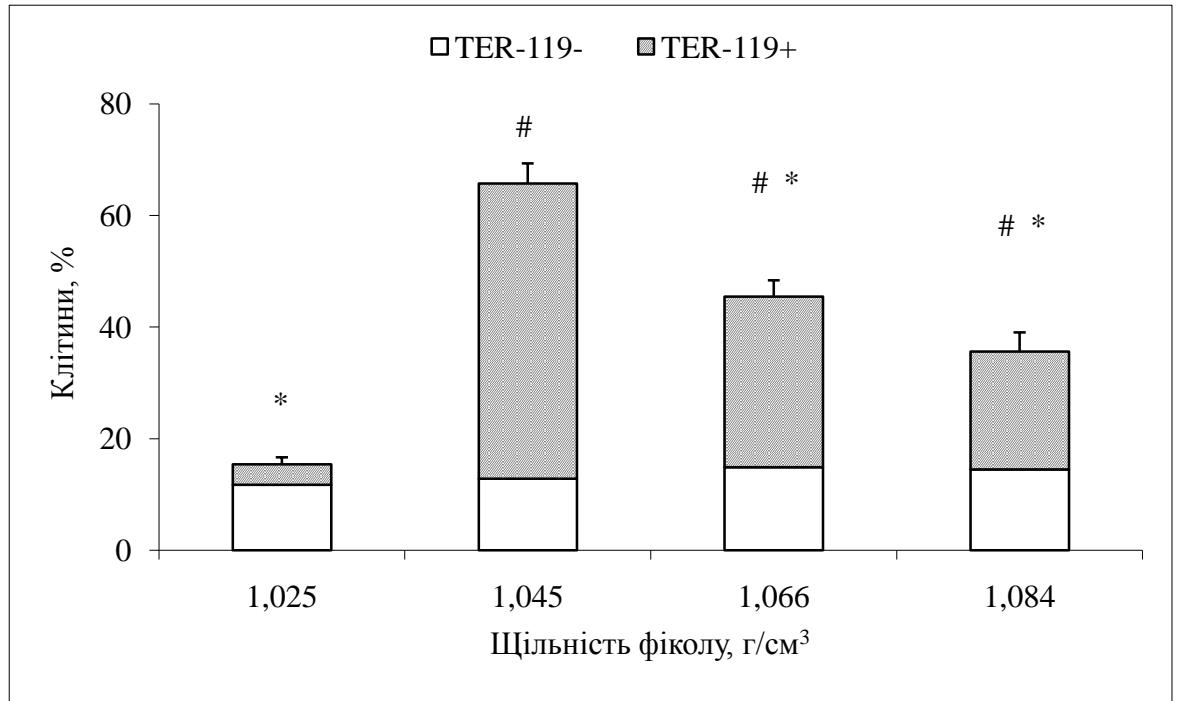


Рис. 3.5. Кількість TER-119⁺ клітин в ЗСК надниркових залоз мишей на межах градієнту щільності фіколу, (n=7).

Примітки: # – значення вірогідні відносно межі градієнту 1,025 г/см³, (p<0,05); * – значення вірогідні відносно межі градієнту 1,045 г/см³, (p<0,05).

Оскільки TER-119 є специфічним маркером лише для клітин еритроїдної лінії мишей та його не можна залучати для виявлення еритроцитів у суспензії аналогічних клітин щурів, тому була зроблена спроба використати інший опосередкований метод, який дозволяє виявити без'ядерні об'єкти та потім порівняти отримані дані з даними за умов використання TER-119 [195]. Для досягнення цієї мети ми використовували метод подвійного забарвлення ФДА і ПЙ [178].

Отримані в кожній інтерфазі градієнту фіколу популяції клітин з наднирників щурів та мишей були забарвлені флуоресцентними барвниками ФДА і ПЙ в присутності глютарового альдегіду.

Згідно цього методу подвійне забарвлення дозволяє отримувати наступні групи клітин: життєздатні ядерні клітини, які включали ФДА і ПЙ (ФДА⁺ПЙ⁺), загиблі ядерні клітини, які включали тільки ПЙ (ФДА⁻ПЙ⁺) та об'єкти без флюоресценції (ФДА⁻ПЙ⁻), тобто клітини, що не мали ядра або везикули. Еритроцити, які втрачають ядра в процесі дозрівання, можна ідентифікувати як (ПЙ⁻).

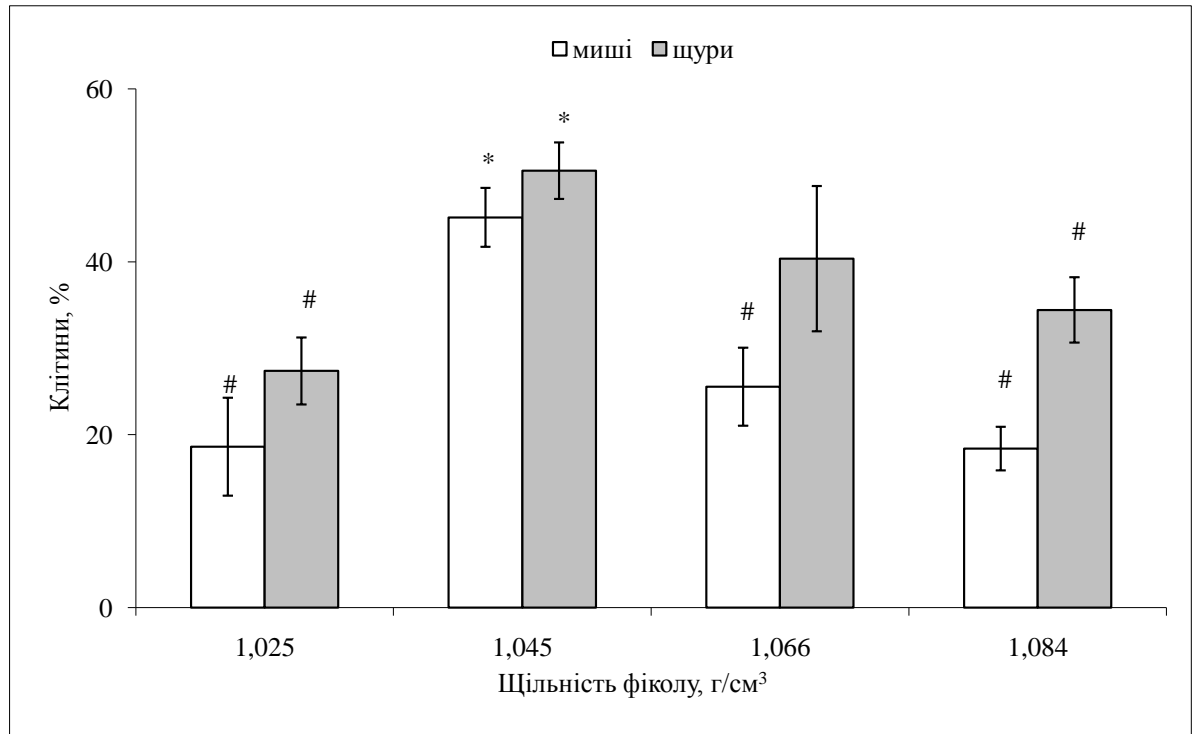


Рис. 3.6. Кількість ФДА⁻ПЙ⁻ клітин в ЗСК надниркових залоз мишей та щурів на межах градієнту щільності фіколу, (n=7).

Примітки: # – значення вірогідні відносно межі градієнту 1,045 г/см³, (p<0,05); * – значення вірогідні відносно межі градієнту 1,084 г/см³, (p<0,05).

Аналіз даних, які представлені на рис. 3.5 і 3.6, показав, що розподіл TER-119⁺ та ФДА⁻ПЙ⁻ клітин співпадають для суспензії клітин, отриманих з наднирників мишей. Порівняння відсоткового співвідношення TER-119⁺ і ФДА⁻ПЙ⁻ клітин показав, що останній метод дає більш високі значення кількості клітин без ядер у фракції на межі градієнту фіколу зі щільністю 1,025 г/см³. Так, для суспензії клітин надниркових залоз мишей кількість TER-119⁺

та ФДА⁻ПЙ⁻ клітин складало $3,66 \pm 1,25$ % і $18,60 \pm 5,65$ %, відповідно. Така розбіжність може бути пов'язана з тим, що до ФДА⁻ПЙ⁻ об'єктів можна віднести не тільки еритроцити, але й везикули, що формуються в процесі дезінтеграції тканини [248].

Після розподілу ЗСК наднирників мишей у градієнті щільності фіколу стало очевидним, що найбільша кількість клітин без ядер (ФДА⁻ПЙ⁻) знаходилась на межі градієнту зі щільністю $1,045$ г/см³ ($45,13 \pm 3,40$ %) та вірогідно зменшувалась до $18,39 \pm 2,52$ % на межі градієнту зі щільністю $1,084$ г/см³. В цілому можна стверджувати, що динаміка розподілу TER119⁺ та клітин без ядер, виділених із субпопуляцій суспензії клітин наднирників мишей, співпадає.

Саме тому був використаний метод подвійного забарвлення ФДА та ПЙ для оцінки кількості об'єктів без ядер у популяціях клітин, що були отримані з ЗСК наднирників щурів після розподілу в градієнті щільності фіколу. Згідно цих даних (рис. 3.6) без'ядерні об'єкти присутні у всіх отриманих ФР клітин. Максимальна кількість ФДА⁻ПЙ⁻ клітин ($50,53 \pm 3,27$ %) знаходиться на межі градієнту зі щільністю $1,045$ г/см³ та вірогідно зменшується до $34,43 \pm 3,78$ % на межі градієнту зі щільністю $1,084$ г/см³.

Таким чином, при використанні методу подвійного забарвлення ФДА/ПЙ і TER-119, було встановлено, що еритроцити присутні у всіх отриманих ФР клітин з надниркових залоз і складають до 50 % клітин.

На наступному етапі досліджень була зроблена спроба виявити наявність у фракціях ЗСК специфічних зонально-диференційованих клітин мозкової та коркової речовин наднирників щурів. Для цього використовуються різноманітні маркери. Одним із способів виявлення хромафінних гранул в клітинах мозкової речовини є гістохімічний метод виявлення амінів [184]. Відомо, що молекули катехоламінів синтезуються в гранулах, які є найважливіми структурно-функціональними елементами хромафінних клітин. Обробка хромафінних клітин солями хрому приводить до їх взаємодії з

матриksom гранул амінів, що проявляється жовто-коричневим забарвленням гранул.

На рис. 3.7 видно, що після розподілу більша частка хромафінних клітин була розташована в діапазоні щільностей 1,033 – 1,058 г/см³ з піком на межі 1,045 г/см³ (38,95±1,48 %). Крім того, хромафінні клітини займали позицію інтерфаз зі щільністю 1,017 – 1,025 г/см³ та 1,066 – 1,084 г/см³, де кількість цих клітин була значно меншою та складала відповідно 0,71±0,37 – 2,98±1,18%, а на межі зі щільністю фіколу 1,017 г/см³ хромафінні клітини були відсутні.

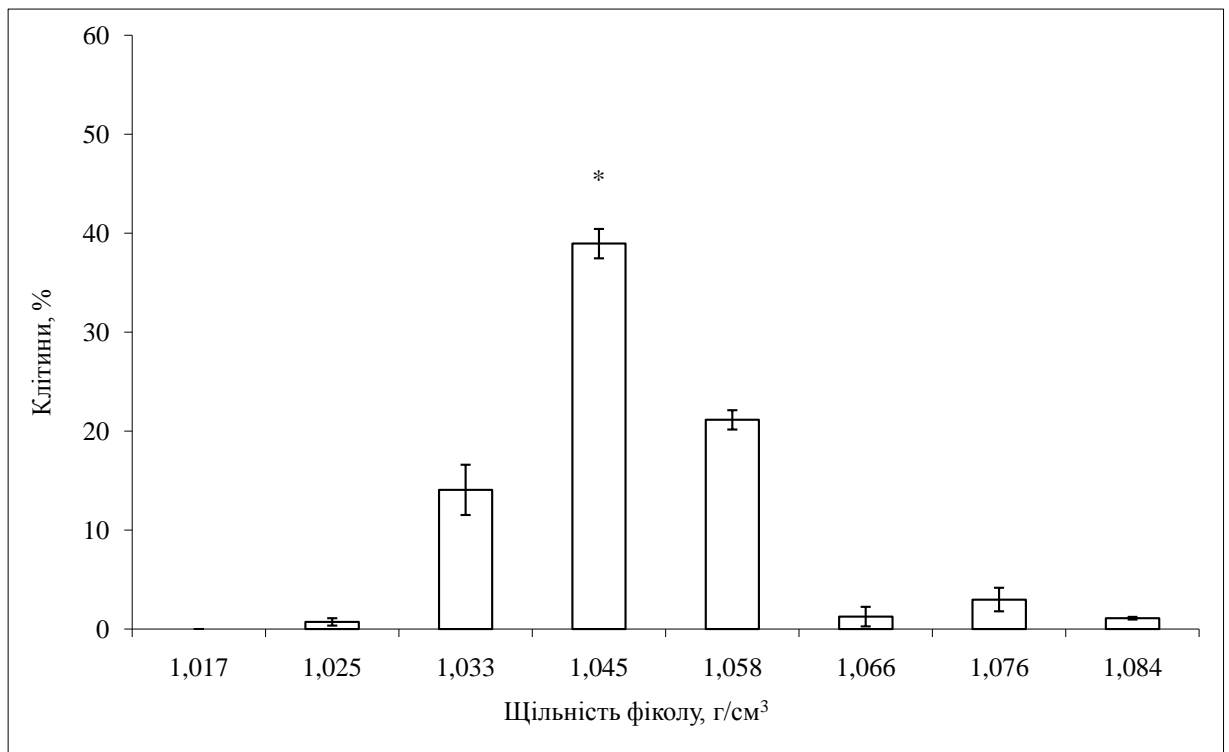


Рис. 3.7. Розподіл клітин ЗСК надниркових залоз шурів за наявністю хромафінних гранул. Кількість клітин у кожній інтерфазі подана у % від ЗСК до розподілу, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,017; 1,025; 1,033; 1,058; 1,066; 1,076; 1,084 г/см³, (p<0,05).

Одним із розповсюджених методів оцінки стероїдпродукуючих клітин є виявлення наявності ферменту 3β-ГСД. Цей фермент забезпечує конверсію

прегненолону в прогестерон та є однією з характеристик клітин, що здібні продукувати стероїдні гормони [181]. Саме тому був проведений гістохімічний аналіз з виявлення 3β -ГСД⁺ клітин в усіх ФР, що були отримані при розподілі ЗСК наднирників щурів.

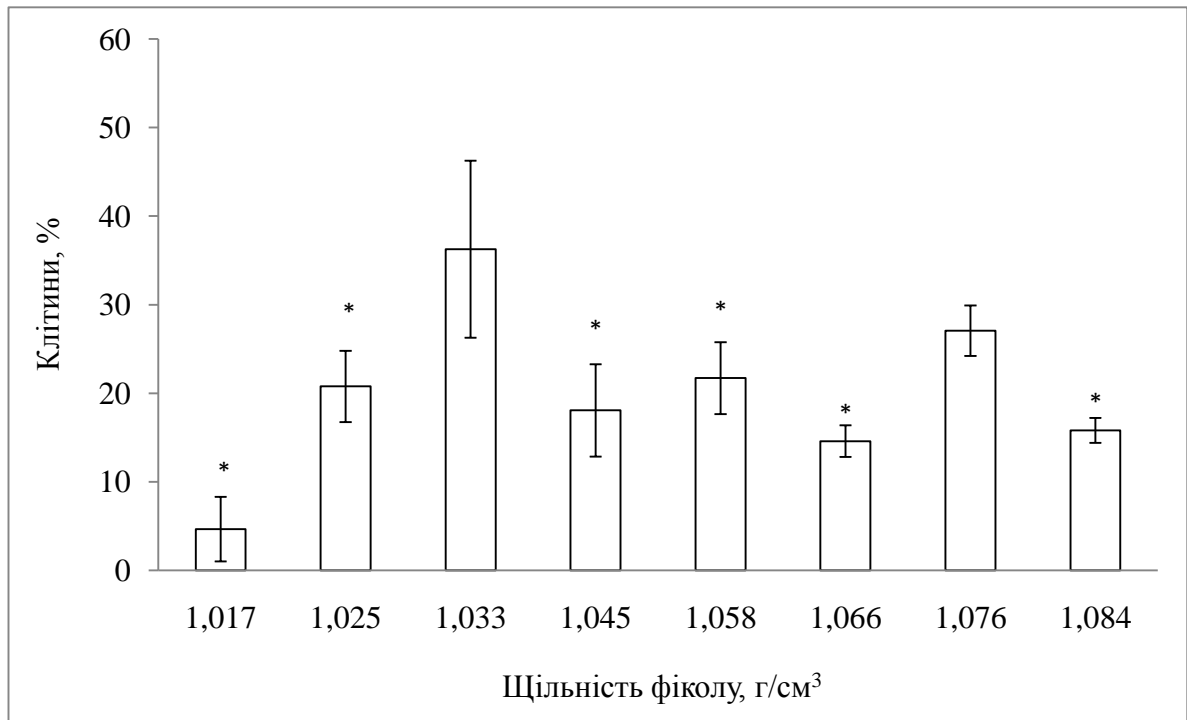


Рис. 3.8. Розподіл 3β -ГСД⁺ клітин ЗСК надниркових залоз щурів у градієнті щільності фіколу. Кількість клітин у кожній інтерфазі подана у % від ЗСК до розподілу, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,033, 1,076 г/см³, (p<0,05).

З наведених даних (рис. 3.8) можна бачити, що 3β -ГСД⁺ клітини присутні в усіх інтерфазах градієнту щільності фіколу. Найбільша кількість 3β -ГСД⁺ клітин зосереджувалась на межах зі щільністю 1,033 і 1,076 г/см³, і складала 36,25±9,99 % і 27,06±2,85 %, відповідно. Найменша кількість 3β -ГСД⁺ клітин (4,64±3,64 %) знаходилася на межі градієнту зі щільністю 1,017 г/см³.

Іншою ознакою стероїдпродукуючих клітин наднирників є наявність цитоплазматичних ліпідних крапель, які являють собою депо холестерину – субстрат для синтезу стероїдних гормонів [179]. Для візуалізації у клітинах

цитоплазматичних ліпідних крапель використовують флюоресцентний барвник нільський червоний (НЧ) [180].

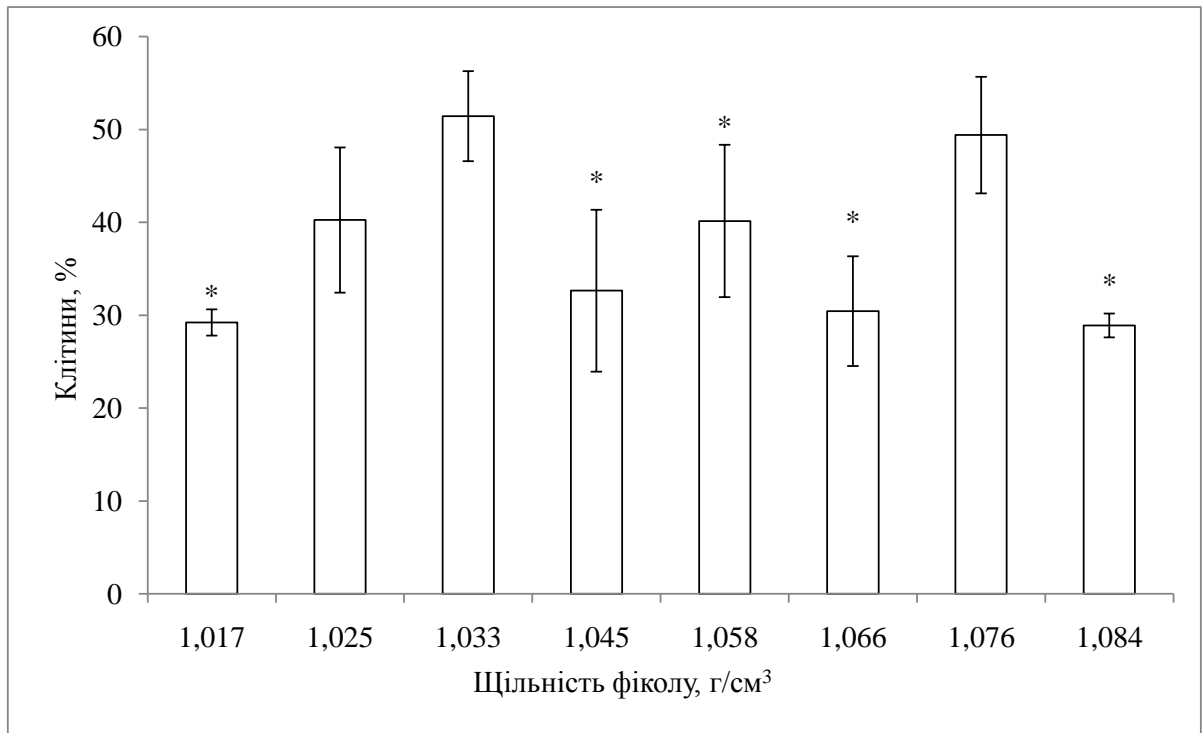


Рис. 3.9. Розподіл НЧ⁺ клітин ЗСК надниркових залоз щурів у градієнті щільності фіколу, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,033; 1,076 г/см³, p<0,05.

Отримані дані (рис. 3.9) свідчать, що НЧ⁺ клітини присутні в усіх інтерфазах градієнту щільності фіколу. Після розподілу найбільша кількість НЧ⁺ клітин знаходилася на межах 1,025; 1,033 і 1,076 г/см³. Треба відмітити, що на межі зі щільністю 1,025 г/см³ тільки 20,77±4,03 % клітин є 3β-ГСД⁺ (рис.3.8), тоді як решта клітин, які теж мають забарвлені ліпідні краплі, можливо відносяться до капсуло-зв'язаних адипоцитів [142].

Оскільки клітини, які синтезують глюко- та мінералокортикоїди, локалізуються головним чином у корковій речовини наднирників, була зроблена спроба підвищити кількість 3β-ГСД⁺ клітин в субпопуляціях, які можуть бути отриманні після дезінтеграції коркової речовини та розподілу адренкортикоцитів у градієнті щільності фіколу (рис. 3.10).

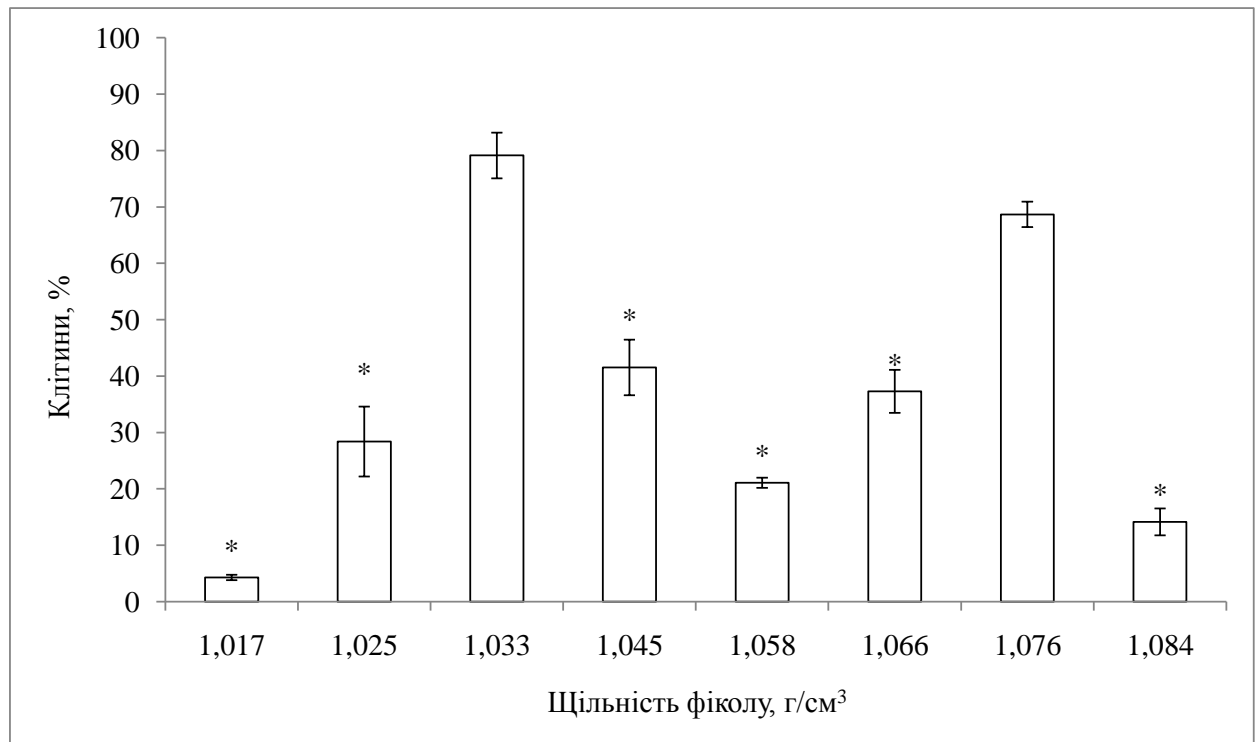


Рис. 3.10. Розподіл 3β -ГСД⁺ клітин ККР надниркових залоз щурів в градієнті щільності фіколу, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,033; 1,076 г/см³, (p<0,05).

Порівнюючи динаміку розподілу 3β -ГСД⁺ клітин ЗСК і ККР (рис. 3.8 і 3.10), було відмічено схожий розподіл клітин. При цьому вірогідне збільшення кількості 3β -ГСД⁺ клітин при розподілі ККР спостерігається на межах 1,033 і 1,076 г/см³, що складає 79,12±4,06 % і 68,65±2,25 % відповідно.

Таким чином, в інтерфазах зі щільностями 1,025 – 1,033 і 1,066 – 1,076 г/см³, виділяються дві основні ФР клітин, які містили ліпідні включення і характеризувалися активністю ферменту 3β -ГСД.

Для подальшої характеристики ФР клітин, отриманих з ЗСК, було визначено рівень альдостерону в середовищі культивування.

З цією метою отримані ФР клітин культивували протягом 1 доби в середовищі 199, що містило 10 % ЕТС при 37 °С, 5 % CO₂.

З рис. 3.11 видно, що більш високий вміст альдостерону в середовищі культивування (280,28±64,3 пг/10⁶ кл) було встановлено для адреноцитів, виділених на межі 1,076 г/см³.

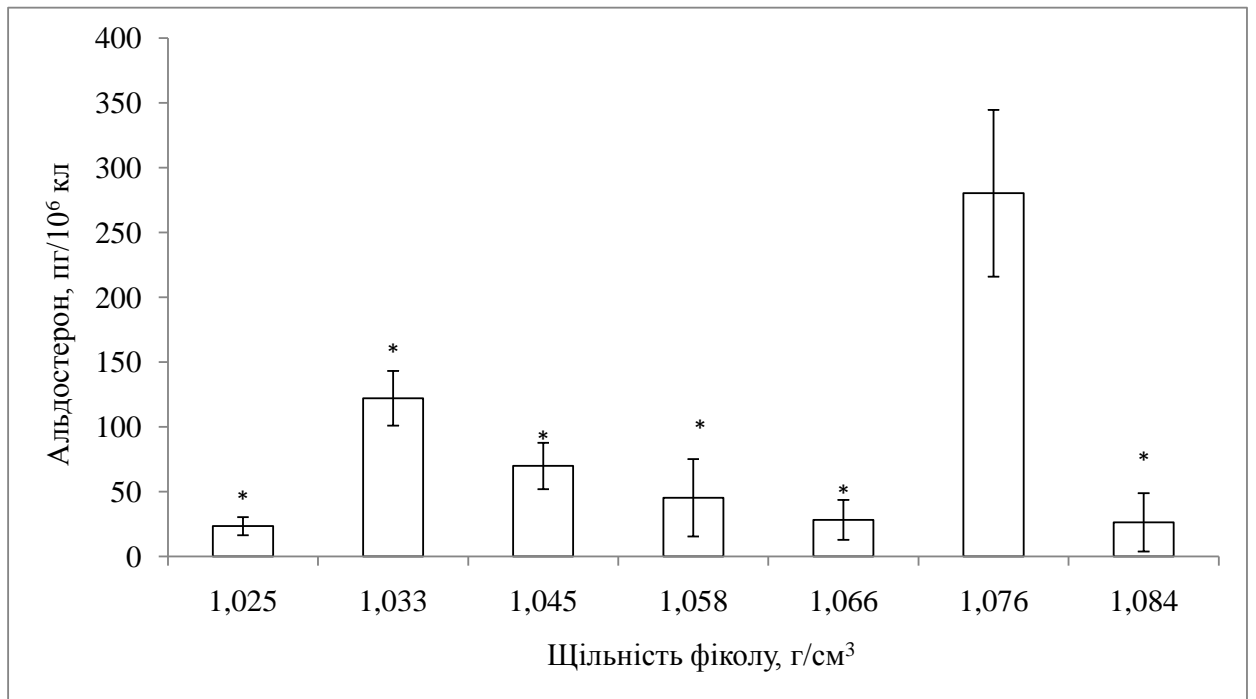


Рис. 3.11. Вміст альдостерону в середовищі культивування ЗСК (контроль) і отриманих ФР клітин, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно 1,076 г/см³, (p<0,05).

Це свідчить, що клітини клубочкової зони наднирників, які продукують альдостерон, переважно концентруються в інтерфазі 1,066 – 1,076 г/см³.

Наявність альдостерону в середовищі культивування інших ФР адреноцитів свідчить про те, що клітини клубочкової зони присутні у всіх виділених ФР клітин, але в меншій кількості.

В табл. 3.1. представлена підсумкова характеристика ФР клітин надниркових залоз щурів, отриманих після розподілу в градієнті щільності фіколу за такими параметрами: відсотковий вміст клітин 3β -ГСД⁺, НЧ⁺, хромафінних клітин, рівень альдостерону в кожній з інтерфаз градієнту.

Таблиця 3.1. Характеристика ФР клітин надниркових залоз щурів, отриманих після розподілу в градієнті щільності фіколу.

Щільність фіколу, г/см ³	3 β -ГСД ⁺ , %	НЧ ⁺ , %	Альдостерон, пг/10 ⁶ кл	Хромафінні клітини, %
1,017	4,64 \pm 3,64*	29,23 \pm 1,41*	–	–
1,025	20,77 \pm 4,03*	40,25 \pm 7,81	23,35 \pm 6,93&	0,71 \pm 0,37#
1,033	<u>36,25\pm9,99</u>	<u>51,42\pm4,85</u>	<u>122,00\pm21,07&</u>	14,06 \pm 2,54#
1,045	18,06 \pm 5,22*	32,64 \pm 8,71*	69,84 \pm 17,89&	<u>38,95\pm1,48</u>
1,058	21,71 \pm 4,05*	40,14 \pm 8,20*	45,30 \pm 29,90&	21,14 \pm 0,98#
1,066	14,58 \pm 1,78*	30,43 \pm 5,91*	28,25 \pm 15,40&	1,26 \pm 0,97#
1,076	<u>27,06\pm2,85</u>	<u>49,40\pm6,27</u>	<u>280,28\pm64,30</u>	2,98 \pm 1,18#
1,084	15,81 \pm 1,40*	28,88 \pm 1,28*	26,32 \pm 22,57&	1,1 \pm 0,14#

Примітки: * – значення вірогідні відносно 1,033, 1,076 г/см³, p<0,05;

& – значення вірогідні відносно 1,076 г/см³, p<0,05;

– значення вірогідні відносно 1,045 г/см³, p<0,05.

Таким чином, можна сказати, що наднирники, будучи складноорганізованим ендокринними залозами, представлені різними типами клітин, що визиває великий інтерес з точки зору вивчення їх функціональних характеристик як у вигляді ЗСК, так і у вигляді окремих її ФР. Метод розподілу ЗСК надниркових залоз щурів в градієнті щільності фіколу дозволяє отримати ФР клітин, збагачені зоноспецифічним клітинним типом. Ступінчастий градієнт щільності фіколу дозволив нам виділити 3 основні фракції клітин: ФР 1 (1,025 – 1,033 г/см³), ФР 2 (1,033 – 1,045 г/см³) і ФР 3 (1,066 – 1,076 г/см³). Так, у ФР 2 в основному знаходяться хромафінні клітини, що підтверджується гістохімічним методом на виявлення гранул, що містять аміни. У ФР 1 і ФР 3 в основному сконцентровані стероїдпродукуючі клітини, які характеризуються достовірно високим відсотковим вмістом 3 β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітин. Для підтвердження факту, що у ФР 1 і ФР 3 в основному

сконцентровані стероїдпродукуючі клітини, було проведено розподіл в градієнті щільності фіколу суспензії ККР надниркових залоз. Такого виду суспензія клітин є відносно гомогенною щодо вмісту стероїдпродукуючих клітин. Було отримано збільшення кількості 3β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітин для ФР 1 і ФР 3.

Вимірювання альдостерону в середовищі культивування показало достовірно високі значення продукції альдостерону для ФР 3. Згідно літературних даних [142], на межі розподілу фаз перколу, зі щільністю 1,034 і 1,069 г/мл³ були виділені фракції клітин, які за морфологічними ознаками відносилися до стероїдогенних клітин сітчасто-пучкової і клубочкової зон відповідно. Це дає можливість припустити, що в отриманій ФР 1 виділяються кортикостеронпродукуючі клітини наднирників щурів.

Можна відмітити, що гістохімічні методи, поряд з визначенням гормональної секреції, можна використовувати в якості однієї з характеристик клітин надниркових залоз.

На сьогодні загально визнаним способом рішення проблеми довгострокового зберігання ендокринного матеріалу є використання низькотемпературних технологій. Саме тому наступний розділ досліджень буде спрямовано на визначення впливу розчинів кріопротектору ДМСО та умов його додавання на властивості ЗСК, ККР, КМР і на окремі ФР клітин (отримані з ЗСК) надниркових залоз щурів.

Публікації за результатами розділу [24, 25, 26, 27, 28].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ РОЗЧИНІВ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ І ТЕМПЕРАТУРИ ІНКУБАЦІЇ НА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ ТА ОСМОТИЧНУ ПОВЕДІНКУ КЛІТИН НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

4.1. Вплив розчинів ДМСО і температури інкубації на кількість, життєздатність та метаболічну активність клітин надниркових залоз

Визначення типу кріопротектору, його оптимальної концентрації і температурних умов насичення/видалення є другим етапом процесу кріоконсервування. У якості кріозахисного агенту був використаний диметилсульфоксид (ДМСО), оскільки він успішно залучається для кріоконсервування клітин надниркових залоз [150, 164].

Відомо, що значна роль в пошкодженні клітин при кріоконсервуванні відведена осмотичним явищам, які призводять до осмотичного стресу, що має місце внаслідок зміни осмотичності середовища [166, 271]. У зв'язку з цим було досліджено вплив різних концентрацій ДМСО (5, 7, 10 %) та температури (4, 22, 37 °С) додавання та видалення кріопротектору на кількість і життєздатність ЗСК (рис. 4.1.1).

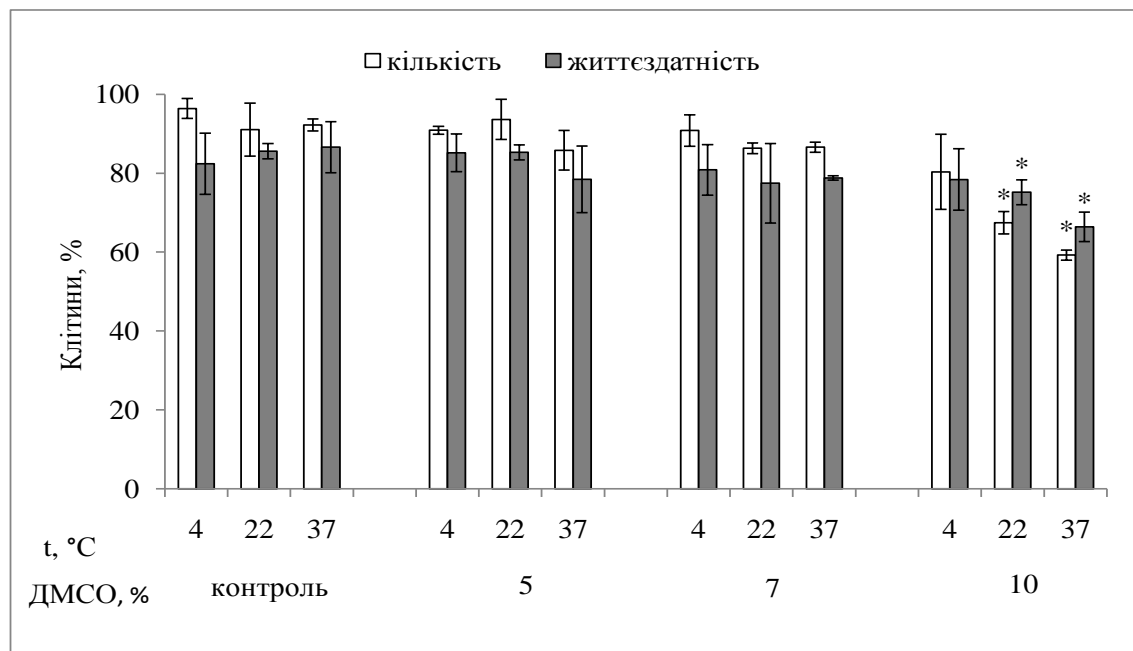


Рис. 4.1.1. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність ЗСК, (n=7). Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

У якості контролю служили зразки суспензій, які не містили кріопротектор і знаходились в умовах дослідженої температури.

Забарвлення трипановим синім показало, що в усіх зразках спостерігається деяке зниження кількості і життєздатності клітин. Крім того слід вказати, що за умов використання 10 % ДМСО при температурах 22 і 37°C спостерігалось додаткове зменшення кількості і життєздатності клітин. У всіх інших варіантах режимів інкубування вірогідних відмінностей між дослідженими зразками знайдено не було. Кількість клітин та їх життєздатність в цих зразках у середньому складала $87,77 \pm 4,39$ % та $80,62 \pm 3,31$ %, відповідно.

Для дослідження цитотоксичної дії ДМСО на клітини використовують МТТ-тест [194], який вказує на активність клітинних оксидоредуктазних ферментів, що відображає метаболічну активність клітин.

За результатами проведення МТТ-тесту (рис. 4.1.2) було виявлено зниження кількості функціонально активних клітин після інкубації ЗСК при використанні 10 % ДМСО при температурі 22 і 37 °C порівняно з контрольною групою.

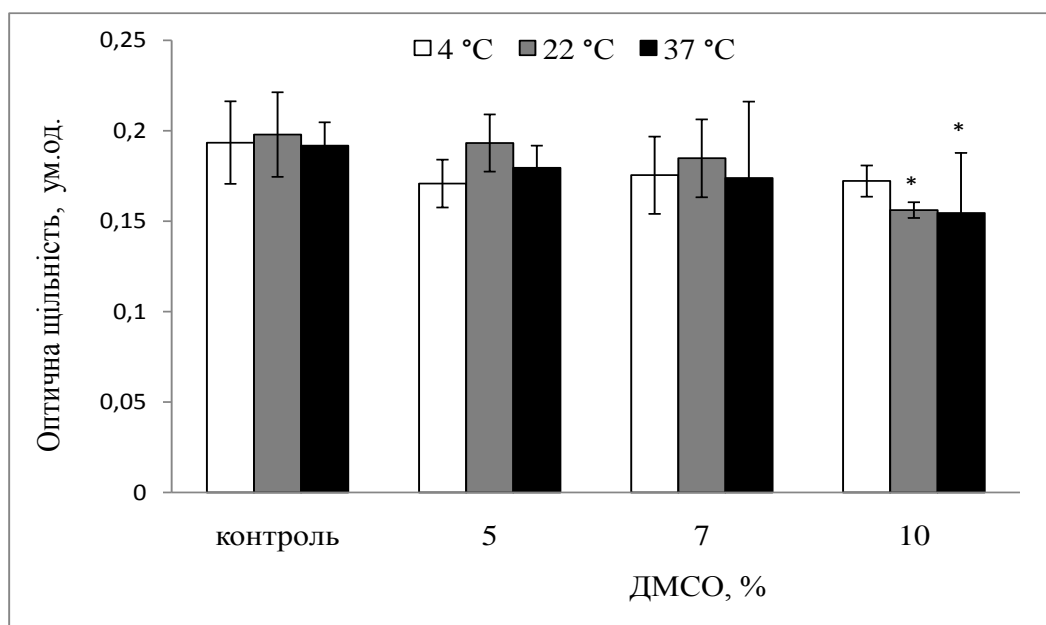


Рис. 4.1.2. Вплив ДМСО і температури інкубації на ступінь відновлення МТТ в клітинах ЗСК, (n=7). Примітка: * – значення вірогідні відносно відповідного контролю, ($p < 0,05$).

За допомогою гістохімічного методу на виявлення ферменту 3β -ГСД в стероїдпродукуючих клітинах, було досліджено вплив концентрації ДМСО на кількість 3β -ГСД⁺ клітин в діапазоні температур інкубації 4–37 °С (рис. 4.1.3).

З рис. 4.1.3 видно, що температура інкубації 37 °С призводить до зниження відсотка 3β -ГСД⁺ клітин відносно контролю при використанні 7 і 10 % ДМСО. При інкубації клітин при 4 °С в присутності 5 % ДМСО і 22 °С в присутності 10 % ДМСО також було виявлено зниження кількості 3β -ГСД⁺ клітин.

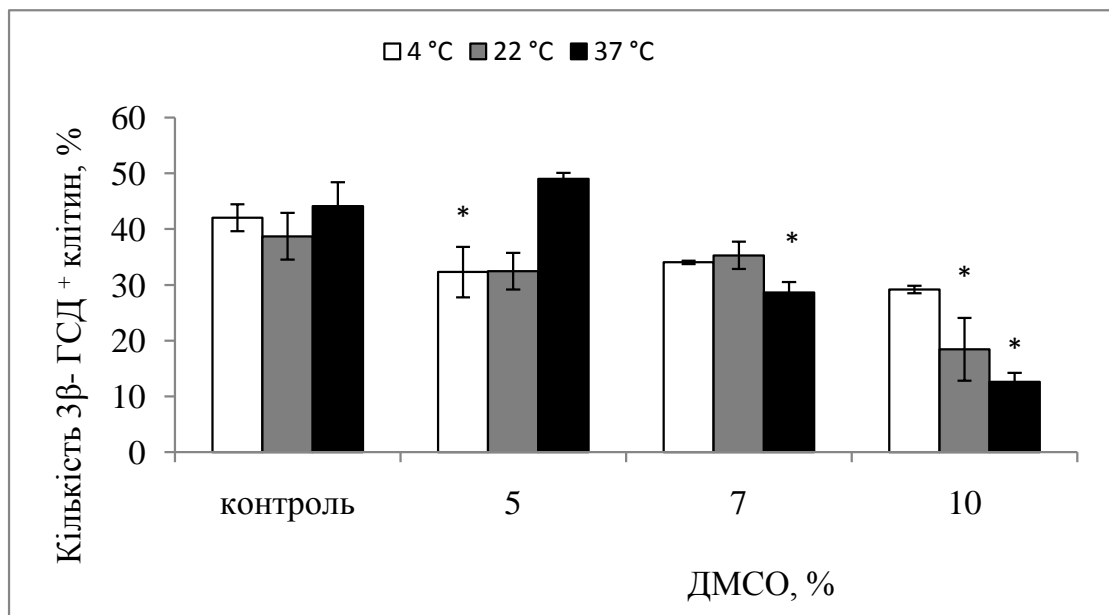


Рис. 4.1.3. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість 3β -ГСД⁺ клітин в ЗСК, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно відповідного контролю, (p<0,05).

Таким чином, при інкубації ЗСК при температурах 22 і 37 °С в присутності 10 % ДМСО відбувається зниження кількості, життєздатності, кількості 3β -ГСД⁺ клітин та метаболічної активності клітин.

Оскільки надниркові залози складаються з коркової і мозкової речовин, на наступному етапі роботи було досліджено вплив концентрацій кріопротектору і умов його додавання на ККР і на КМР. Результати

дослідження впливу інкубації з ДМСО (5, 7, 10 %) при різних температурах на кількість та життєздатність ККР представлені на рис. 4.1.4.

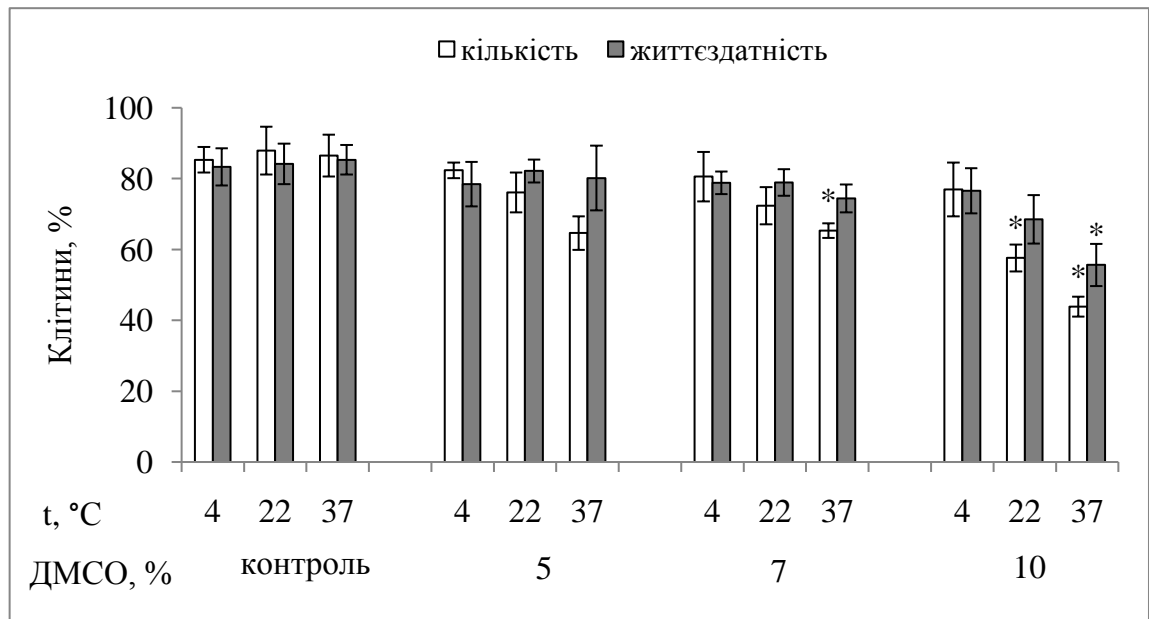


Рис. 4.1.4. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність ККР, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

Аналізуючи отримані результати, видно, що вірогідне зменшення кількості ККР в суспензії спостерігається при 37 °C у випадку інкубації зразків в присутності 7 і 10 % ДМСО і при температурі 22 °C в присутності 10 % ДМСО. Зниження життєздатності клітин було отримано при використанні 10 % ДМСО при 37 °C. В інших досліджених зразках ККР, кількість клітин і їх життєздатність вірогідно не відрізнялися між собою та в середньому становили 80,25±1,86 % і 72,54±5,67 %, відповідно.

Можна зробити висновок, що значний вклад в зменшення кількості ККР в досліджених зразках надає концентрація кріопротектору (7 і 10 %), дія якого підсилюється з підвищенням температури інкубації. Аналогічні дані ми отримали при інкубації ЗСК.

При проведенні МТТ-тесту для ККР (рис. 4.1.5) вірогідне зменшення метаболічної активності клітин спостерігалось при використанні 10 % ДМСО при температурі 37 °C.

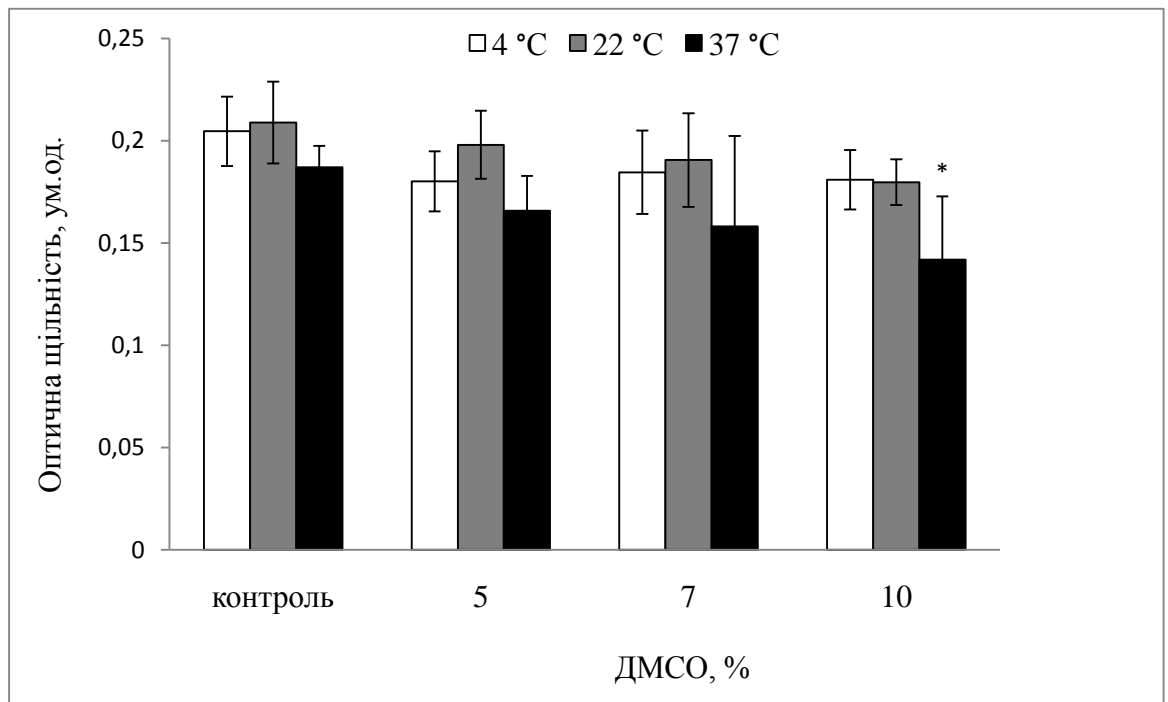


Рис. 4.1.5. Вплив ДМСО і температури інкубації на ступінь відновлення МТТ в клітинах ККР, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно відповідного контролю, ($p < 0,05$).

Аналізуючи кількість 3β -ГСД⁺ клітин в зразках ККР (рис. 4.1.6) було встановлено, що за умов використання 5 % ДМСО при всіх використаних температурах ми не виявили вірогідно значущих відмінностей між зразками.

У зразках, інкубованих в присутності 7 % ДМСО, спостерігався різноспрямований ефект кріопротектору. Так, при 4 °C було виявлено підвищення кількості 3β -ГСД⁺ клітин відносно контролю, але при температурі 37 °C було отримано зниження цього показника. У зразках, інкубованих з 10 % ДМСО при 37 °C, було одержано зниження кількості 3β -ГСД⁺ клітин.

Таким чином, інкубація ККР при 37 °C в присутності 10 % ДМСО призводить до зниження кількості, життєздатності та кількості 3β -ГСД⁺ клітин.

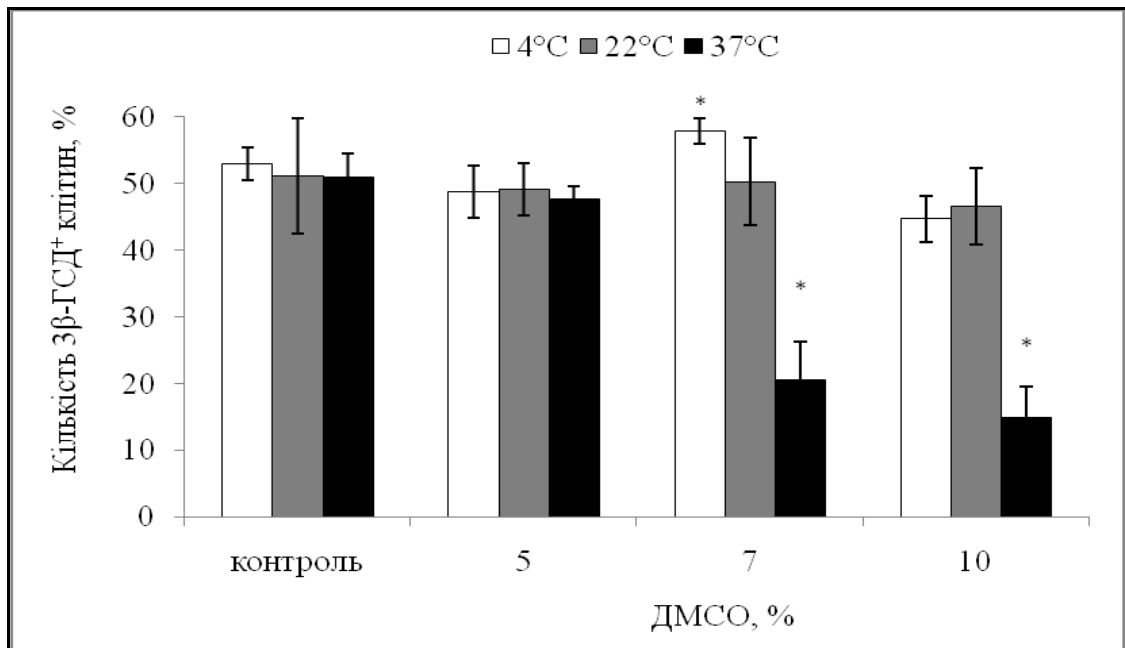


Рис. 4.1.6. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість 3β -ГСД⁺ клітин в ККР, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно відповідного контролю, (p<0,05).

Згідно з отриманими результатами з розподілу ЗСК в градієнті щільності фіколу (розділ 3), ми отримали три основні фракції клітин: ФР 1, ФР 2, ФР 3.

На рис. 4.1.7 представлені дані щодо впливу інкубації з різними концентраціями ДМСО при температурах 4, 22, 37 °С на кількість і життєздатність клітин ФР 1.

Було отримано, що вірогідне зменшення кількості клітин ФР 1 спостерігається при 37 °С у випадку інкубації зразків в присутності 7 і 10 % ДМСО і при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО, відносно контролю. Зниження життєздатності клітин було отримано при використанні 10 % ДМСО при 37 °С. В інших досліджених зразках ККР, дані за кількістю і життєздатністю вірогідно не відрізнялися між собою та в середньому їх значення знаходилися в межах $74,21 \pm 5,9$ % і $71,22 \pm 5,09$ %, відповідно.

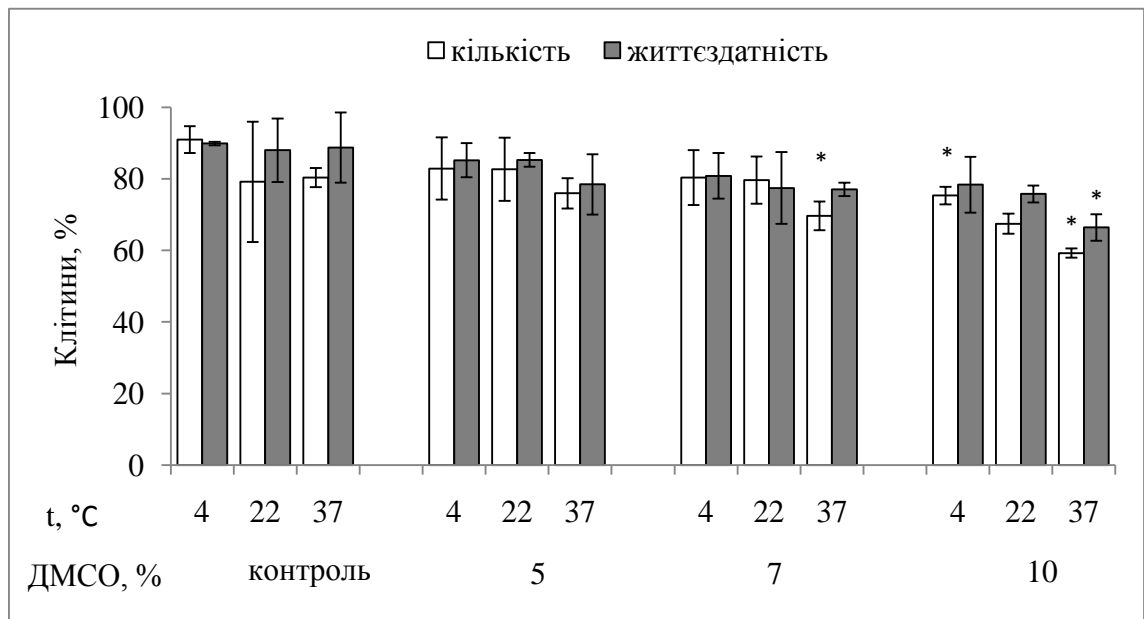


Рис. 4.1.7. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність клітин ФР 1, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

На рис. 4.1.8 представлені дані щодо метаболічної активності клітин ФР 1.

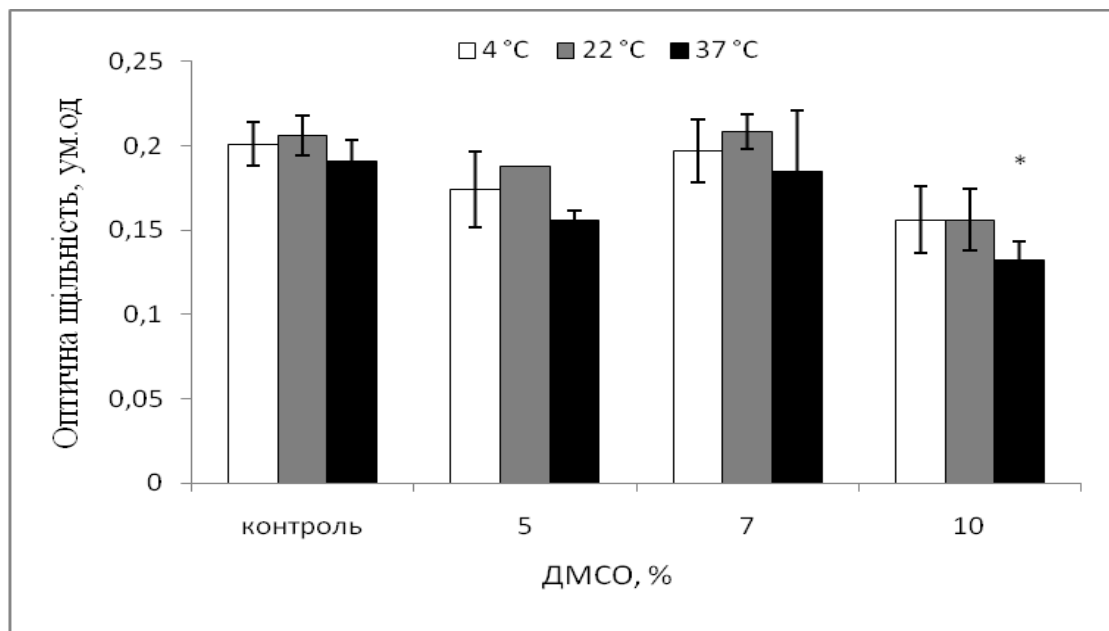


Рис. 4.1.8. Вплив ДМСО і температури інкубації на ступінь відновлення МТТ в клітинах ФР 1, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

Було встановлено, що метаболічна активність клітин ФР 1 знижувалась при інкубації в присутності 10 % ДМСО при 37 °С. При всіх інших умовах інкубації функціональна активність клітин зберігалась на рівні контролю.

На рис. 4.1.9 представлені дані щодо впливу інкубації з різними концентраціями ДМСО при температурах 4, 22, 37 °С на кількість і життєздатність клітин ФР 3.

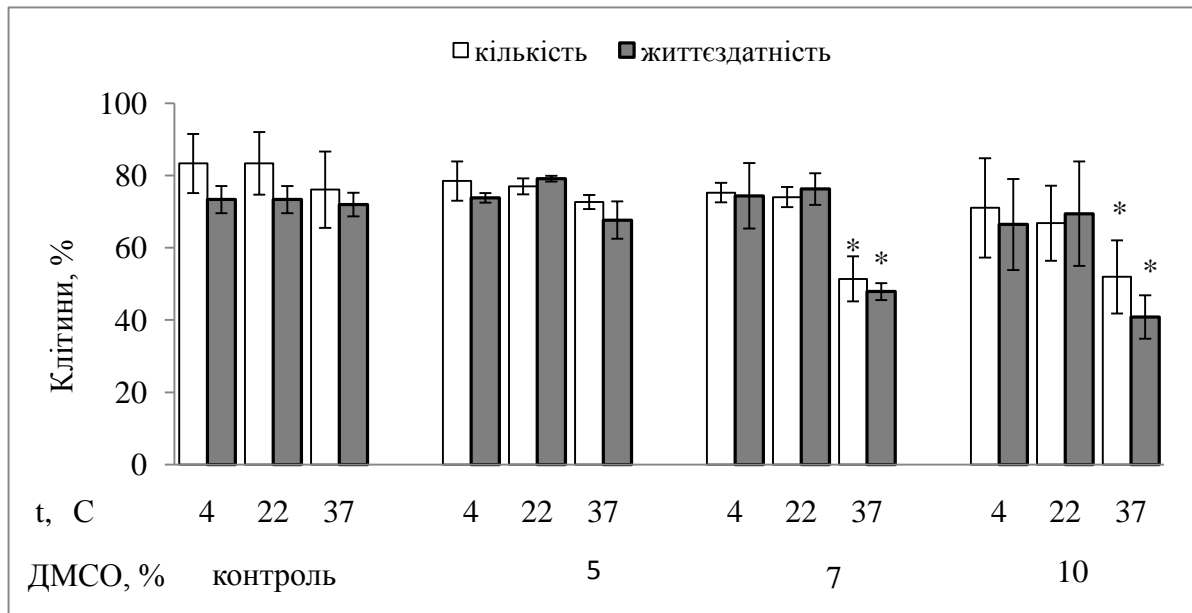


Рис. 4.1.9. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність клітин ФР 3, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

При дослідженні кількості і життєздатності клітин ФР 3, зниження цих показників відбувалось при використанні 7 і 10 % ДМСО при температурі 37 °С. В інших випадках кількість клітин і їх життєздатність склали 75,78±5,15 % і 72,56±3,86 %, відповідно.

Щодо метаболічної активності клітин ФР 3 (рис. 4.1.10), то зниження цього показника відмічається при температурі 37 °С в зразках інкубованих в присутності 7 і 10 % ДМСО.

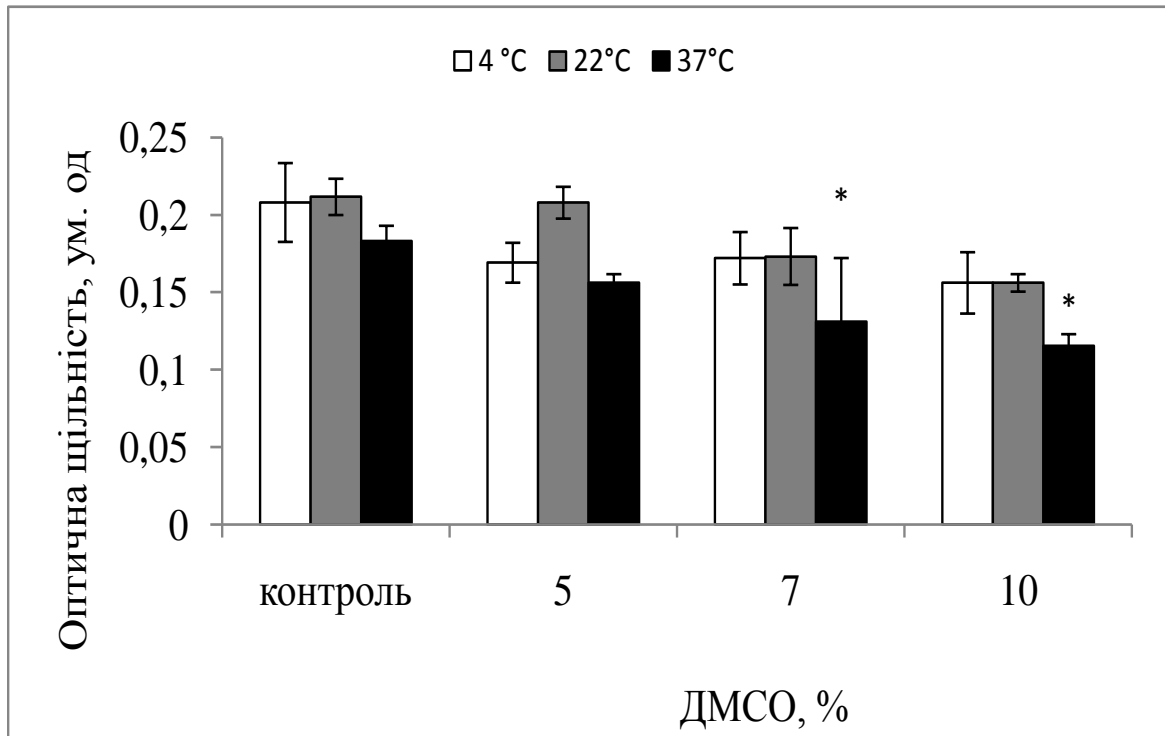


Рис. 4.1.10. Вплив ДМСО і температури інкубації на ступінь відновлення МТТ в клітинах ФР 3, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

Таким чином, порівнюючи показники кількості клітин, життєздатності, метаболічної активності клітин (МТТ-тест) та кількості 3β -ГСД⁺ клітин, очевидно температуро-залежне пошкодження клітин коркової речовини наднирників (ККР, ФР 1 та ФР 3) при температурі 37 °C в присутності 10 % ДМСО.

Результати дослідження впливу інкубації з різними концентраціями ДМСО в діапазоні температур інкубації 4–37 °C на кількість та життєздатність КМР надниркових залоз представлені на рис. 4.1.11.

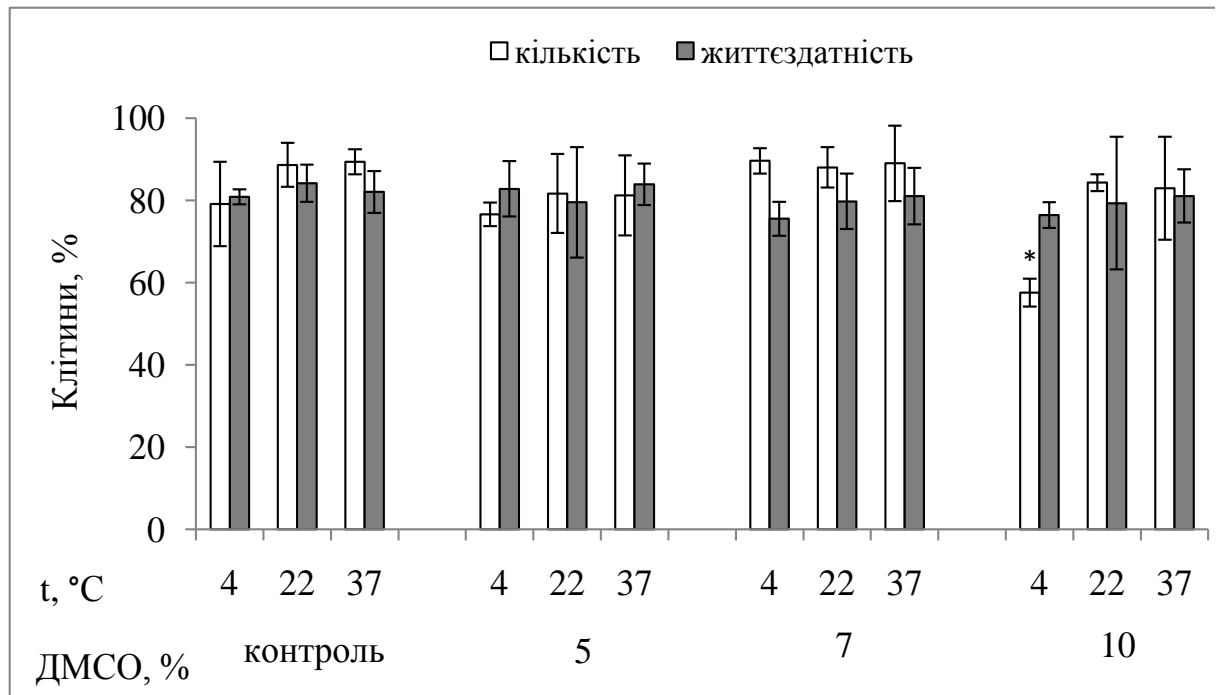


Рис. 4.1.11. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність КМР, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

Дослідження впливу концентрації кріопротектору і температури інкубації на кількість і життєздатність КМР показало зменшення кількості клітин в зразках, що були інкубовані в присутності 10 % ДМСО при 4 °С. При дослідженні життєздатності КМР, вірогідної різниці між цими зразками не було встановлено і в середньому цей показник складав $80,51 \pm 2,65$ %.

За результатами проведення МТТ-тесту для КМР (рис. 4.1.12) не було виявлено вірогідного зниження метаболічної активності клітин після інкубації в розчинах ДМСО при температурах 4, 22 і 37 °С порівняно з контролем. Але, слід відмітити, що простежується тенденція до її зниження при температурі 4 °С при всіх використаних концентраціях ДМСО.

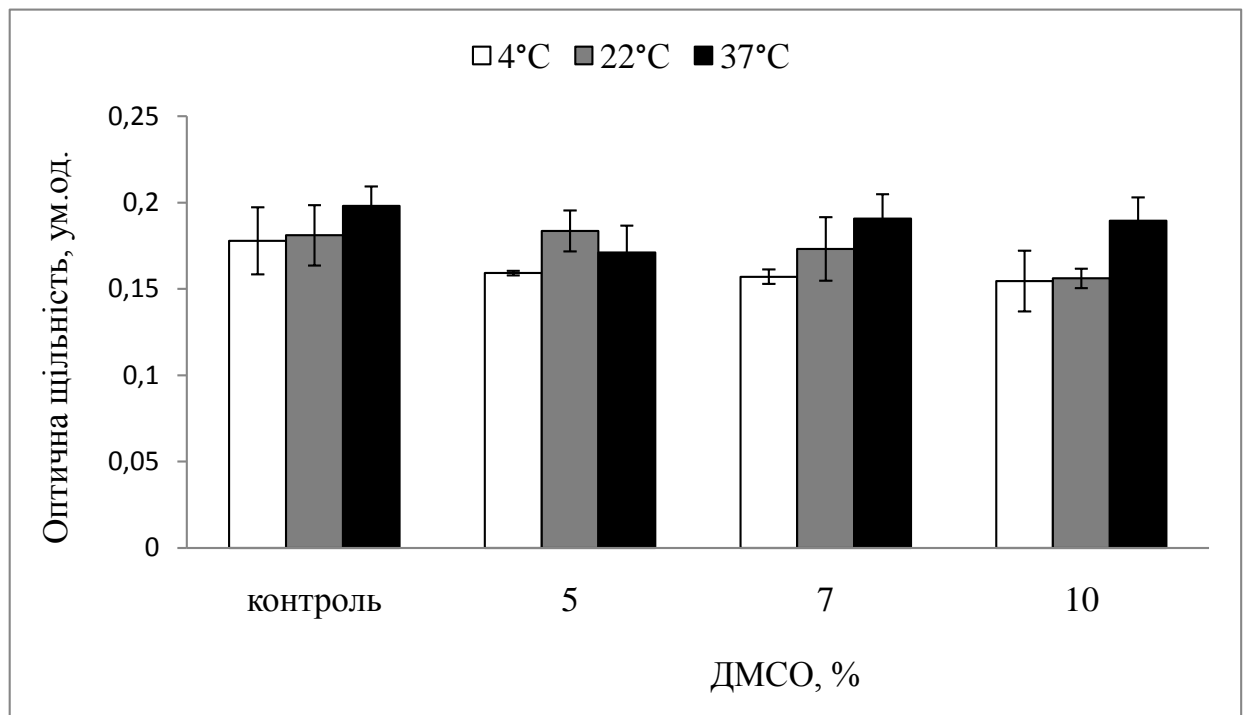


Рис. 4.1.12. Вплив ДМСО і температури інкубації на ступінь відновлення МТТ в клітинах КМР, (n=7).

Слід зазначити, що КМР і клітини ФР 2 це одні й ті ж самі клітини, але отримані різними способами.

На рис. 4.1.13 представлені дані впливу ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність клітин ФР 2.

При дослідженні кількості і життєздатності клітин ФР 2, було отримано зниження показника кількості клітин при використанні 10 % ДМСО при всіх температурах інкубації. В інших випадках кількість клітин складала $63,01 \pm 7,59$ %, в той час як життєздатність становила $68,94 \pm 8,41$ %.

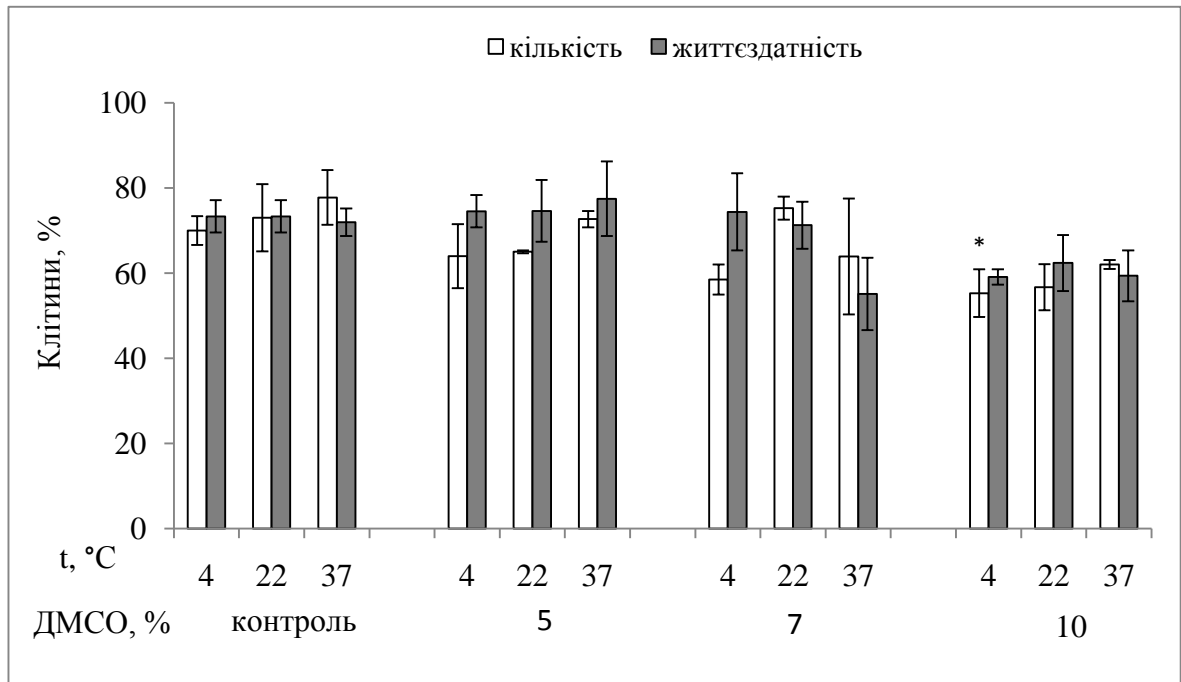


Рис. 4.1.13. Вплив ДМСО і температури інкубації на кількість і життєздатність клітин ФР 2, (n=7).

Примітка: * – значення вірогідні відносно контролю, (p<0,05).

За результатами проведення МТТ-тесту для ФР 2 (рис. 4.1.14) вірогідного зниження метаболічної активності клітин після інкубації в розчинах ДМСО при температурах 4, 22 і 37 °C порівняно з контролем виявлено не було.

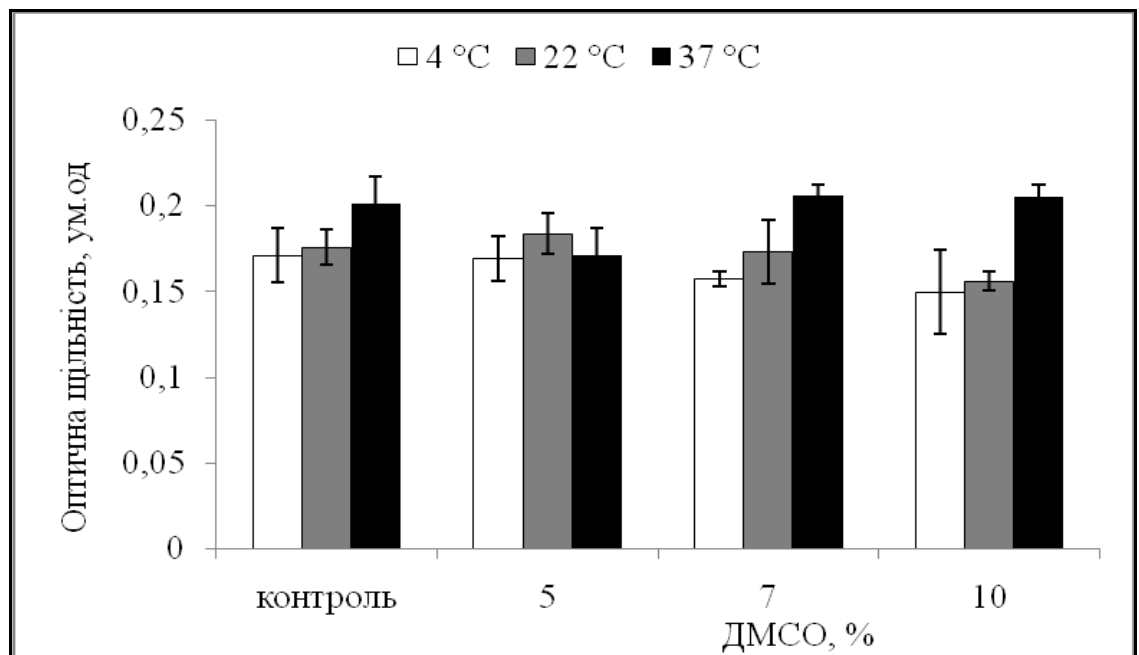


Рис. 4.1.14. Вплив ДМСО і температури інкубації на ступінь відновлення МТТ в клітинах ФР 2, (n=7).

Таким чином, слід зазначити відмінність поведінки всіх типів клітин від температури інкубації. Так її підвищення до 37 °С підсилювала токсичну дію ДМСО для клітин, які належать до ККР, в результаті пригнічення активності аденілатциклази [153]. Але для клітин КМР і ФР 2 такої залежності не виявлено.

4.2. Вплив розчинів ДМСО і температури інкубації на осмотичну поведінку клітин надниркових залоз

Важливим кріобіологічним параметром є визначення проникності плазматичних мембран клітин для молекул води і кріопротектору, що визначає їх осмотичну поведінку в процесі кріоконсервування, а отже, і подальше виживання клітин після відігрівання і повернення в ізотонічний розчин.

Відповідно до проведених морфометричних вимірів суспензія ККР наднирників включала клітини діаметром від 9,12 до 16,62 мкм, а розміри КМР варіювали від 7,16 до 13,88 мкм.

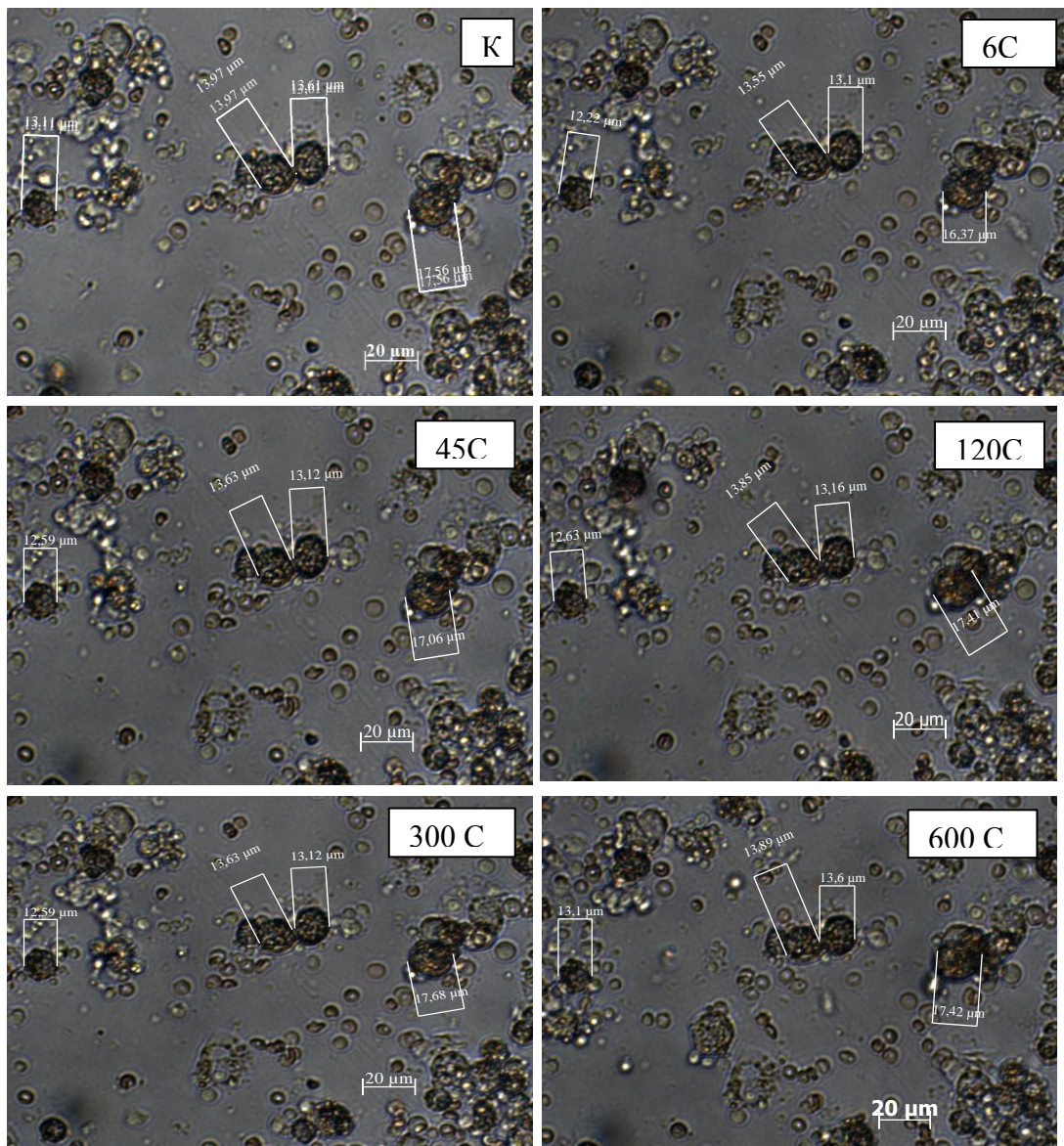


Рис. 4.2.1 Зміна розміру ККР наднирників щурів при їх експозиції в розчині 5 % ДМСО при температурі 37 °С.

На фото 4.2.1 наведено приклад осмотичної поведінки ККР при контакті з 5 % ДМСО при температурі 37 °С. Наведені мікрофотографії показують, що при експозиції клітин з розчином проникаючої речовини спостерігається різке зменшення їх об'єму за рахунок зневоднення протягом перших секунд. Після цього реєструється поступове збільшення об'єму клітин, що приводить до відновлення початкових значень об'єму без видимих пошкоджень клітин.

На рис. 4.2.2 – 4.2.7 представлені приклади експериментального визначення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран ККР і КМР наднирників для молекул кріопротектору при різних температурах, шляхом поєднання з експериментальними даними теоретичної залежності зміни відносного об'єму клітин у часі.

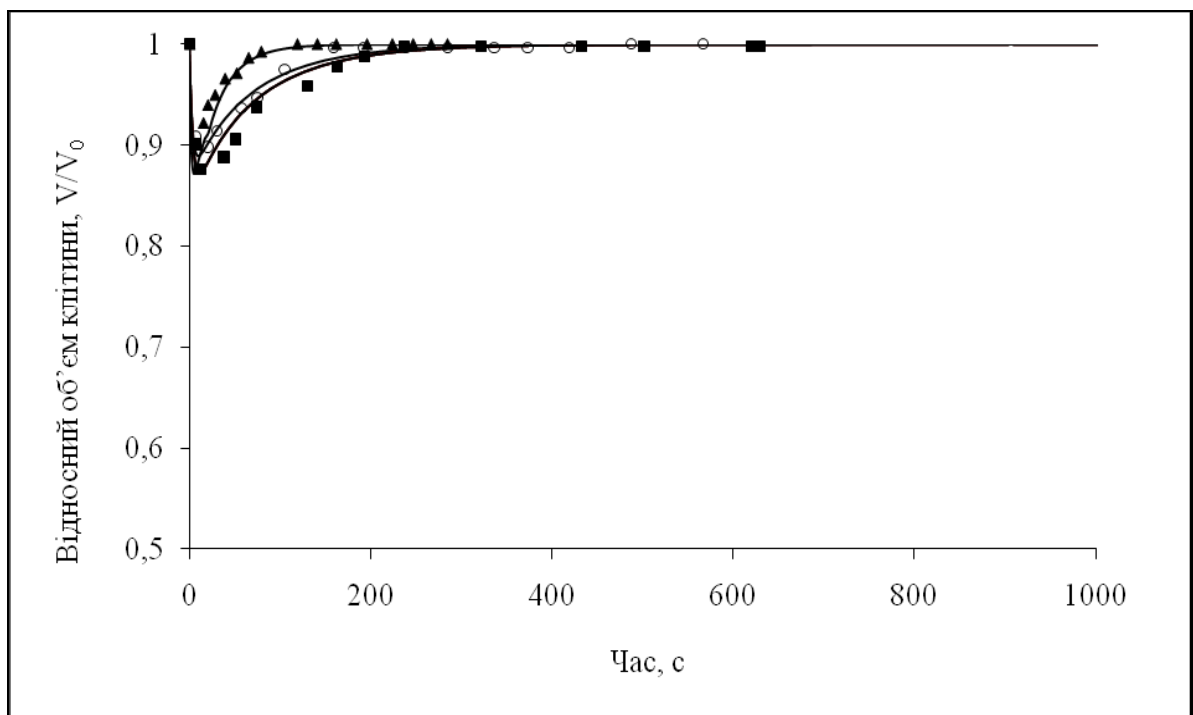


Рис. 4.2.2. Експериментальні (■, ○, ▲) і теоретичні (безперервна лінія) криві залежності зміни відносного об'єму ККР наднирників від часу експозиції в розчині, що містить 5 % ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

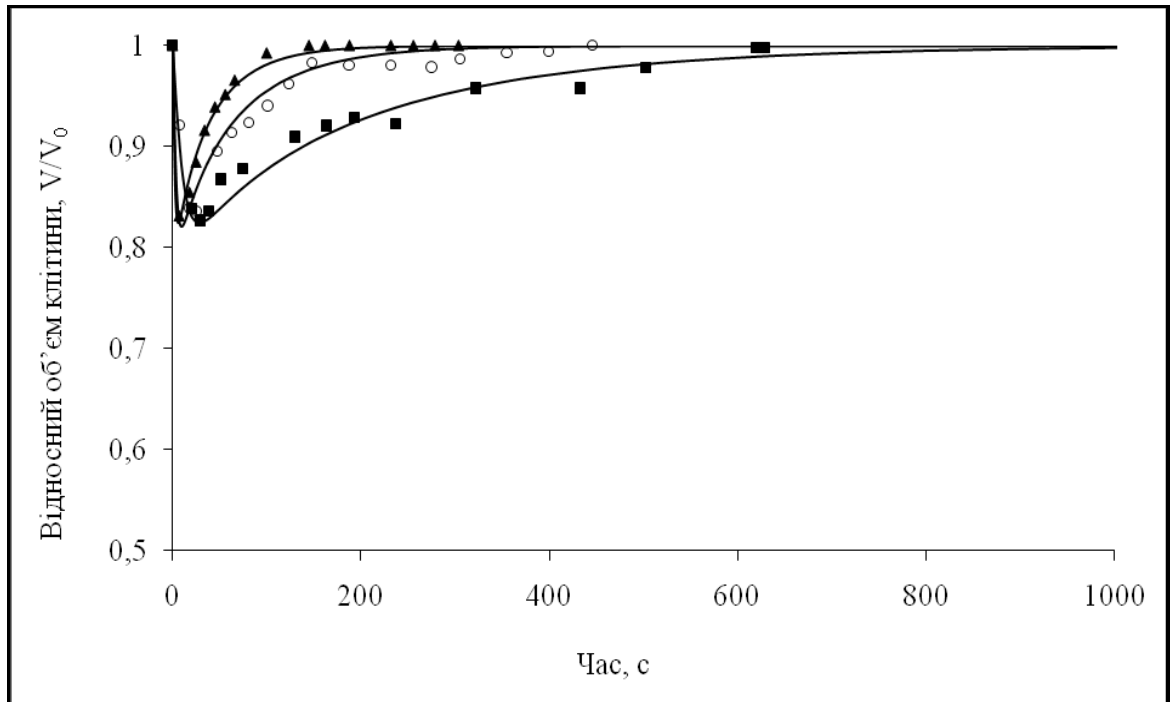


Рис. 4.2.3. Експериментальні (■, ○, ▲) і теоретичні (безперервна лінія) криві залежності зміни відносного об'єму ККР наднирників від часу експозиції в розчині, що містить 7 % ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

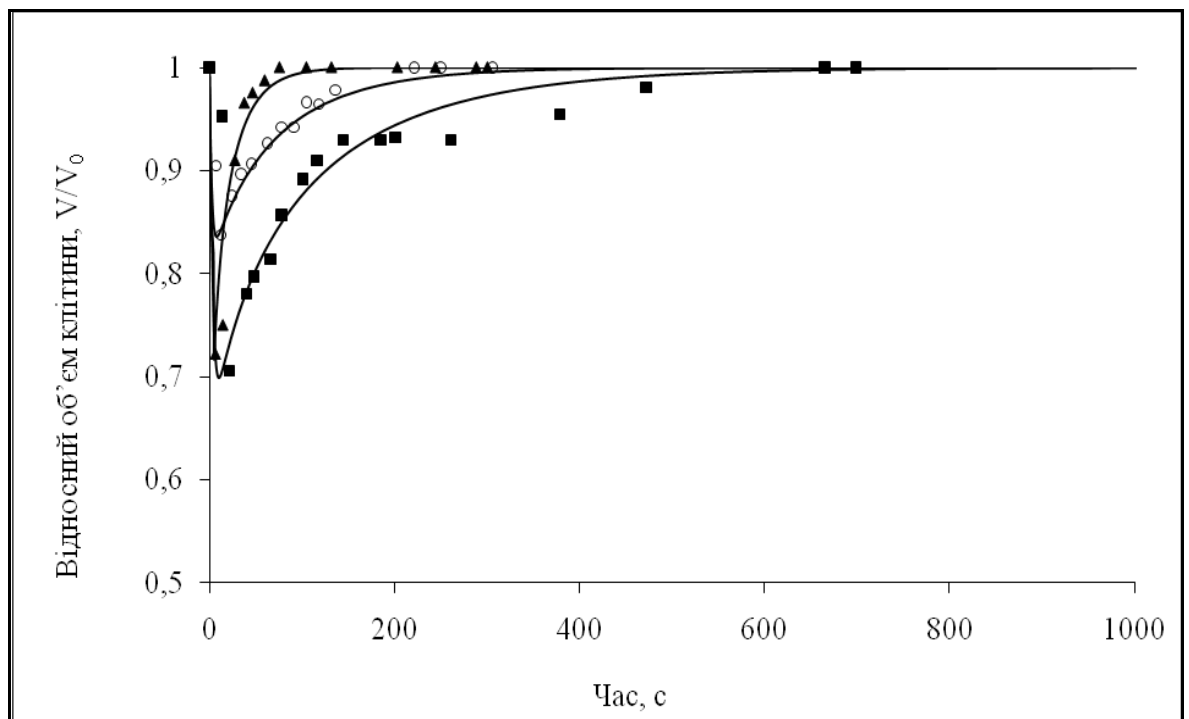


Рис. 4.2.4. Експериментальні (■, ○, ▲) і теоретичні (безперервна лінія) криві залежності зміни відносного об'єму ККР наднирників від часу експозиції в розчині, що містить 10 % ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

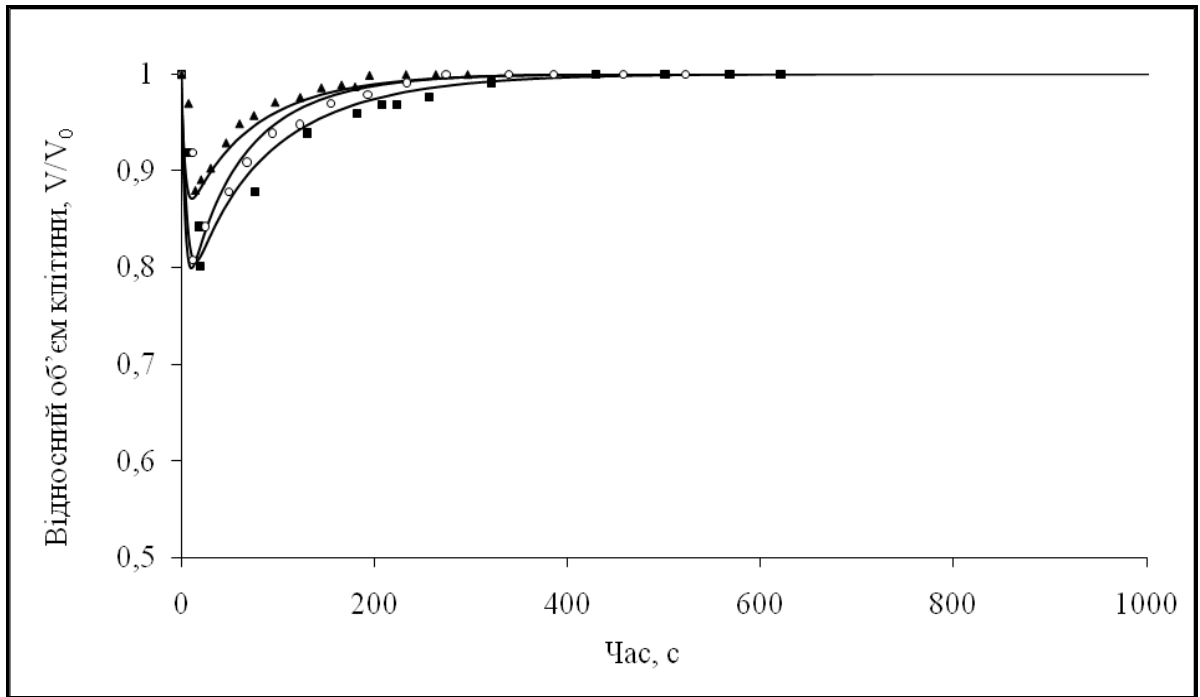


Рис. 4.2.5. Експериментальні (■, ○, ▲) і теоретичні (безперервна лінія) криві залежності зміни відносного об'єму КМР наднирників від часу експозиції в розчині, що містить 5 % ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

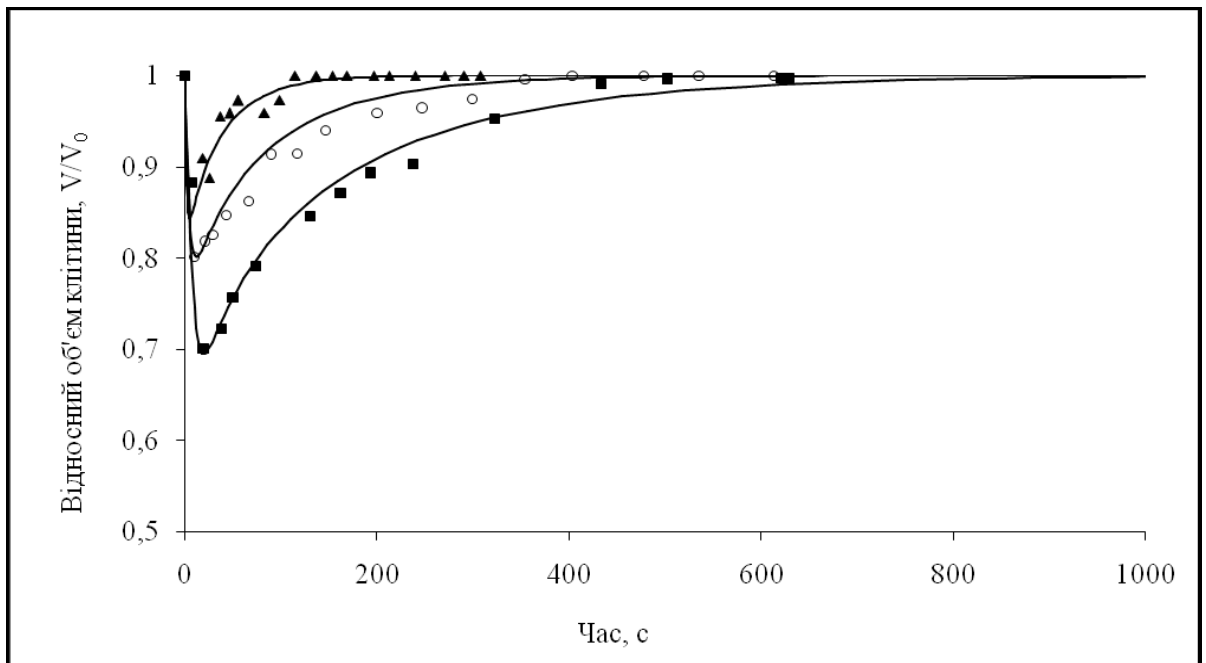


Рис. 4.2.6. Експериментальні (■, ○, ▲) і теоретичні (безперервна лінія) криві залежності зміни відносного об'єму КМР наднирників від часу експозиції в розчині, що містить 7 % ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

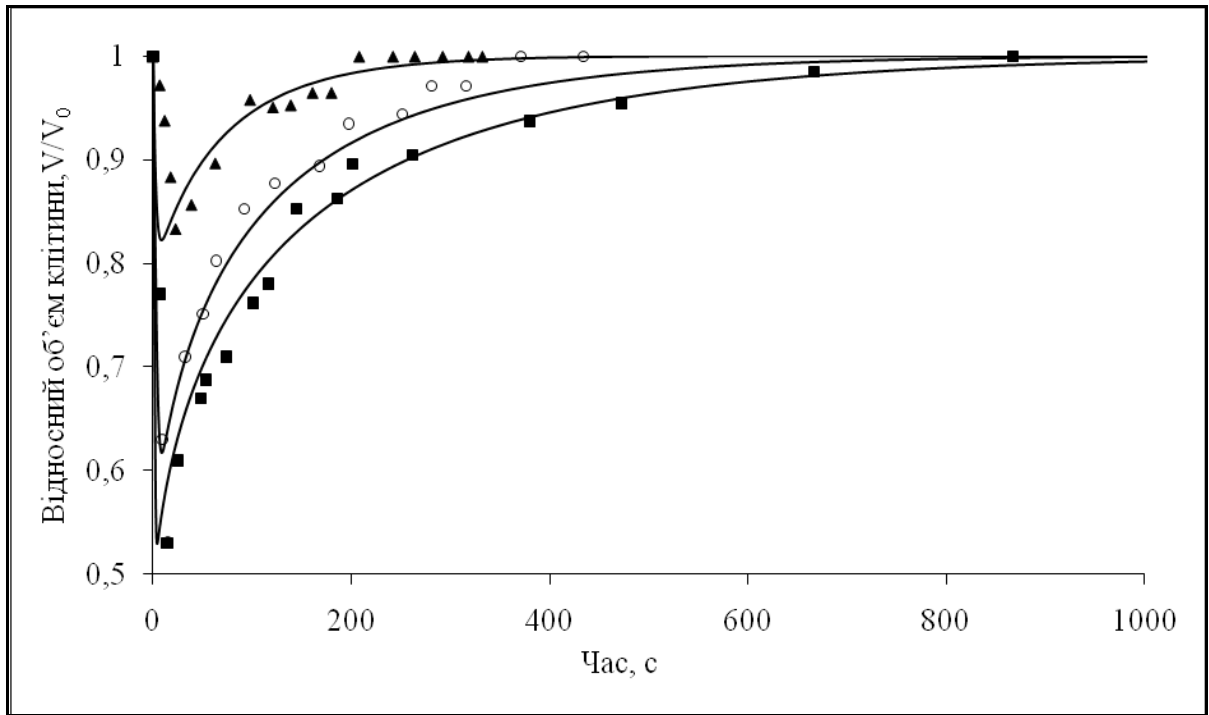


Рис. 4.2.7. Експериментальні (■, ○, ▲) і теоретичні (безперервна лінія) криві залежності зміни відносного об'єму КМР наднирників від часу експозиції в розчині, що містить 10 % ДМСО, при температурах 4 (■), 22 (○), 37 (▲) °С.

Істотними факторами, що впливають на процеси перенесення речовин при осмотичній реакції, є концентрація криопротектору і температура. Так, зі збільшенням концентрації ДМСО клітини зазнавали значних об'ємних змін. З рис. 4.2.1 – 4.2.7 видно, що при використанні розчинів ДМСО в зазначених концентраціях об'єм ККР зменшувався на 10 – 28 %. Час відновлення 95 % початкового об'єму при 4 °С становив приблизно 4 хв, а при 37 °С – 1 хв КМР виявилися більш чутливими до зміни осмотичного тиску (рис. 4.2.2 – 4.2.7). Це проявлялося в зменшенні об'єму клітин на 13 – 47 %. Час відновлення 95 % початкового об'єму при 4 °С складав близько 6 хв, а при 37 °С – 2 хв.

Відомо, що зміни клітинного об'єму при осмотичній реакції залежать не тільки від концентрації речовин поза клітиною, а й від температури. З представлених даних видно, що з пониженням температури збільшувався час регідратації клітин після фази зневоднення. При додаванні 5 % розчину ДМСО до ККР і 5, 7 і 10 % розчинів ДМСО до ККР при температурі 37 °С

спостерігалася найменша зміна клітинного об'єму. Таким чином, встановлено, що температура впливала не тільки на тривалість врівноваження, а й на величину змін клітинного об'єму.

У табл. 4.2.1 наведені розраховані коефіцієнти проникності плазматичних мембран ККР і КМР наднирників для розчинів, що містять 5, 7 і 10 % ДМСО.

З даних, представлених в табл. 4.2.1, видно, що значення коефіцієнтів проникності для молекул ДМСО збільшуються з підвищенням температури і концентрації кріопротектору в розчині. Встановлено, що проникність плазматичної мембрани ККР при температурі 22 і 37 °С вище, ніж у КМР, причому при 37 °С цей показник значно зростає.

Таблиця 4.2.1. Коефіцієнти проникності плазматичних мембран ККР і КМР наднирників для молекул ДМСО при температурах 4, 22 і 37 °С.

Концен- трація ДМСО, %	Коефіцієнт проникності $K_1 \times 10^7$ м/с					
	ККР			КМР		
	4 °С	22 °С	37 °С	4 °С	22 °С	37 °С
5	0,6±0,11	1,43±0,62	4,17±0,19	0,62±0,21	0,93±0,13	2,47±0,28
7	1,05±0,03	2,72±1,01	11,55±0,2	1,31±0,05	1,36±0,52	4,67±0,01
10	1,47±0,28	3,7±0,35	14,3±0,33	1,5±0,22	1,94±0,78	4,88±0,12

Примітка. Різниця між коефіцієнтами проникності при температурах 4, 22 і 37 °С для всіх концентрацій ДМСО вірогідна ($p < 0,05$).

Коефіцієнт фільтрації мембран ККР для води при температурі 4 °С складав $2,35 \pm 0,83 \times 10^{14}$ м³/Н х с, при 22 °С – $2,71 \pm 0,31 \times 10^{14}$ м³/Н х с, при 37 °С – $4,28 \pm 1,91 \times 10^{14}$ м³/Н х с. Для КМР коефіцієнт складав $2,51 \pm 0,83 \times 10^{14}$ м³/Н х с – при 4 °С, $2,82 \pm 0,95 \times 10^{14}$ м³/Н х с – при 22 °С, $2,85 \pm 1,03 \times 10^{14}$ м³/Н х с – при 37 °С.

У табл. 4.2.2 представлені результати розрахунку енергії активації транспорту молекул ДМСО крізь плазматичні мембрани ККР і КМР наднирників в різні температурні інтервали.

Найменша енергія активації встановлена в температурному інтервалі 4 - 22 °С для обох видів клітин. Більш високі значення енергії активації спостерігаються в діапазоні температур 22 – 37 °С.

Таблиця 4.2.2. Енергії активації транспорту молекул крізь плазматичні мембрани ККР і КМР наднирників.

Концентрація ДМСО, %	Енергія активації E_a , кДж/моль					
	ККР			КМР		
	4 – 22 °С	4 – 37 °С	22 – 37 °С	4 – 22 °С	4 – 37 °С	22 – 37 °С
5	33,35	42,15	52,53	15,57	30,05	47,94
7	31,87	55,00	83,43	20,43	27,63	36,28
10	35,66	50,06	67,42	21,34	25,62	30,57

Раніше було показано, що ДМСО є дифільною речовиною. З одного боку він проявляє виражені гідрофільні властивості (∞розчинність, висока енергія Н-зв'язку з молекулами води). З іншого боку, наявність в молекулі 2-х метильних груп забезпечує його здатність активно взаємодіяти з ліпідними компонентами мембран, про що свідчить значення коефіцієнта розподілу ДМСО в системі «н-октанол - вода» ($K_p = 0,243$). Таким чином, ДМСО здатний проникати всередину клітин, як по білковим водним каналам, так і безпосередньо крізь ліпідний матрикс [269].

Отже, можна припустити, що проникнення молекул ДМСО крізь плазматичну мембрану ККР відбувається крізь ліпідний бішар і білкові канали, а у КМР проникнення молекул ДМСО відбувається переважно крізь ліпідний бішар.

Узагальнюючи дані, отримані в цьому розділі, ми спостерігали зниження кількості, життєздатності та метаболічної активності клітин коркової речовини

наднирників (ККР, ФР 1, ФР 3) при температурі 37 °С. Щодо використаних концентрацій ДМСО 5, 7 та 10 %, то найбільший пошкоджуючий ефект мав місце при концентрації ДМСО 10 %, оскільки додатково було отримано зниження кількості 3 β -ГСД⁺ клітин.

Максимальний ступінь дегідратації для ККР був показаний при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО, однак при поверненні клітин в ізотонічні умови кількість клітин, життєздатність і кількість 3 β -ГСД⁺ клітин не знижувалась. Отже, об'ємні зміни клітин, що відбуваються при температурі 4 °С, не є пошкоджуючим фактором, який визначає збереження і життєздатність стероїдпродукуючих клітин при інкубації. Отримані дані свідчать, що температура 37 °С, хоча і є фізіологічною і чинить найменший вплив на об'ємні зміни в ККР при інкубації в криозахисному розчині (5, 7 і 10 % ДМСО) проте є не прийнятною для насичення клітин кори надниркових залоз, оскільки при цій температурі реалізується токсичний ефект криопротектору [264].

Для клітин мозкової речовини (КМР, ФР 2), отриманої двома різними способами, залежність від підвищення температури на етапі інкубації з ДМСО на показники кількості, життєздатності і метаболічної активності клітин не спостерігалася. Суспензія КМР виявилася більш чутливою до змін осмотичного тиску середовища інкубації, в порівнянні з суспензією ККР. Максимальний ступінь дегідратації для КМР був встановлений при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО, що супроводжувався зниженням кількості клітин в зразку. Отже, об'ємні зміни клітин, що відбуваються при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО здійснюють різноспрямовану дію на клітини коркової і мозкової речовин, що проявляється в збереженні клітин при інкубації.

Що стосується інкубації ККР при температурі 22 °С, то життєздатність клітин при інкубації з 7 і 10 % ДМСО не знижувалась. Наші дані співпадають з даними, отриманими в роботі [244].

Аналіз даних, поданих на рис. 4.2.4, свідчить, що при інкубації ККР з 10 % ДМСО при 37 °С спостерігається зменшення відносного об'єму клітин, який дорівнював 0,73, але й найбільш швидке його відновлення. Це підтверджується найбільш високим коефіцієнтом проникності мембран клітин до ДМСО, а також супроводжується втратою близько 30 % клітинної популяції, більша частина якої відноситься до 3β -ГСД⁺ клітин. Слід зазначити, що максимальні зміни об'єму ККР у випадку 5 % ДМСО відбувались при температурі інкубації 4 °С, тоді як у випадку 7 % ДМСО температурна складова вносила суттєвий вклад лише на етапі відновлення об'єму клітин (рис. 4.2.3).

Дослідження об'ємних змін КМР показало, що у випадку 5 % ДМСО найбільше зменшення розрахованого відносного об'єму клітин, який дорівнював 0,8, відбувалося при 4 °С. В присутності 7 і 10 % ДМСО температурна складова вносила суттєвий вклад не тільки на швидкість відновлення об'єму клітин, але й на максимальну величину стиснення клітин. При низьких температурах (4, 22 °С) КМР піддавались більш вираженій дегідратації, що може розглядатися як фактор, який призводить до порушення їх мембран [268].

Було встановлено, що інкубація ФР 1 в розчинах ДМСО не приводила до вірогідного зниження життєздатності клітин у всіх досліджених зразках, за виключенням незначного зниження метаболічної активності за даними МТТ-тесту випадку 10 % ДМСО при 37 °С. При цьому для ФР 3 критичною з точки зору втрати кількості клітин була інкубація при 37 °С в присутності 7 і 10 % ДМСО. Ці дані корелюють з показниками максимальної дегідратації клітин при відповідному режимі насичення кріопротектором. Оскільки клітини ФР3, ідентифіковані як клітини клубочкової зони, є меншими за розміром і містять меншу кількість ліпідних включень в порівнянні з клітинами ФР1, це, ймовірно, визначає їх більшу чутливість до об'ємних змін на етапі інкубації з ДМСО. Крім того, регулятором активності клітин клубочкової зони є внутрішньоклітинна концентрація K^+ і Na^+ , тому

регуляторні зміни об'єму клітин можуть привести до активації певних транспортних систем. Це може сприяти більш швидкому нефізіологічному відновленню об'єму клітин і пов'язаним з цим порушенням цитоплазматичної мембрани і білків цитоскелету.

Зміни об'єму клітин ФР2 (рис. 4.1.14) знаходяться у повній відповідності з даними, отриманими для КМР, які свідчать про вірогідне зниження кількості клітин у випадку максимальної дегідратації. Отже, особливості транспортних систем в клітинах коркової і мозкової речовин впливають на їх збереження при додаванні–видаленні кріопротектора, оскільки для клітин мозкової речовини має суттєве значення початковий рівень дегідратації, в той час як для клітин коркової речовини температура інкубації з ДМСО більшою мірою впливала на швидкість відновлення клітинного об'єму, опосередковану активацією певних транспортних систем [246, 247].

Результати опубліковані в наступних роботах:[29, 30, 31, 32, 46, 47].

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ У ПРИСУТНОСТІ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ДМСО І ШВИДКОСТЕЙ ОХОЛОДЖЕННЯ НА ВЛАСТИВОСТІ ЗСК НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ І НА ОКРЕМІ ФРАКЦІЇ КЛІТИН

Дані, представлені в попередніх розділах, дозволили визначити концентрацію ДМСО і температуру насичення кріопротектором, які не чинили цитотоксичного ефекту на ЗСК, ККР і на окремі фракції клітин, виділені в градієнті щільності фіколу. Наступним етапом роботи було дослідження впливу швидкості охолодження на дані об'єкти. Відомо, що повільні швидкості охолодження дозволяють запобігти утворення внутріклітинних кристалів льоду, які пошкоджують клітину, одна приводять до підвищення внутріклітинної концентрації солей [258, 260]. Тому для кожного типу клітин обирають оптимальну швидкість охолодження, при якій внутріклітинне кристалоутворення не відбувається, але в той же час період експозиції клітин в гіпертонічному середовищі найменший [204,236, 259, 261, 262].

5.1. Дослідження впливу швидкості охолодження на збереженість ЗСК, ККР, КМР, ФР1 і ФР3 клітин, виділених в градієнті щільності фіколу

Для оцінки ефективності кріоконсервування ми вважали необхідним визначити збереженість та життєздатність клітин після використання різних швидкостей охолодження і концентрацій ДМСО. Контролем порівняння були показники нативних клітин, які були прийняті за 100 %.

Як видно з рис. 5.1.1, кріоконсервування зі швидкостями охолодження вищими, ніж 10 °C/хв, призводило до вірогідного зменшення кількості клітин після відігрівання при використанні ДМСО в концентраціях 5 та 7 %. Значний кріозахисний ефект ДМСО в концентрації 10 % був встановлений для зразків, охолоджених зі швидкостями 40 °C/хв та шляхом занурення в \downarrow LN₂. В той же час при повільному заморожуванні 1 °C/хв з 10 % ДМСО збереженість клітин

знижувалася до найнижчого показника завдяки токсичному ефекту кріопротектору під час тривалої еквілібрації з 10 % ДМСО при температурах, вищих за 4 °С.

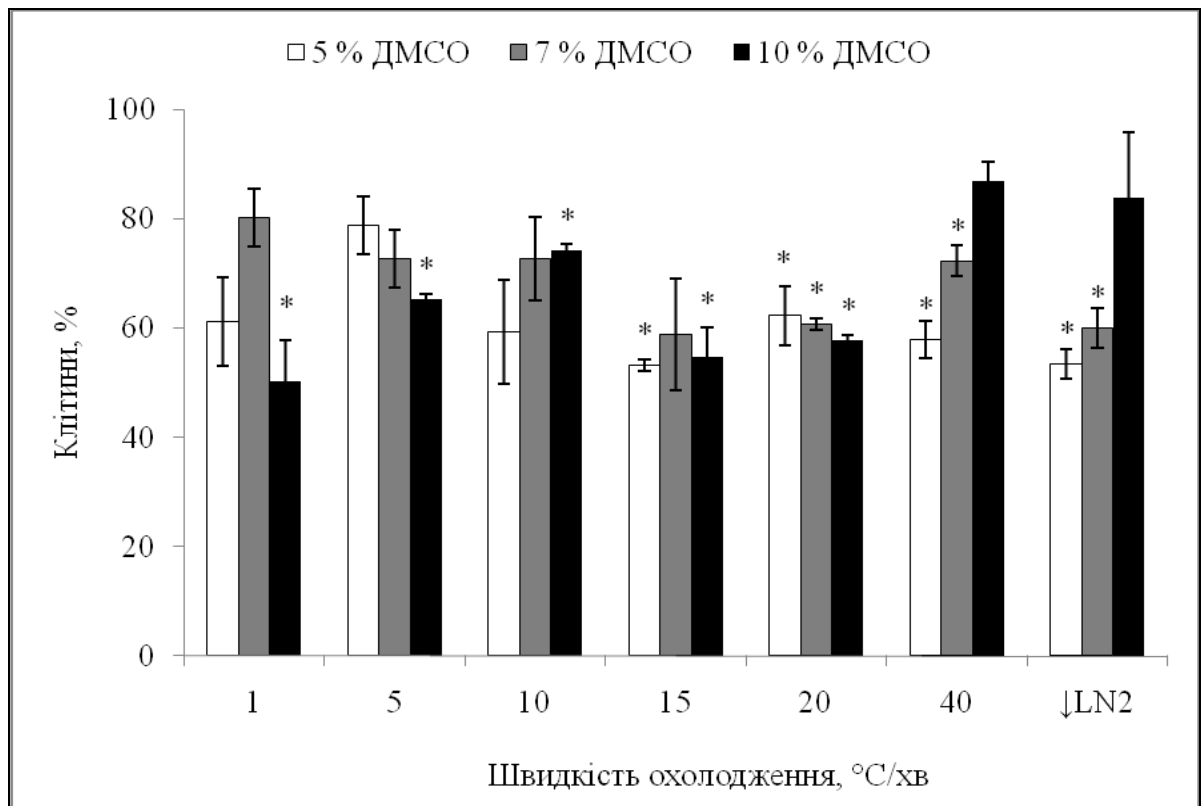


Рис. 5.1.1. Кількість ЗСК після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження: □ – 5 % ДМСО; ■ – 7 % ДМСО; ■ – 10 % ДМСО; (n=7).

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

Дані щодо життєздатності клітин після кріоконсервування подані на рис. 5.1.2. Отримані результати свідчать про те, що життєздатність клітин (оцінювали за допомогою суправитального забарвлення трипановим синім) залежить від швидкості охолодження та концентрації кріопротектору.

Найбільш виражене зниження життєздатності (40–52 %) було виявлено при швидкості охолодження 40 °С/хв і неконтрольованого охолодження шляхом занурення в рідкий азот (↓LN₂) при всіх використаних концентраціях ДМСО. Найвищу життєздатність клітин (67–77 %) виявлено при охолодженні зі швидкістю 1, 5, 10, 20 °С/хв з 7 % ДМСО і 10 °С/хв з 10 % ДМСО.

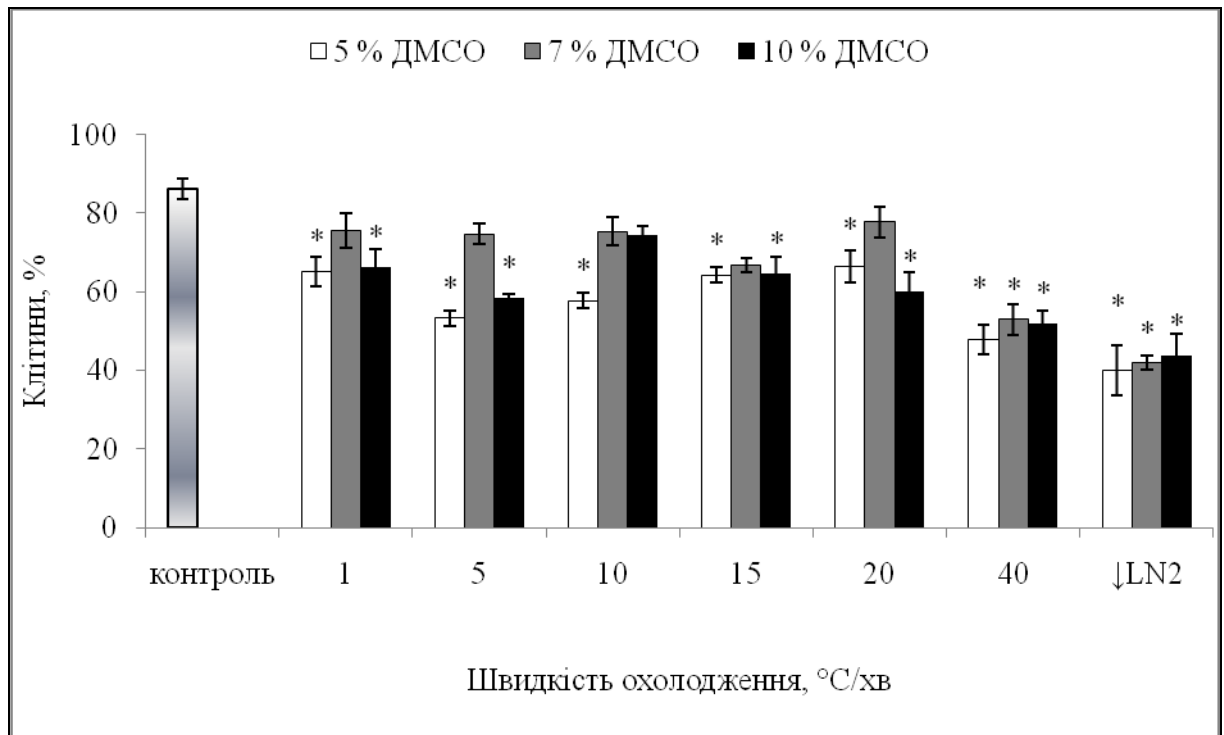


Рис. 5.1.2. Життєздатність ЗСК після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження: □ – 5 % ДМСО; ■ – 7 % ДМСО; ■ – 10 % ДМСО; (n=7). Примітка. * – відмінності вірогідні по відношенню до контролю, $p < 0,05$.

Одним з методів оцінки збереження функціональної активності стероїдпродукуючих клітин в суспензії є визначення активності ферменту 3 β -ГСД, який забезпечує конверсію прегненолону в прогестерон (стадія стероїдогенезу). Тому наявність позитивно забарвлених клітин, які мають фіолетове забарвлення відновленого тетразолію, свідчить про збереження стероїдпродукуючих клітин в суспензії.

Як видно з даних рис. 5.1.3, збереженість 3 β -ГСД⁺ клітин після кріоконсервування залишалася на рівні контрольних значень (42,05 %) у випадку охолодження зі швидкостями 1, 5 °C/хв (5 і 7 % ДМСО), 10 °C/хв (5 % ДМСО), 15 °C/хв (7 % ДМСО). Охолодження суспензії зі швидкістю 20, 40 °C/хв і занурення в ↓LN₂ призвело до зниження кількості 3 β -ГСД⁺ клітин. У випадку кріоконсервування суспензії зі швидкістю охолодження 10 °C/хв (7 %

ДМСО) збереженість 3β -ГСД⁺ клітин в порівнянні з контролем була вірогідно вищою.

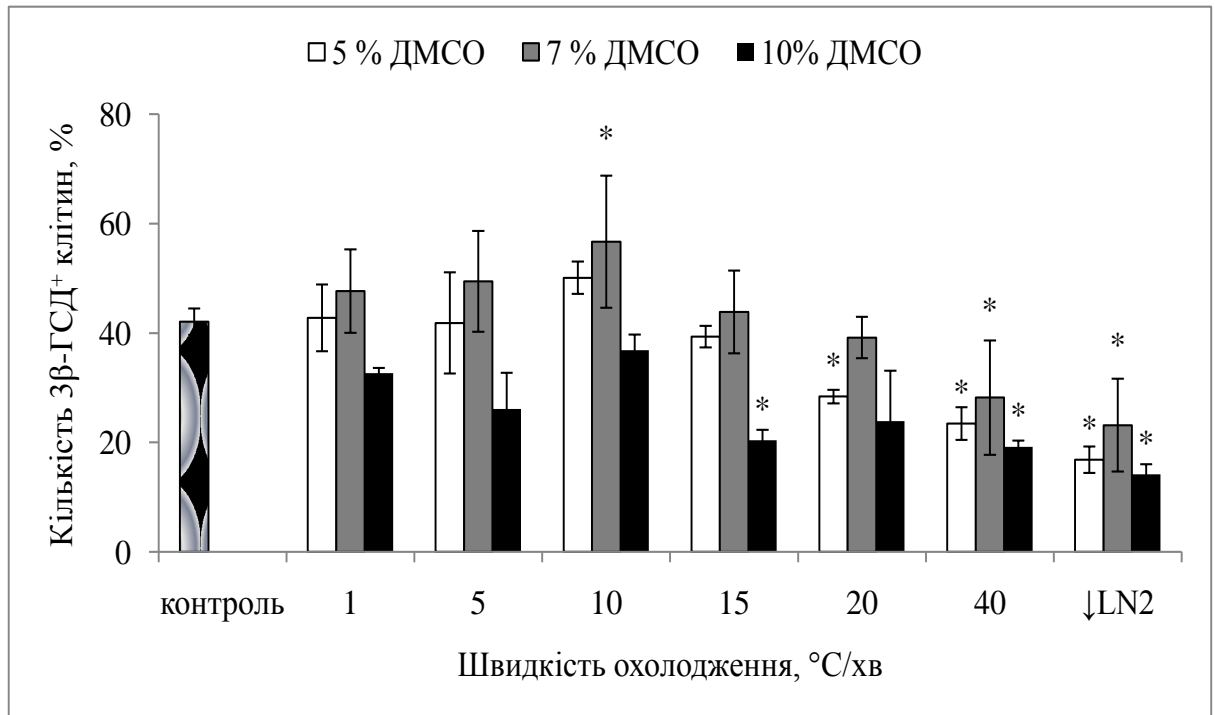


Рис. 5.1.3. Кількість 3β -ГСД⁺ клітин після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження: □ – 5 % ДМСО; ■ – 7 % ДМСО; ■ – 10 % ДМСО; (n=7).

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

На наступному етапі роботи було досліджено вплив різних швидкостей охолодження на збереження КМР надниркових залоз.

На рис. 5.1.4 представлені дані щодо збереженості та життєздатності КМР після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження під захистом 7 % ДМСО. З поданих даних можна бачити, що на відміну від ЗСК надниркових залоз, в суспензії КМР після відігріву суттєво знижувалась кількість клітин при всіх застосованих режимах кріоконсервування. Слід відмітити, що до 50 % клітин після заморожування-відігрівання зберігали здатність виключати трипановий синій. Але при цьому втрата більш ніж 50 % клітин в суспензії ставить під сумнів можливість кріоконсервування суспензії, що отримана виключно з мозкової речовини.

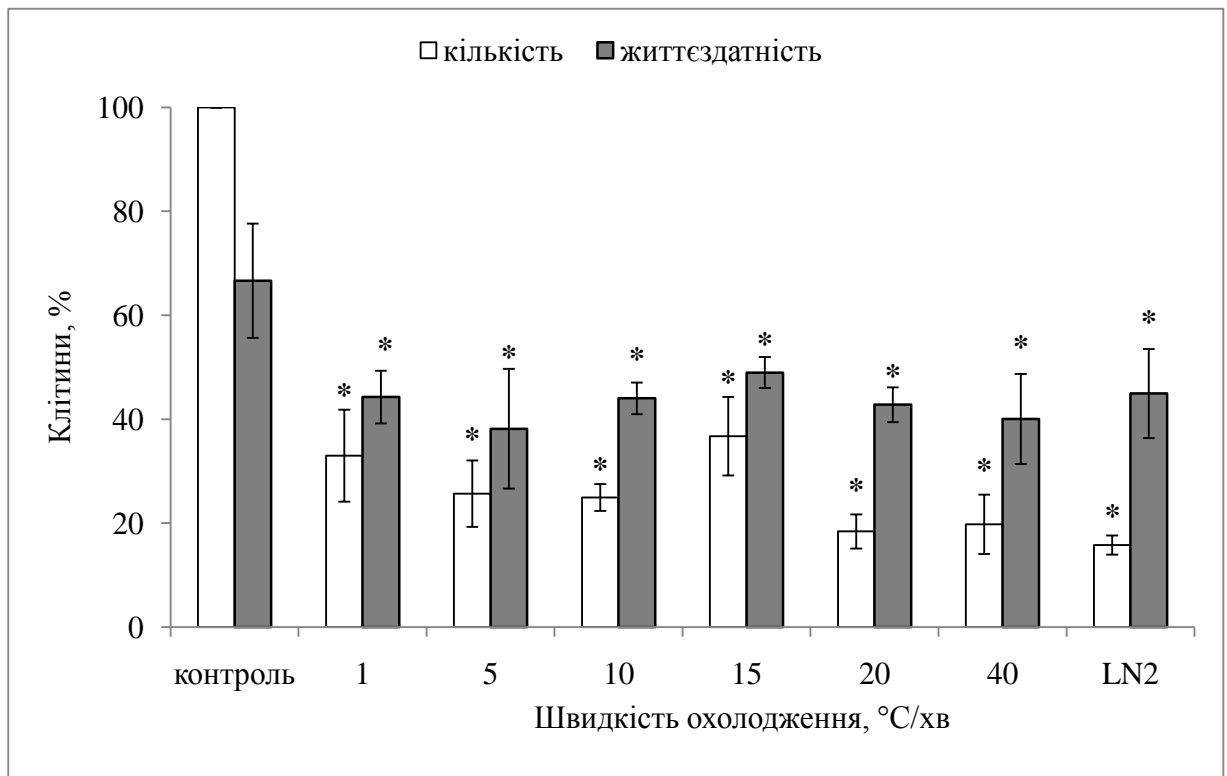


Рис. 5.1.4. Кількість і життєздатність КМР після кріоконсервування з 7 % ДМСО з різними швидкостями охолодження; (n=7).

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

Згідно даним літератури [158, 159], органотипові культури наднирників тварин після кріоконсервування у присутності 5–7 % ДМСО зі швидкостями охолодження 1–3 °С/хв зберігають здатність до синтезу та секреції гормонів. У нашому випадку кріоконсервування ЗСК з такою ж швидкістю охолодження дозволило отримати позитивні результати за такими показниками як кількість і життєздатність клітин. Можливо, КМР більш чутливі до порушення міжклітинних контактів при дезагрегації тканини надниркової залози, що робить їх більш уразливими до дії факторів низькотемпературного консервування.

Результати, що були отримані при кріоконсервуванні в присутності 7 % ДМСО з різними швидкостями охолодження суспензії ККР, подані рис. 5.1.5.

Аналізуючи дані, видно, що кріоконсервування з 7 % ДМСО суспензії ККР, отриманої безпосередньо з коркової речовини надниркових залоз,

призводить до різкого зниження показника кількості клітин у порівнянні з відповідним показником ЗСК.

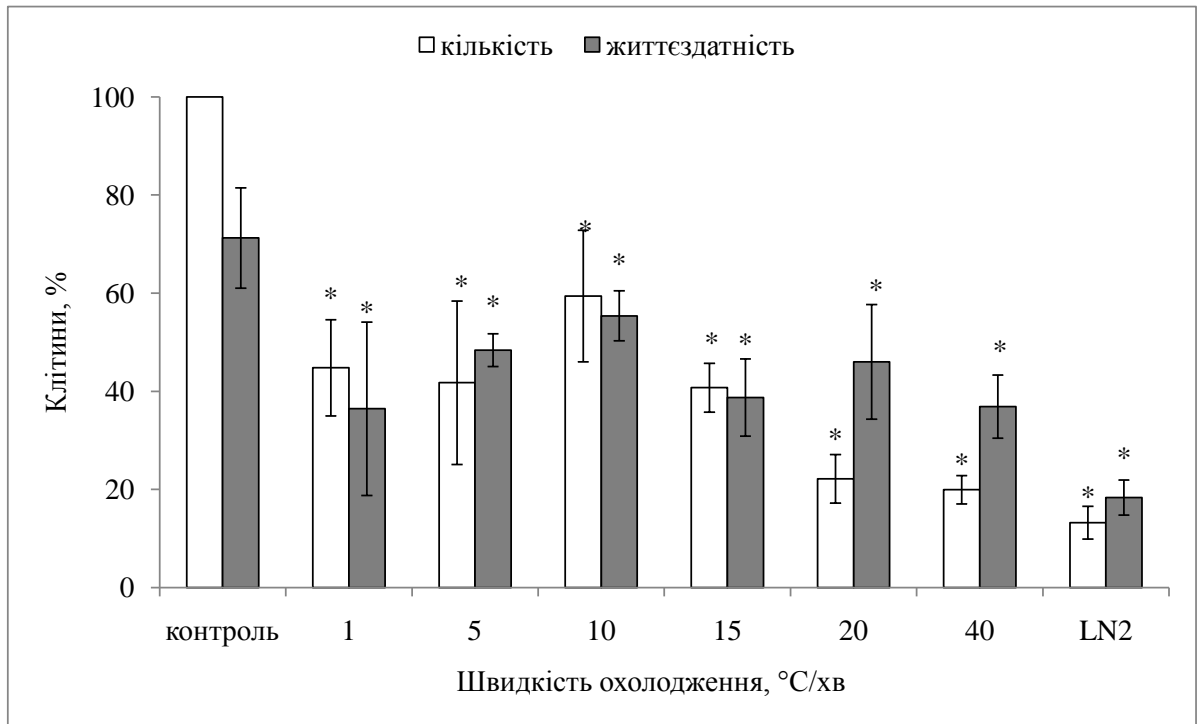


Рис. 5.1.5. Кількість і життєздатність ККР після кріоконсервування з 7 % ДМСО з різними швидкостями охолодження; (n=7).

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

Після кріоконсервування зі швидкостями охолодження 1, 5, 10 °C/хв суспензія ККР містила 45–58 % клітин, у порівнянні з 75–85 % збережених клітин у випадку ЗСК при відповідному режимі кріоконсервування. В діапазоні швидкостей охолодження 20, 40 °C/хв та у випадку неконтрольованого занурення в рідкий азот (\downarrow LN₂) збереженість суспензії ККР складала не більше, ніж 18–20 %, в порівнянні з 60 % збережених клітин у випадку ЗСК при відповідному режимі кріоконсервування.

Відомо, що коркова речовина надниркових залоз містить три типи стероїдсинтезуючих епітеліальних клітин, що відрізняються за гістологічною будовою. Метою наступного етапу було дослідити вплив швидкостей охолодження на різні типи клітин, що були розподілені в градієнті щільності фіколу. Згідно даним, наведеним в розділі 3, дві фракції клітин, що

виділяються в градієнті щільності фіколу – ФР1 і ФР3, є перспективними об'єктами для подальшого дослідження.

На рис 5.1.6 представлені дані щодо впливу швидкостей охолодження на кількість, життєздатність та кількість 3β -ГСД⁺ клітин у ФР1, що була виділена в градієнті щільності фіколу (1,025 – 1,033 г/см³).

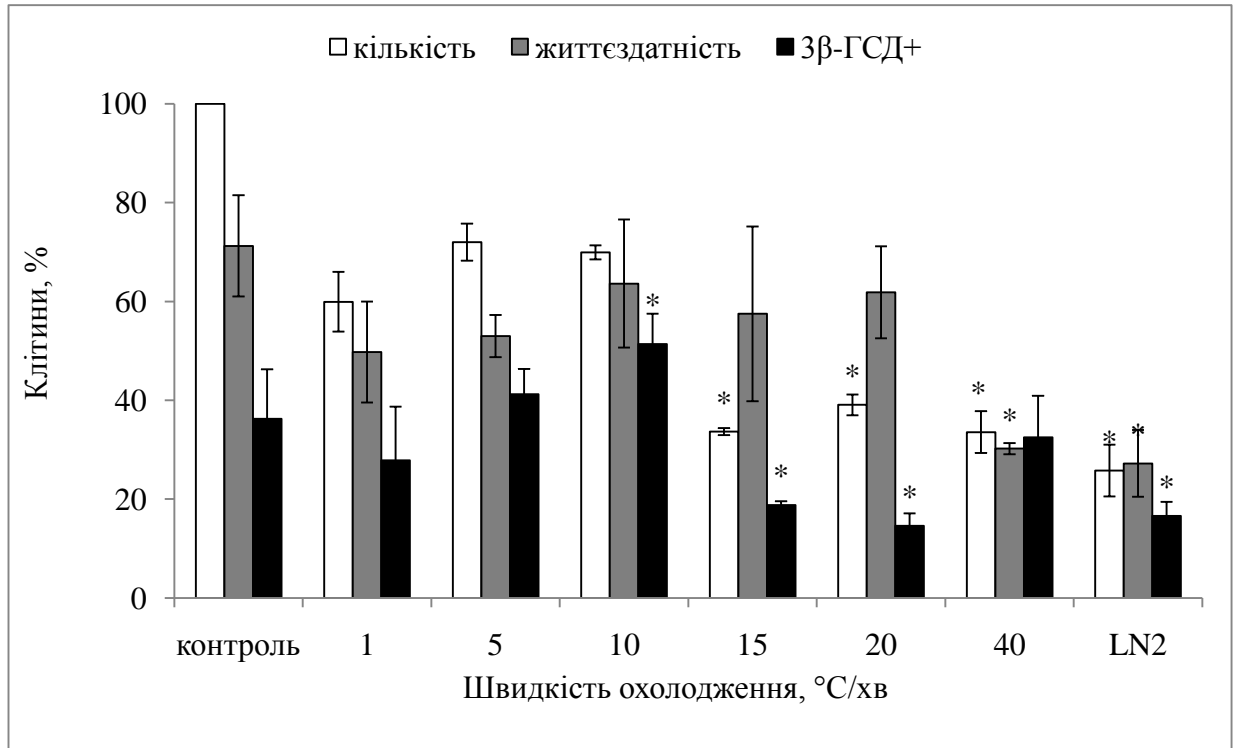


Рис. 5.1.6. Кількість, життєздатність і кількість 3β -ГСД⁺ клітин у ФР 1 після кріоконсервування з 7 % ДМСО з різними швидкостями охолодження; (n=7).

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

Видно, що при використанні швидкостей охолодження 1, 5, 10 °С/хв зберігається 60–75 % клітин тобто на рівні відповідних значень для ЗСК. Застосування більш високих швидкостей охолодження призводило до значного зниження кількості клітин ФР 1. Звертає на себе увагу і той факт, що життєздатність кріоконсервованих зразків ФР 1 (швидкості охолодження 1, 5, 10, 15, 20 °С/хв) складає 50–60 %. Але максимальна збереженість 3β -ГСД⁺ клітин спостерігалась лише за умов швидкості охолодження 10 °С/хв. Аналогічні дослідження були проведені для ФР 3 (рис. 5.1.7).

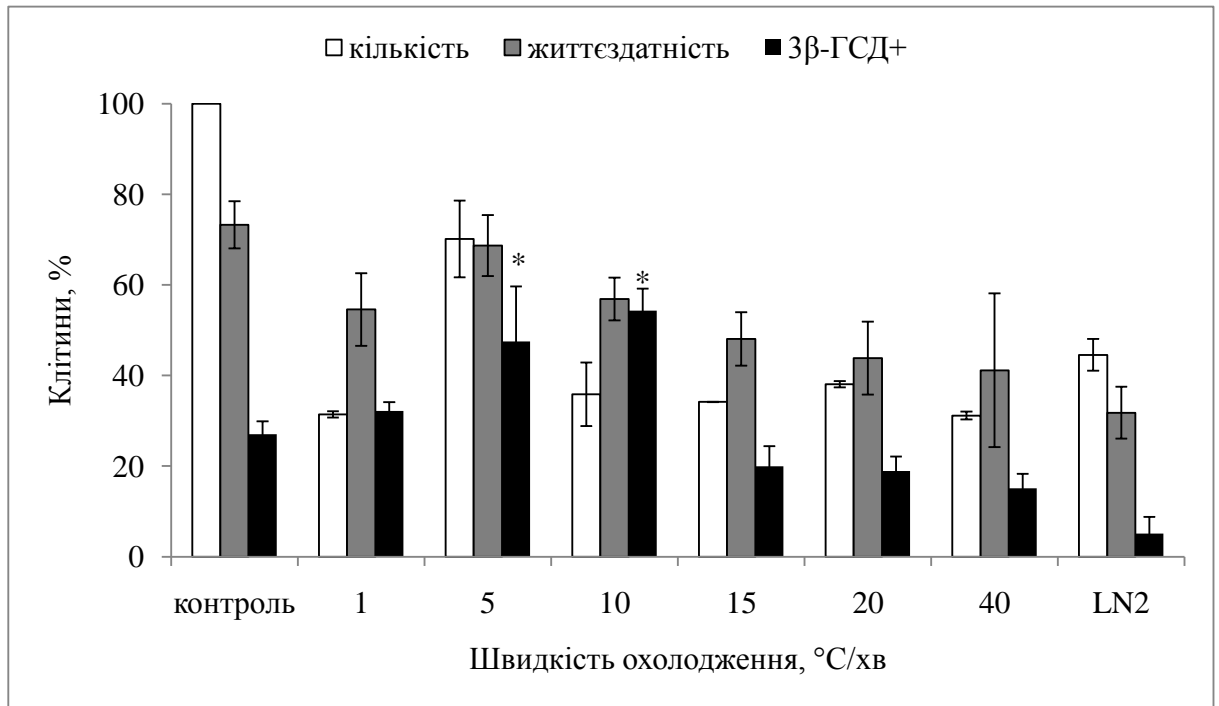


Рис. 5.1.7. Кількість, життєздатність і кількість 3β-ГСД⁺ клітин у ФР 3 після кріоконсервування з 7 % ДМСО з різними швидкостями охолодження; (n=7).

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

Згідно даних, представлених у розділі 3, ФР 3 містить високий відсоток 3β-ГСД⁺ клітин, та характеризується наявністю клітин, здатних до продукції альдостерону. Найбільшу кількість і життєздатність клітин у ФР 3 забезпечує режим кріоконсервування зі швидкістю охолодження 5 °С/хв. Життєздатність клітин ФР 3 не відрізнялася в зразках, які були кріоконсервовані зі швидкостями охолодження 1 і 10 °С/хв. Найбільша кількість 3β-ГСД⁺ клітин була зареєстрована за умов заморожування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв., при цьому кількість життєздатних клітин практично співпадає з кількістю 3β-ГСД⁺ клітин. При використанні швидкості охолодження 5 °С/хв також зберігався високий відсоток 3β-ГСД⁺ клітин, але у цьому випадку вищою була також і життєздатність клітин в цілому в порівнянні з кріоконсервуванням цієї популяції зі швидкістю охолодження 10 °С/хв. Тобто не було виявлено кореляції між відсотком життєздатних клітин і кількістю

3 β -ГСД⁺ клітин. Це може означати, що у даному випадку у ФР 3 присутні не ідентифіковані нами клітини, або використаний метод підрахунку кількості клітин не є достатньо адекватним. Саме тому подальші експерименти були спрямовані на порівняння кількості клітин до і після криоконсервування за умов використання інших методів оцінки.

Розділ 5.2. Цитофлуориметричний і флуоресцентний аналіз впливу умов криоконсервування на ЗСК надниркових залоз

Раніше було показано, що забарвлення трипановим синім може завищувати показник життєздатності суспензії клітин, оскільки цей барвник відображає лише цілісність клітинної мембрани [4]. Тому для оцінки життєздатності клітин до та після криоконсервування було використано також забарвлення ФДА, яке враховує як активність внутрішньоклітинних естераз, так і цілісність цитоплазматичної мембрани (рис. 5.2.1).

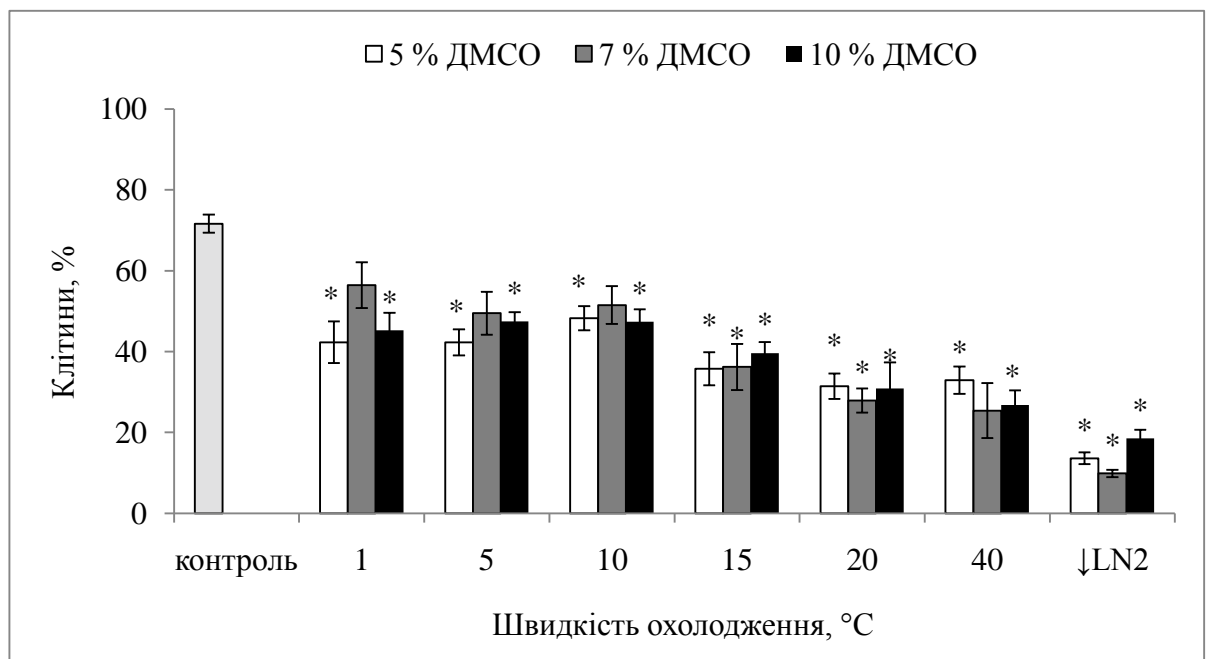


Рис. 5.2.1 Життєздатність (за включенням ФДА) ЗСК після криоконсервування з різними швидкостями охолодження: □ – 5 % ДМСО; ■ – 7 % ДМСО; ■ – 10 % ДМСО (n=7). Примітка: * – відмінності вірогідні по відношенню до контролю, p<0,05.

Як можна бачити, використання методу забарвлення клітин ФДА показав більш суттєвий негативний вплив криоконсервування на ЗСК надниркових

залоз у порівнянні з суправітальним забарвленням трипановим синім. Метаболічна активність клітин, яку розраховували за оцінкою забарвлення ФДА, знижувалась після кріоконсервування з усіма дослідженими режимами кріоконсервування.

Найменшу кількість ФДА⁺ клітин було виявлено при використанні швидкостей охолодження вище, ніж 10 °С/хв. Метаболічна активність зразків, охолоджених шляхом занурення в рідкий азот, в присутності всіх досліджених концентрацій кріопротектору ДМСО, була знижена на 82-90 % від відповідних значень до охолодження. Найвищі показники життєздатності клітин зберігалися за умов використання швидкостей охолодження 1, 5, 10 °С/хв і концентрації ДМСО 7%.

Було встановлено, що суспензія, отримана з надниркових залоз містить декілька типів клітин, які можуть відрізнятися за своєю чутливістю до факторів кріоконсервування. Це, в свою чергу, може завищувати або занижувати ефективність кріоконсервування. В розділі 3 було встановлено, що еритроцити складають значну кількість клітин в ЗСК надниркових залоз. Саме тому для оцінки відсоткового вмісту ядровмісних і без'ядерних клітин в суспензії після кріоконсервування був застосований метод проточної цитофлюориметрії.

Для оцінки життєздатності клітин до та після кріоконсервування було використано подвійне забарвлення ФДА і ПЙ. При забарвленні клітин спостерігалось одночасне включення ФДА (зелена флуоресценція) і ПЙ (червона флуоресценція), що свідчило про життєздатність ядровмісних клітин. Наявність тільки червоної флуоресценції свідчило про нежиттєздатність ядровмісних клітин. Підрахунок об'єктів, що не були забарвлені ПЙ, дозволяв виявити наявність без'ядерних клітин (рис.5.2.2).

Аналіз ЗСК методом проточної цитофлюориметрії показав, що при забарвленні ФДА і ПЙ, були виділені наступні групи клітин: життєздатні ядровмісні клітини, що накопичували ФДА і ПЙ, та група клітин без флуоресценції.

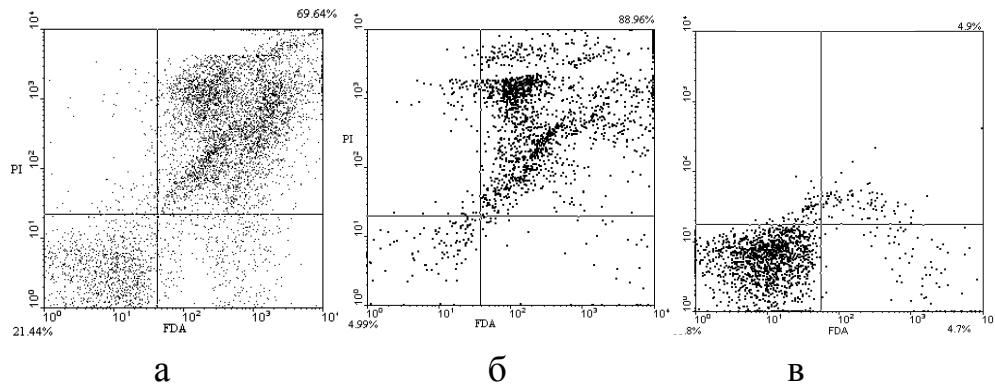


Рис. 5.2.2. Цитофлюориметричний аналіз ЗСК за умов використання флуоресцентних барвників ФДА/ПІ: а – контроль (до охолодження); б – кріоконсервування зі швидкістю охолодження 1 °С/хв з 7 % ДМСО; в – кріоконсервування з неконтрольованою швидкістю охолодження (\downarrow LN₂) з 7 % ДМСО.

Кількісний аналіз вмісту цих клітин у суспензіях подано у таблиці 5.2.1. Видно, що зі збільшенням швидкості охолодження зменшується відсотковий вміст ядровмісних клітин і зростає кількість без'ядерних клітин.

Таблиця. 5.2.1. Кількість ядровмісних і без'ядерних клітин (%) в ЗСК до (К) і після кріоконсервування

ДМСО ,%	Швидкість охолодження, °С/хв						\downarrow LN ₂	К
	1	5	10	15	20	40		
Ядровмісні клітини, %								
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	*	*	*	*	*	*	*	
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, %								
5	7,3±1,92	9,27±1,02	35,75±0,55	45,26±3,4	56,43±3,95	62,89±3,38	63,61±1,42	27,97 ±1,18
7	*	*	*	*	*	*	*	
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±3,6	

Примітка. * – відмінності достовірні по відношенню до контролю, $p < 0,05$.

В розділі 3 було зазначено, що наявність ліпідних крапель в цитоплазмі стероїдпродукуючих клітин є показником наявності запасів холестеринових ефірів або тригліцеридів, які застосовуються клітинами для синтезу гормонів. Тому було досліджено вплив швидкостей охолодження на збереження НЧ⁺ клітин до і після криоконсервування з різними швидкостями охолодження.

Отримані дані (рис. 5.2.3) свідчать про значне зниження кількості клітин, що містять ліпідні краплі, після криоконсервування зі швидкостями охолодження 15, 20, 40 °С/хв і неконтрольованою швидкістю охолодження (↓LN₂).

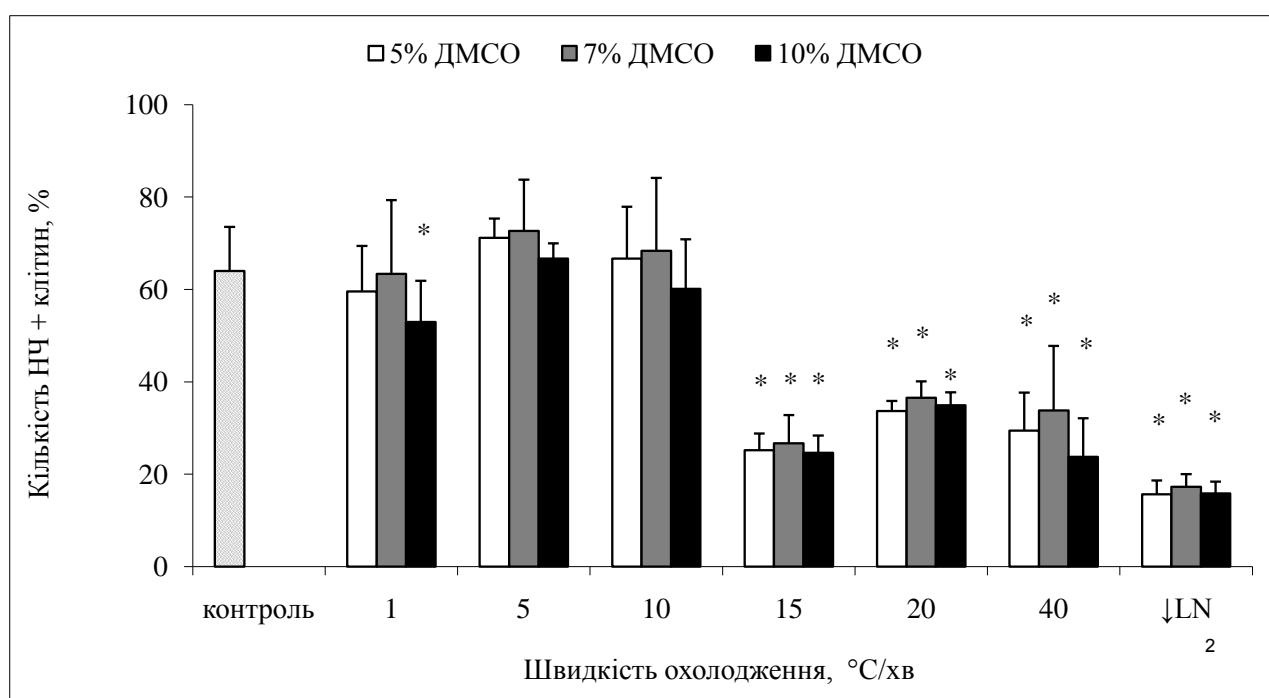


Рис. 5.2.3. Кількість НЧ⁺ клітин у ЗСК надниркових залоз до і після криоконсервування з різними швидкостями охолодження: □ – 5 % ДМСО; ■ – 7 % ДМСО; ■ – 10 % ДМСО; (n=7).

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

Зразки, криоконсервовані зі швидкістю охолодження 1 °С/хв (5 і 7 % ДМСО), 5 і 10 °С/хв (5, 7, 10 % ДМСО) зберігають кількість клітин, забарвлених НЧ, на рівні контрольних значень (63,98 %). Таким чином, достовірних відмінностей між контрольним значенням і даними після заморожування за режимами з повільними (1 (5 і 7 % ДМСО), 5, 10 °С/хв)

швидкостями охолодження не встановлено. У той же час режими з високими і неконтрольованими швидкостями охолодження значно знижують цей показник, що свідчить на користь того, що кріоконсервування суспензії клітин зі швидкістю охолодження, вище $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, сприяє загибелі саме стероїдпродукуючих клітин.

Таким чином, використання швидкості охолодження $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ і 7 % ДМСО для заморожування надниркових залоз сприяє збереженню найбільшої кількості $3\beta\text{-ГСД}^+$ клітин. Враховуючи дані про вплив швидкості охолодження на життєздатність ЗСК надниркових залоз щурів, стало очевидним, що заморожування з контрольованими швидкостями охолодження, вищими за $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, і використання неконтрольованої швидкості охолодження значно знижують показники життєздатності стероїдпродукуючих клітин надниркових залоз.

Застосування повільних швидкостей охолодження, нижче $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, призводить до зниження кількості життєздатних клітин у порівнянні з контрольними зразками до охолодження, однак дозволяє зберегти максимальну кількість клітин в цілому. Також, цитофлуориметричний аналіз показав, що ЗСК надниркових залоз включає досить великий відсоток еритроїдних клітин, але використаний в наших дослідженнях кріопротектор та швидкості охолодження не є адекватними для їх збереження. Таким чином, для кріоконсервування ЗСК надниркових залоз щурів необхідно використовувати низькі (до $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) швидкості охолодження, які дозволяють отримати найбільшу кількість життєздатних стероїдпродукуючих клітин.

В роботах інших авторів показано, що кріоконсервовані клітини надниркових залоз новонароджених поросят після відігрівання здатні нарощувати гормональну активність при культивуванні [150, 152, 158, 159, 162]. Саме тому наступні дослідження були спрямовані на вивчення здатності клітин надниркових залоз після деконсервування формувати первинні культури.

5.3. Морфологічні характеристики первинної культури ЗСК наднирників до та після кріоконсервування в присутності 7 % ДМСО

Для оцінки ефективності режиму кріоконсервування ЗСК була проведена оцінка здатності кріоконсервованих клітин до прикріплення на підложку культивування (рис. 5.3.1).

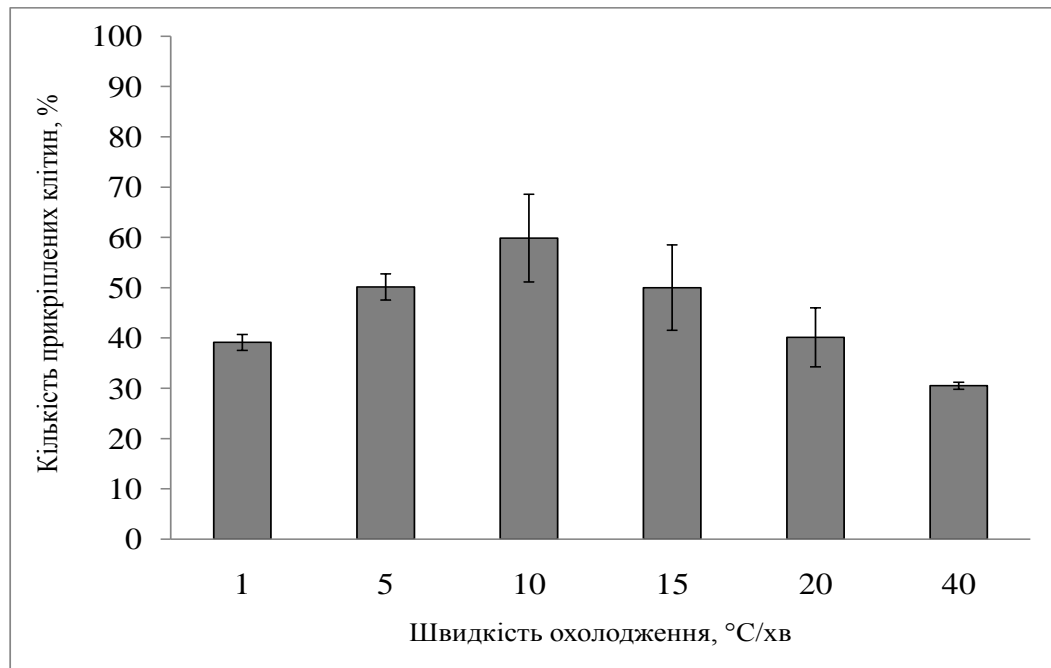


Рис. 5.3.1. Адгезивна активність ЗСК після кріоконсервування з різними швидкостями охолодження в присутності 7 % ДМСО відносно нативного контролю.

Аналізуючи дані, можна бачити, що кріоконсервування призводить до суттєвого пригнічення здатності кріоконсервованої ЗСК до прикріплення. При кріоконсервуванні з відносно повільними режимами охолодження лише 50 % клітин, в порівнянні з нативним контролем (90 %), прикріплялися до пластикової підложки в першу добу культивування. При охолодженні зі швидкістю, вищою ніж 10 °C/хв, адгезивна здатність кріоконсервованих клітин знижувалась. Найбільша адгезивна здібність була притаманна зразкам, що були кріоконсервовані зі швидкістю охолодження 10 °C/хв та відрізнялася від контролю на 35–40 %.

Морфологічний аналіз ЗСК, яка була кріоконсервована зі швидкістю охолодження 5, 10 та 15 °С/хв показав, що на 3 добу культивування спостерігалися поодинокі розпластані клітини, які розрізнялись як за розміром, так і за формою (рис. 5.3.2).

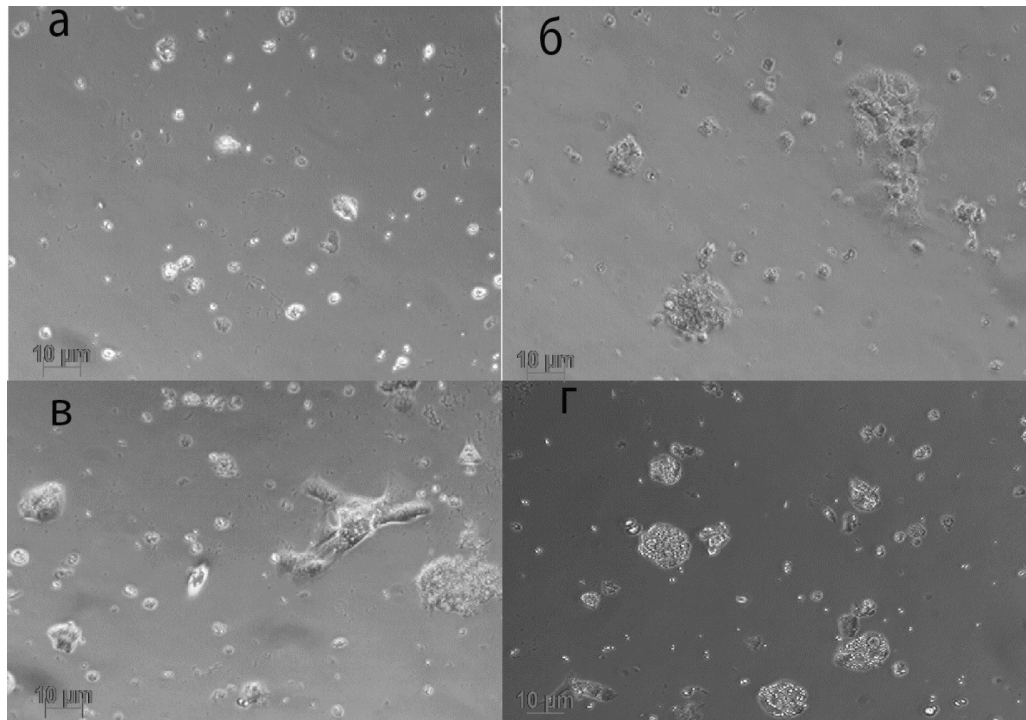


Рис. 5.3.2. Кріоконсервована ЗСК надниркових залоз щурів на 3 добу культивування: а – швидкість охолодження 1 °С/хв; б – швидкість охолодження 5 °С/хв; в – швидкість охолодження 10 °С/хв; г – швидкість охолодження 15 °С/хв.

У випадку клітин, які до культивування кріоконсервували зі швидкістю охолодження 5 °С/хв, можна бачити (рис. 5.3.2, б) невеликі полігональні або веретеноподібні клітини (завдовжки до 10 мкм). Після охолодження зі швидкістю 10 °С/хв – полігональні або веретеноподібні клітини з більш довгими відростками, завдовжки до 10-15 мкм (рис, 5.3.2, в), після охолодження зі швидкістю 15 °С/хв (рис. 5.3.2, г) – округлі та поодинокі веретеноподібні клітини. Крім того, були виявлені багатоклітинні «острівці», що були повністю або частково прикріплені до поверхні культивування. В усіх

кріоконсервованих зразках також були присутні численні поодинокі навпіл прикріплені клітини, які мали округлу форму.

На 7 добу культивування нативна культура (рис 5.3.3, а) сформувала моношар, що займав до 60 % підложки. У випадку культури, що була кріоконсервована зі швидкістю охолодження 5 °С/хв виявлено нечисленні групи розпластаних клітин веретеноподібної форми (рис 5.3.3, б). У культурі, яка була отримана після кріоконсервування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв (рис. 5.3.3, в), також були виявлені острівці розпластаних клітин, що займали до 30 % підложки. В інших досліджених зразках культур спостерігали поодинокі округлі клітини та численний клітинний дебрис (рис.5.3.3, г).

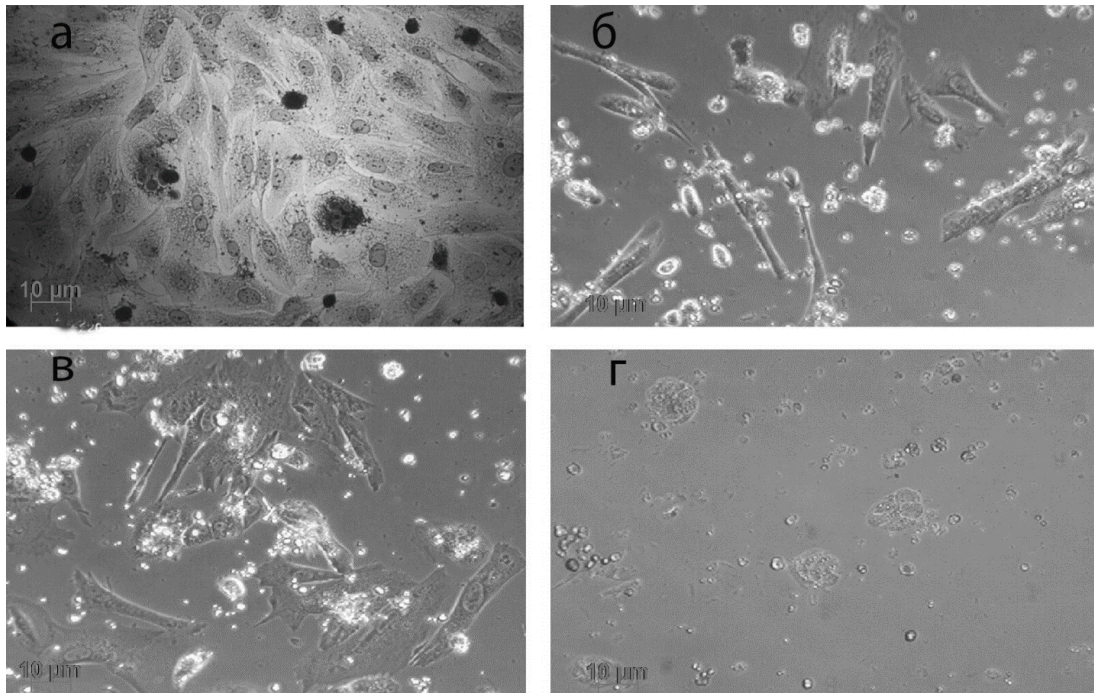


Рис. 5.3.3. Культура ЗСК надниркових залоз щурів на 7 добу культивування: а – нативна ЗСК (контроль); б – охолодження зі швидкістю 5 °С/хв; в – охолодження зі швидкістю 10 °С/хв; г – охолодження зі швидкістю 15 °С/хв.

На 7 добу культивування в нативній культурі ЗСК за морфологічними ознаками клітини можливо умовно розподілити на три групи:

фібробластоподібні, полігональні та невеликі округлі. Фібробластоподібні клітини мають веретеноподібну форму, іноді короткі відростки. Полігональні клітини більші за розміром, мають численні широкі відростки, одне велике ядро з двома ядерцями, що оточені значною кількістю цитоплазми з численними включеннями. Маленькі клітини мають щільне темне ядро та вузький ободок з темної цитоплазми, що оточує ядро.

В таблиці 5.3.1 представлені дані щодо розподілу клітин в стані мітозу та за формою в нативній і кріоконсервованій (швидкість охолодження 10 °С/хв) первинній культурі.

Таблиця 5.3.1. Розподіл клітин в стані мітозу та за формою в нативній і кріоконсервованій (швидкість охолодження 10 °С/хв) первинній культурі

Тип первинної культури	Клітини в стані мітозу, %	Розподіл клітин за формою, %		
		Фібробластоподібні	Полігональні	Округлі
Нативна (контроль)	7,15 (6,21-7,83)	19,04 (17,02-22,11)	53,04 (46,52-56,19)	38,78 (28,25-45,08)
Кріоконсервована	13,10 (9,09- 21,62)*	25,06 (9,25-30,38)	34,41 (27,51-53,84)	38,75 (26,70-48,61)

Примітка: * – відмінності вірогідні відносно відповідного контролю, $p < 0,05$

Кількісні дані, представлені в таблиці 5.3.1, свідчать, що в кріоконсервованій первинній культурі в цілому зберігається розподіл клітин в популяції, аналогічно контрольній культурі, хоча має місце не значне зниження кількості полігональних клітин за рахунок збільшення кількості фібробластоподібних клітин. Тим не менш, кріоконсервування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв в присутності 7 % ДМСО дозволяє зберегти гетерогенність ЗСК надниркових залоз. Звертає на себе увагу той факт, що обидва типи первинних культур (контрольна та кріоконсервована) містять

клітини, що мають два ядра або ознаки мітотичних фігур. При чому, кількість клітин в стані мітозу в культурі, отриманій з кріоконсервованої суспензії надниркових залоз, вірогідно вище, ніж в нативній культурі.

На 14 добу культивування первинна нативна культура формувала конфлюентний моношар і морфологічно була представлена, в основному, фібробластоподібними клітинами. На відміну від цього в кріоконсервованій первинній культурі моношар займав до 65 % і зберігав розподіл клітин за формою, який було отримано на більш ранніх строках культивування.

У роботах ряду авторів було показано, що на 10-14 добу культивування первинна культура надниркових залоз, отримували від фетальних [218, 251] або дорослих [228] здорових донорів, втрачає морфологічну гетерогенність і представлена, в основному, фібробластоподібними клітинами. Причому, клітини, що мали морфологічні характеристики, притамані пучковій зоні надниркових залоз, при культивуванні зберігали полігональну форму та реагували на цАМФ округленням та втягуванням. В той же час клітини клубочкової зони наднирників приймали витягнуту веретеноподібну форму, втрачали здатність реагувати на додавання стимуляторів гормонопродукції зміною форми [229]. Тим не менш, паренхіматозне, а не стромальне, походження клітин первинної культури було підтверджено завдяки експресії ряду ферментів, що відповідають за синтез відповідних гормонів, та секрецію клітинами культури глукортикоїдів та мінералокортикоїдів в середовищі інкубації [227, 218]. У зв'язку з цим, ми також провели подальшу характеристику первинної культури, отриманої з ЗСК, для дослідження функціональних характеристик клітин за допомогою забарвлення флуоресцентними барвниками НЧ та JC1 (рис. 5.3.4).

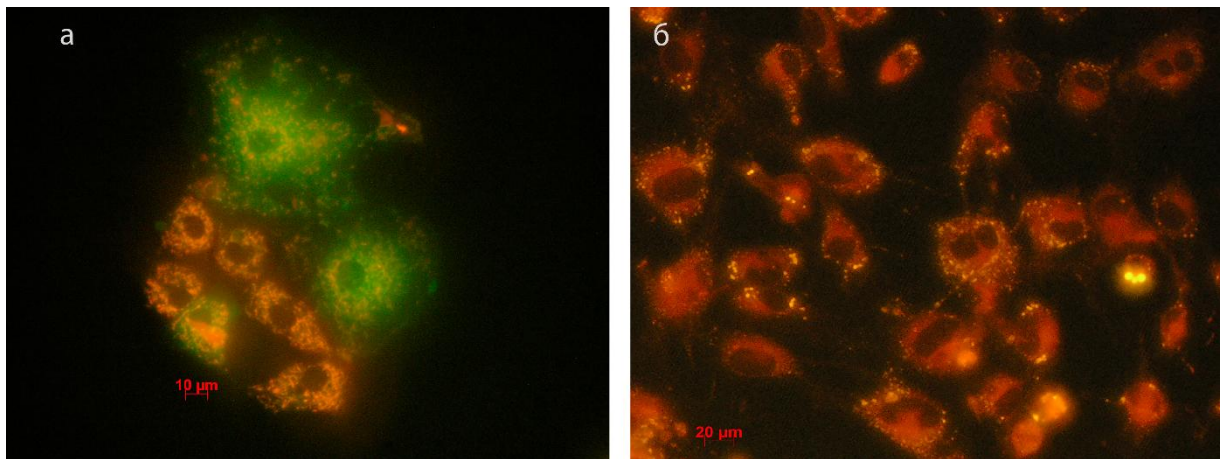


Рис. 5.3.4. Забарвлення JC-1 (а) та НЧ (б) клітин первинної культури, отриманої на 7 добу культивування: а) червона або помаранчева флуоресценція при забарвленні JC-1 свідчить про поляризацію мітохондріальної мембрани, зелена флуоресценція є ознакою деполаризації мітохондріальної мембрани; б) яскраво жовті включення в цитоплазмі клітин свідчать про накопичення НЧ в ліпідних краплях клітин.

Відомо, що ключовим етапом синтезу стероїдних гормонів в клітинах надниркових залоз є перетворення холестерину в прегненолон за участю гострого регуляторного стероїдогенного білка (StAR) [84]. За його допомогою холестерин доставляється до ферменту P450_{scc}, що знаходиться на внутрішній мембрані мітохондрії. При наявності на внутрішній мембрані мітохондрій негативного заряду JC-1 формує агрегати, що мають червоно-помаранчеву флуоресценцію. При деполаризації мембрани, агрегати барвника перетворюються на мономери, що мають зелену флуоресценцію [250].

В таблиці 5.3.2 представлені дані щодо розподілу клітин первинної культури, отриманої із ЗСК після криоконсервування з 7 % ДМСО та швидкістю охолодження 10 °C/хв, які мали подвійну або тільки зелену флуоресценцію.

Згідно отриманих даних, 80,57 % клітин криоконсервованої первинної культури накопичували JC-1 у формі агрегатів, що свідчило про збереженість

потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій. Розподіл клітин з червоно-помаранчевою флуоресценцією між різними морфологічними типами клітин культури вірогідно не відрізнявся. Таким чином, застосований нами режим кріоконсервування дозволяє зберегти мітохондріальну активність клітин усіх морфологічних типів первинної кріоконсервованої культури.

Таблиця 5.3.2. Розподіл клітин первинної культури, отриманої з ЗСК після кріоконсервування з 7 % ДМСО та швидкістю охолодження 10 °С/хв за накопиченням j-агрегатів або мономерів при забарвленні JC-1.

	Всього клітин	Розподіл між морфологічними типами клітин первинної культури		
		Фібробласто-подібні	Полігональні	Округлі
Клітини з j агрегатами, %	80,57 (68,99–91,33)	22,58 (7,41–30,50)	27,78 (19,78–42,82)	30,77 (10,58–32,80)
Клітини з зеленою флюоресценцією, %	19,43 (8,68–31,01)	5,80 (0–7,78)	9,09 (7,18–16,67)	3,23 (0–8,25)

Дані представлені як відношення кількості позитивно забарвлених клітин відповідного морфологічного типу до загальної кількості аналізованих клітин первинної культури.

Як було зазначено раніше, ліпідні краплі в цитоплазмі стероїдпродукуючих клітин використовуються для синтезу стероїдних гормонів. Для визначення ліпідних включень був використаний флюоресцентний барвник НЧ. В таблиці 5.3.3 представлені результати накопичення барвника при дослідженні первинної культури, отриманої з кріоконсервованої ЗСК.

Таблиця 5.3.3. Розподіл клітин первинної культури, отриманої з ЗСК після кріоконсервування з 7 % ДМСО та зі швидкістю охолодження 10 °С/хв за накопиченням НЧ.

	Всього клітин	Розподіл між морфологічними типами клітин первинної культури		
		Фібробласто подібні	Полігональні	Округлі
Клітини з включенням НЧ, %	59,67 (37,14–69,01)	11,43 (10,81–14,29)	13,51 (10,91–28,57)	20 (14,29–29,73)

Дані представлені як відношення кількості позитивно забарвлених клітин відповідного морфологічного типу до загальної кількості аналізованих клітин первинної культури.

З даних, наведених в таблиці 5.3.3, слідує, що 59,67 % клітин кріоконсервованої первинної культури містять ліпідні включення, що вірогідно не відрзняється від відповідного показника нативної первинної культури. Клітини з ліпідними включеннями були досить рівномірно розподілені між усіма морфологічними типами клітин культури. Таким чином, за сукупністю даних таблиць 5.3.2 та 5.3.3 кріоконсервована первинна культура містила три типи клітин, які утримували високий потенціал на мембрані мітохондрій, та містили ліпідні включення і, таким чином, могли синтезувати і виділяти в середовище інкубації гормони.

Саме тому для останнього доказу збереження функціональної активності стероїдпродукуючих клітин, що перенесли процедури кріоконсервування та наступного культивування залишалося визначити здатність клітин після кріоконсервування в умовах культивування до синтезу та секреції альдостерону на протязі 14 діб.

З даних, поданих на рис. 5.3.5, можна бачити, що на протязі 14 діб контрольні та кріоконсервовані зразки зберігали здатність до синтезу та секреції альдостерону. Профілі кривих динаміки для обох культур співпадали. Максимальний рівень альдостерону для кріоконсервованої первинної культури спостерігався на 2 добу ($406 \pm 2,35 \text{ пг}/10^6 \text{ кл}$), а потім поступово знижувався. Проте синтез альдостерону клітинами кріоконсервованої первинної культури на усіх термінах спостереження перевищував відповідний показник нативної культури в 2,5–4,5 рази. Таким чином, стають очевидними дві основні тенденції: більш високий рівень гормонопродукуючої активності кріоконсервованої первинної культури, в порівнянні з нативною культурою, та поступове зниження секреторної активності з 3 доби культивування.

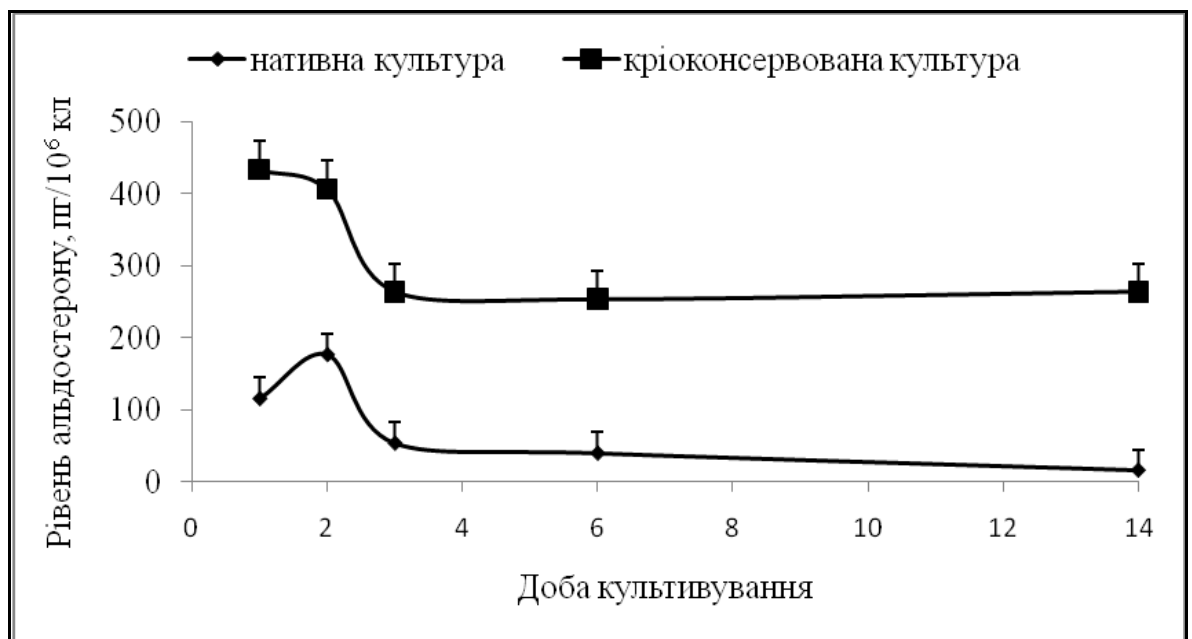


Рис. 5.3.5. Концентрація альдостерону в живильному середовищі на 14 добу культивування.

Підсумовуючи дані, що подані у 5 розділі, можна зробити висновок, що оптимальною концентрацією ДМСО для кріоконсервування ЗСК, яка зберігає гетерогенність ЗСК на рівні нативної культури, є 7 % ДМСО. Використання швидкості охолодження $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{хв}$, при використанні двохетапного режиму охолодження дозволяє зберегти основні морфологічні та функціональні

властивості ЗСК, однак призводить до зниження здатності ЗСК до адгезії. Використаний двоетапний режим охолодження, дозволяє підвищити кількість стероїдпродукуючих клітин, що зберігають гормонпродукуючу функцію при наступному культивуванні.

Публікації за результатами розділу:[33–45].

УЗАГАЛЬНЕННЯ

З моменту відкриття глюкокортикоїдних гормонів і по теперішній час інтерес до надниркових залоз не зникає. Серед усіх гормонів наднирників можна виділити 2 головних класа гормонів, що мають значення для розвитку такого напрямку в сучасній біології та медицині, як клітинна терапія, – глюкокортикоїди та мінералокортикоїди.

Альдостерон, головний мінералокортикоїдний гормон, є життєво важливим для підтримки гомеостазу рідини та електролітів, судинного опору і артеріального тиску [198, 207, 208, 216, 217, 223-226]. Неадекватно високий рівень альдостерону визначається у 50 % – 80 % пацієнтів з гіпертонічними розладами, що є наслідком не тільки первинного та вторинного альдостеронізму [235, 255], але також надмірної ваги та ожиріння [230] та найбільш важких (II-III стадії) або лікарсько-стійких форм гіпертонії [267]. Такий надлишково високий рівень альдостерону спричиняє помітне пошкодження органів-мішеней, що збільшує ризик майбутніх серцево-судинних наслідків та дисфункції нирок [97, 206, 228]. Гіпоальдостеронізм, в свою чергу, може призвести до гіпотонії та гіперкаліємії. Серед причин, що обумовлюють зниження рівню альдостерону, може бути неадекватна стимуляція секреції альдостерону (гіпоренінемічний гіпоальдостеронізм), дефекти синтезу альдостерону в надниркових залозах або порушенням транспорту та зв'язування альдостерону з рецепторами-мішенями (псевдогіпоальдостеронізм) [245, 257].

Випадки зниженого рівню альдостерону в наслідок пошкодження безпосередньо клубочкової зони надниркових залоз (первинний гіпоальдостеронізм) досить рідко зустрічається у дорослих та у дітей. Проте вторинний гіпоальдостеронізм найчастіше супроводжує цукровий діабет, ускладнений дизавтономією, нирковою недостатністю, віком, ятрогенними факторами та ВІЛ-інфекціями [196, 212]. Післяопераційний гіпоальдостеронізм спостерігався у пацієнтів внаслідок односторонньої

адреналектомії при аденомі, що продукує альдостерон [131, 213, 233]. Новий погляд на етіологію вторинного гіпоальдостеронізму надали дані про розвиток недостатності клубочкової зони надниркової залози внаслідок глюкокортикоїдної замісної терапії в високих дозах [197].

Секреція альдостерону клубочковою зоною кори надниркових залоз контролюється циркулюючими факторами, включаючи ренін – ангіотензинову систему та калій. Синтез мінералокортикоїдів також регулюється за допомогою аутокринного - паракринного механізму широким спектром біоактивних сигналів, що виділяються адренкортикальними та хромафінними клітинами, нервовими закінченнями, клітинами імунної системи, ендотеліальними клітинами та адипоцитами [123, 200-203, 221, 237-239, 243, 262]. Їх фізіологічна роль у контролі секреції альдостерону до кінця не з'ясована, але останні спостереження вказують на те, що аутокринні та паракринні процеси беруть участь у патофізіології альдостеронізму, надниркових гіперплазій та пухлин [5].

З цієї точки зору культура клітин, отримана з надниркових залоз, може бути використана як модельний об'єкт для досліджень взаєморегуляції між клітинами морфологічно та біохімічно різних зон надниркових залоз.

На теперішній час, більшість клітинних ліній (NCI-H295R, SW-13 та їх клональні лінії), що використовуються для досліджень, були отримані з адренкортикальної карциноми [205, 234, 249, 259, 263]. Ці лінії демонстрували різну здатність до секреції альдостерону та чутливість до ангіотензину II [265]. В той же час є дані про спроби отримати первинну культуру з нормальних надниркових залоз статевозрілого щура [102, 229], з наднирників бика [84], фетальних наднирників людини [220].

В літературі описано достатньо свідчень щодо кріоконсервування суспензії клітин надниркових залоз [96, 219, 231]. Але до цього часу не було досліджено вплив кріоконсервування на зонально диференційовані популяції наднирників. В зв'язку з цим виникає інтерес до вивчення впливу осмотичних факторів, кріопротекторів та різних швидкостей охолодження на

морфофункціональні особливості зонально специфічних клітин надниркових залоз. Саме тому метою роботи було вивчення впливу складу кріозахисного середовища, що містить різні концентрації диметилсульфоксиду (ДМСО), температури насичення клітин ДМСО та різних швидкостей охолодження на морфофункціональні особливості загальної суспензії клітин надниркових залоз, фракцій загальної суспензії клітин, клітин коркової та мозкової речовини.

Для дослідження впливу факторів кріоконсервування на різні морфологічні типи ендокринних клітин надниркових залоз на першому етапі роботи потрібно було обрати метод розподілу загальної суспензії клітин (ЗСК) надниркових залоз на фракції, які будуть містити морфологічно гомогенні популяції клітин.

Згідно даним літератури для ізоляції зонально диференційованих клітин надниркових залоз використовують методи розподілу суспензій клітин, отриманих з цілих надниркових залоз [139], з відокремлених капсулярних фрагментів коркової речовини [138], з коркової речовини [141] та мозкової речовини в градієнтах щільності перколу [140, 256], фіколу [142] та ін.

Для розподілу було обрано суспензію клітин, що отримана методом ферментативної дезінтеграції з цілих надниркових залоз щурів. Розподіл ЗСК в супінчатому градієнті щільності фіколу показав, що всі клітини відносно рівномірно розподілялись у діапазоні щільності фіколу $1,025 - 1,033 \text{ г/см}^3$ і $1,066 - 1,084 \text{ г/см}^3$, а максимальна кількість клітин була виявлена у інтерфазі $1,033 - 1,045 \text{ г/см}^3$. Для ідентифікації клітин були використані наступні методи дослідження: гістохімічний метод на виявлення ферменту 3β -ГСД [29, 257], флуоресцентний метод на виявлення наявності ліпідних включень з використанням нільського червоного (НЧ), ідентифікація хромафінних гранул, що містять адреналін та норадреналін [11]. Клітини з ліпідними включеннями (НЧ⁺), в яких була виявлена також активність 3β -ГСД (3β -ГСД⁺), були ідентифіковані як стероїдпродукуючі клітини. В подальшому для визначення розподілу клітин клубочкової зони, що виділяють мінералокортикоїди, та

адреноцитів пучкової зони, було виміряно рівень базальної секреції альдостерону в інкубаційному середовищі.

Клітини, які містили гранули з адреналіном та норадреналіном, були ідентифіковані як клітини мозкової речовини. Вони були сконцентровані в діапазоні щільностей фіколу $1,033 - 1,058 \text{ г/см}^3$ з піком на межі зі щільністю $1,045 \text{ г/см}^3$.

Клітини з підтверженою активністю $3\beta\text{-ГСД}$ ($3\beta\text{-ГСД}^+$) були присутні в усіх інтерфазах градієнту щільності фіколу, але найбільша їх кількість була вивлена у інтерфазах $1,025-1,033 \text{ г/см}^3$ і $1,066-1,076 \text{ г/см}^3$. Клітини з ліпідними включеннями (НЧ^+) були виявлені в усіх шарах градієнту, але найбільший відсоток НЧ^+ клітин зосередився в шарах $1,025$; $1,033$; $1,045$; $1,058$; $1,076 \text{ г/см}^3$.

Таким чином, клітини, що були ідентифіковані як $3\beta\text{-ГСД}^+$ і НЧ^+ були сконцентровані на межах градієнту зі щільністю $1,033$ та $1,076 \text{ г/см}^3$. Клітини, що містили гранули амінів, також забарвлювалися нільським червоним і розподілялися в інтерфазі градієнтів $1,033 - 1,045 \text{ г/см}^3$. Вимірювання концентрації альдостерону, що секретувалася адреноцитами, розподіленими в усіх шарах градієнта, виявило два основних регіона з високим вмістом гормону: шар зі щільністю $1,033 \text{ г/см}^3$, де були локалізовані адреноцити з середнім рівнем секреції альдостерону ($122 \pm 21,07 \text{ пг/10}^6 \text{ кл}$) та шар зі щільністю $1,076 \text{ г/см}^3$, де були локалізовані адреноцити з високим рівнем секреції альдостерону ($280 \pm 64,30 \text{ пг/10}^6 \text{ кл}$). Проте клітини, що виділяли значно меншу кількість альдостерону, були виявлені в усіх діапазонах щільності фіколу.

Розподіл ЗСК в супінчатому градієнті щільності фіколу дозволив отримати наступні основні фракції клітин:

ФР 1 – виділяється в інтерфазі градієнта зі щільністю $1,025 - 1,033 \text{ г/см}^3$, містить $3\beta\text{-ГСД}^+$ і НЧ^+ клітини, характеризується середнім рівнем секреції альдостерону;

ФР 2 – виділяється в інтерфазі градієнта зі щільністю 1,033 – 1,045 г/см³, містить найбільшу кількість клітин, в яких виявлені гранули амінів;

ФР 3 – виділяється в інтерфазі градієнта зі щільністю 1,066 – 1,076 г/см³, містить 3 β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітини, характеризується високим рівнем секреції альдостерону.

Таким чином, використаний метод дозволив отримати фракції клітин, які за своїми морфологічними ознаками відносились до стероїдпродукуючих клітин кори надниркових залоз і клітин мозкової речовини.

Загально визнаним способом довгострокового зберігання біоматеріалу є використання низькотемпературних технологій, які ґрунтуються на використанні різноманітних кріопротекторів та підборі оптимальних умов охолодження. ДМСО є найбільш поширеним використовуваним кріопротектором для кріоконсервування наднирників.

Відомо, що значна роль в пошкодженні клітин при кріоконсервуванні відведена осмотичним явищам, які призводять до осмотичного стресу, що має місце внаслідок змін осмотичності середовища. У зв'язку з цим було досліджено вплив різних концентрацій ДМСО (5, 7, 10 %) та температури (4, 22, 37 °С) додавання та видалення кріопротектору на кількість, життєздатність і метаболічну активність клітин.

Для оцінки функціональної активності клітин, отриманих з цілої залози, з механічно розділених коркової і мозкової речовини і у фракціях, виділених в градієнті щільності фіколу, був використаний ряд послідовно застосованих методів: прижиттєвого забарвлення трипановим синім, дослідження збереженості 3 β -ГСД⁺ клітин і метод оцінки метаболічної активності – МТТ тест [222, 232]. Треба відзначити, що життєздатність клітин, що була оцінена за виключенням трипанового синього, в усіх отриманих суспензіях становила 85–93 %. У той же час дані МТТ тесту показали, що клітини мозкової речовини надниркових залоз, отримані з механічно виділеної мозкової речовини або у ФР 2, після поділу в градієнті щільності фіколу, мають нижчі показники за МТТ тестом. Відповідний параметр для клітин мозкової

речовини (КМР і ФР 2) становив 0,16 – 0,17 умовних одиниць. В той час, для клітин ЗСК, ККР, ФР 1 та ФР 3 показник МТТ тесту був вірогідно вищим і складав 0,2 умовні одиниці.

Порівняльне дослідження показало, що зниження кількості, життєздатності та метаболічної активності клітин коркової речовини наднирників (ККР, ФР 1, ФР 3) відбувалось при температурі 37 °С. Щодо використаних концентрацій ДМСО (5, 7, 10 %), то найбільший пошкоджуючий ефект мав місце при концентрації 10 % ДМСО, оскільки додатково було отримано зниження кількості 3β -ГСД⁺ клітин. Для клітин мозкової речовини (КМР, ФР 2), отриманої двома різними способами, залежність від підвищення температури на етапі інкубації з ДМСО на показники кількості, життєздатності і метаболічної активності клітин не спостерігалася.

Визначення динаміки змін об'єму ККР і КМР показало, що об'ємні зміни ККР, що відбуваються при температурі 4 °С, не є пошкоджуючим фактором, який визначає збереження кількості і життєздатності стероїдпродукуючих клітин при інкубації. Отримані дані свідчать, що температура 37 °С, хоча і є фізіологічною і чинить найменший вплив на об'ємні зміни в ККР при інкубації в криозахисному розчині (5, 7 і 10 % ДМСО), проте є не прийнятною для насичення клітин кори надниркових залоз, оскільки при цій температурі реалізується токсичний ефект криопротектору. Суспензія КМР виявилася більш чутливою до змін осмотичного тиску середовища інкубації, в порівнянні з суспензією ККР. Максимальний ступінь дегідратації для КМР був встановлений при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО, що приводило до зниження кількості клітин в зразку після видалення ДМСО. Отже, об'ємні зміни клітин, що відбувалися при температурі 4 °С в присутності 10 % ДМСО здійснювали різноспрямовану дію на клітини коркової і мозкової речовин, що проявлялося в зміні показників кількості, життєздатності і метаболічної активності клітин при інкубації.

Визначені коефіцієнти проникності плазматичної мембрани ККР і КМР для молекул ДМСО дозволили встановити, що проникнення молекул кріопротектору крізь мембрани ККР відбувається крізь ліпідний бішар і білкові водні канали, а у КМР проникнення молекул ДМСО відбувається переважно крізь ліпідний бішар.

Проведені експерименти з кріоконсервування ЗСК дозволили визначити, що найбільша життєздатність клітин (67–77 %) була виявлена при швидкості охолодження 1, 5, 10, 20 °С/хв з 7 % ДМСО і 10 °С/хв з 10 % ДМСО. Було встановлено, що концентрація ДМСО 7 % є найбільш оптимальною для кріоконсервування ЗСК в діапазоні швидкостей охолодження 1, 5 та 10 °С/хв за рівнем життєздатності, метаболічної активності, кількості 3β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітин.

Дослідження впливу швидкостей охолодження на кількість і життєздатність КМР дозволило встановити зниження цих показників до 50 %. Можливо, що для даної популяції клітин *in vitro* принциповим моментом є відсутність трьохвимірної структури. ЗСК надниркових залоз щурів у порівнянні з ККР і КМР виявилася більш стійкою до процесів заморожування–відігрівання. Після кріоконсервування ККР зі швидкістю охолодження 1, 5, 10 °С/хв в суспензії зберігалось 45–58 % клітин проти 75–85 % для ЗСК наднирників щурів.

У ряді робіт [2, 15, 16, 19, 52] отримано дані щодо характеристик функціональної активності кріоконсервованих клітин надниркових залоз новонароджених поросят, в яких встановлено, що у віддалені терміни після відігрівання за умов культивування вони здатні нарощувати гормональну активність. Саме тому наступні наші дослідження були спрямовані на вивчення здатності цих клітин після відігрівання формувати первинні культури.

Показано, що кріоконсервування призводило до суттєвого зниження здатності кріоконсервованої в присутності 7 % ДМСО ЗСК прикріплюватися до пластикової поверхні культивування. При кріоконсервуванні з відносно

повільними режимами охолодження лише 50 % клітин, в порівнянні з контролем, прикріплялися до субстрату в першу добу культивування. При охолодженні зі швидкістю охолодження більш, ніж 10 °С/хв адгезивна здатність кріоконсервованих клітин значно пригнічувалась. Максимальна здатність до адгезії була властива зразкам, кріоконсервованим зі швидкістю охолодження 10 °С/хв та відрізнялася від контролю на 35–40 %. На 3 добу культивування візуалізувалися поодинокі розпластані клітини, які були виявлені в культурах, кріоконсервованих зі швидкістю охолодження 5, 10 та 15 °С/хв. На 7 добу культивування можливо було умовно розподілити клітини на три групи: фібробластоподібні, полігональні та невеликі округлі. Фібробластоподібні клітини мають веретеноподібну форму, іноді короткі відростки, велике світле ядро з двома ядерцями, що оточено світлою цитоплазмою з численними включеннями, полігональні клітини більші за розміром з численними широкими відростками, одне велике ядро з двома ядерцями, що оточені значною кількістю цитоплазми з численними включеннями. Маленькі клітини мають щільне темне ядро та вузький ободок з темної цитоплазми, що оточує ядро. В первинній контрольній культурі було виявлено ознаки поділу полігональних та фібробластоподібних клітин.

Таким чином, можна вважати, що після кріоконсервування клітини в первинній культурі зберігають притаманний для контрольних зразків розподіл клітин та присутність мітотично активних клітин в популяції. А кріоконсервування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв в присутності 7 % ДМСО дозволяє зберегти гетерогенність суспензії надниркових залоз. Звертає на себе увагу, що обидва типи первинних культур (контрольні та кріоконсервовані) утримують клітини, що мають два ядра або ознаки мітотичних фігур. Причому, кількість клітин в стані мітозу в культурі, отриманій з кріоконсервованої суспензії надниркових залоз, вірогідно вище, ніж в контрольній культурі.

Подальша характеристика первинної культури, отриманої з ЗСК, включала дослідження функціональних характеристик клітин за допомогою

забарвлення НЧ та катіонним барвником JC-1. Відомо, що ключовим етапом синтезу стероїдних гормонів в клітинах надниркових залоз є перетворення холестерину в прегненолон за участю гострого регуляторного стероїдогенного білка (StAR). З його допомогою холестерин доставляється до ферменту P450_{scc}, що знаходиться на внутрішній мембрані мітохондрії. При наявності на внутрішній мембрані мітохондрій негативного заряду, JC-1 формує агрегати, що мають червоно-помаранчеву флуоресценцію. При деполяризації мембрани, агрегати барвника перетворюються на мономери, що мають зелену флуоресценцію. Отримані дані свідчать на користь того, що для первинних культур, що утворюються після відігріву кріоконсервованої суспензії клітин в присутності 7 % ДМСО за режимом 10 °С/хв, реєструється присутність як подвійної, так і зеленої флуоресценції. Слід також додати, що усі типи клітин первинної культури мали забарвлення флуоресцентним барвником НЧ, що є доказом збереження цитоплазматичних ліпідних крапель не тільки одразу після кріоконсервування, але і після їх наступного культивування. Саме тому для останнього доказу збереження функціональної активності стероїдопродукуючих клітин, що перенесли процедури кріоконсервування та наступного культивування залишалось тільки визначити чи здатні клітини після кріоконсервування зберігати здатність до синтезу та секреції альдостерону. За умов культивування клітин до і після кріоконсервування на протязі 14 діб. Кріоконсервовані зразки зберігали здатність до синтезу та секреції альдостерону. Профілі кривих динаміки нативної на кріоконсервованої культур співпадали. Максимальний рівень альдостерону в кріоконсервованих культурах спостерігався на 2 добу, після чого поступово знижувався.

З даних літератури відомо [199, 205, 209, 210], що підтримання функціональної активності клітин надниркових залоз при *in vitro* культивуванні в значній мірі залежить від адгезії клітин до підложки, а значить, від складу останньої. Існують дані про можливість утримання культури надниркових залоз до 15 пасажів як на пластиковій [142, 220], так і спеціальних високоадгезивних підложках [183] за умов додавання при

необхідності факторів, що стимулюють формування позаклітинного матріксу[128] або культивування в живильному середовищі, що містить фактори, що секретуються клітинами сполучної тканини або ендотеліальними клітинами [174]. У випадку недостатності відповідних факторів, що могло мати місце при культивуванні нативної культури, стимулюються ріст та проліферація клітин мезенхімального ростка, які поступово заміщають паренхіматозний гормонопродукуючий епітелій.

В той же час ЗСК зберігає значний гормонпродукуючий потенціал на протязі 14 діб культивування. Відомо, що основними фізіологічними регуляторами синтезу альдостерону з клубочкової зони надниркових залоз *in vivo* є калій та ангіотензин II. Адренкортикотропний гормон (АКТГ) також виявився впливовим триггером секреції альдостерону [18, 200]. Дані щодо напрямку дії кортикотропіну на синтез альдостерону досить суперечливі. Так, стимулюючий ефект був показаний *in vivo* при застосуванні АКТГ в концентраціях нижче, ніж для стимуляції секреції кортизолу [88] В роботі [109] *in vivo* АКТГ підвищував гормоносекретуючу активність клітин клубочкової зони, але стимулюючий ефект був значно менше, ніж під впливом іонів K^+ та ангіотензину II. В той же час довгострокова стимуляція АКТГ (більше за дві доби) культури клітин надниркових залоз призводила до пригнічення секреції альдостерону й морфологічної трансформації клітин клубочкової зони в клітини, що морфологічно були подібні клітинам, що синтезують глюкокортикоїди *in vitro* [134] . В останні роки було сформовано уявлення, що секреція альдостерону регулюється різними факторами, які секретуються клітинами мозкової речовини, клітинами ендотелію, нервовими закінченнями та клітинами імунної системи, тобто клітинами, що локалізовані в безпосередній близькості від клітин клубочкової зони надниркових залоз [82, 88, 252, 253]. У нормальній наднирковій залозі клітини мозкової речовини виділяють достатню кількість АКТГ, який є головним посередником у кортикотропній функціональній взаємодії. Цей секреторний процес може активуватися кортикотропін-релізінг гормоном, що також експресується в

мозковій речовині надниркових залоз [173, 210]. Таким чином, клітини мозкової речовини можуть бути важливими регуляторами активності кори надниркових залоз. Досліджуючи вплив факторів кріоконсервування, було встановлено, що клітини мозкової речовини надниркових залоз є більш чутливими до заморожування відігріву в порівнянні з клітинами кори наднирників. Тому їх селективне пошкодження або видалення в процесі кріоконсервування може привести до короткотривалого або довгострокового впливу на секрецію альдостерону клітинами клубочкової зони.

Інший ймовірний механізм, який може бути відповідальним за збільшення продукції альдостерону, пов'язаний з особливостями регуляції синтезу і секреції мінералокортикоїдів клітинами клубочкової зони наднирників. Відомо, що *in vivo* та *in vitro* активація продукції альдостерону ініціюється не тільки ангіотензином II, але й збільшенням концентрації іонів K^+ в позаклітинному середовищі [201, 214, 239, 240, 274, 277]. У спокої клітини клубочкової зони підтримують сильно негативний потенціал у клітинній мембрані завдяки градієнту концентрації K^+ , який генерується Na^+/K^+ -АТФазою [275]. Інкубація клітин клубочкової зони в середовищі з підвищеною концентрацією іонів K^+ стимулює секрецію альдостерону у відсутності ангіотензину II [211, 242, 278]. Так, було показано *in vitro*, що підвищення позаклітинної концентрації K^+ до 8×10^{-3} М призводить до 20-кратного збільшення секреції альдостерону. Кальцієвий іонофор A23187 також мав стимулюючий вплив на секрецію альдостерону, приводив до перерозподілу ліпідних включень в цитоплазмі клітин та морфологічних змін в структурі мітохондрій та гладкого ендоплазматичного ретикулуму, що зазвичай виявляється при активації стероїдогенезу [254]. Таким чином, деполяризація плазматичної мембрани клітини, підвищення позаклітинної концентрації K^+ стимулюють продукцію альдостерону завдяки підвищенню внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} [256].

Як відомо, епітеліальні стероїдопродукуючі клітини надниркових залоз відповідають на додавання АКТГ *in vitro* зміною форми [241]. В деяких

роботах було показано, що зміна форми, набухання клітин клубочкової зони надниркових залоз також призводить до активації Ca^{2+} каналів та стимуляції відповідних стероїдогенних ферментів [242]. На суспензії адренкортикальних клітин бика було встановлено, що зменшення об'єму клітин на 22,5 % в результаті інкубації гіперосмолярному розчині (600 мОсм) призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} з Внутрішньоклітинних (мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум) та позаклітинних джерел [177].

В роботах [16, 172] було доказано, що дегідратація – регідратація глюкокортикоїдпродукуючих клітин надниркових залоз приводить до підвищення секреції відповідних гормонів завдяки просторовому зближенню ліпідних включень, що депонують субстрат для синтезу прегненолону, з цитохромом P450_{ssc} на внутрішній поверхні мітохондріальної мембрани.

Є цілком ймовірним, що різке зменшення клітин кори надниркових залоз при додаванні кріопротектору ДМСО (розділ 4.2), може ініціювати відповідні процеси, в клітинах наднирників, що продукують мінералокортикоїди.

Таким чином було встановлено, що фактори кріоконсервування по різному впливають на ЗСК, ККР, КМР і на окремі фракції клітин. Встановлено, що клітини мозкової речовини більш чутливі як на етапі інкубації, так і при кріоконсервуванні. Клітини коркової речовини показали більш високу чутливість на етапі додавання–видалення кріопротектору при підвищенні температури до 37 °С, але виявилися більш стійкими до заморожування–відігріву. Відмінність чутливості клітин коркової речовини при різних швидкостях охолодження і концентраціях ДМСО була аналогічною показникам для ЗСК. В той же час було виявлено, що при заморожуванні ЗСК зберігається більш високий рівень життєздатності в діапазоні швидкостей охолодження 1, 5, 10 °С/хв, що дозволяє розглядати кріоконсервовану зі швидкістю охолодження 10 °С/хв ЗСК як більш оптимальний варіант серед порівняних швидкостей охолодження, оскільки в данному випадку зберігається найвищий відсоток стероїдпродукуючих клітин.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі проведено теоретичне та експериментальне дослідження впливу різних концентрацій кріопротектора диметилсульфоксиду та температури насичення в ньому загальної суспензії клітин, фракцій загальної суспензії клітин, клітин коркової і мозкової речовини надниркових залоз, та режимів кріоконсервування на їх морфофункціональні властивості. Вперше показано різний ступінь кріостійкості фракцій клітин надниркових залоз та розроблено оптимальний режим кріоконсервування загальної суспензії клітин, який дозволяє зберегти їх основні морфофункціональні властивості.

1. Розподіл загальної суспензії клітин в градієнті щільності фіколу дозволяє отримати три фракції клітин з різними властивостями – у інтерфазі градієнту $1,033\text{--}1,045\text{ г/см}^3$ концентруються переважно клітини мозкової речовини, що підтверджено гістохімічним методом виявлення гранул адреналіну і норадреналіну, а у інтерфазах $1,025\text{--}1,033$ та $1,066\text{--}1,076\text{ г/см}^3$ зосереджуються переважно стероїдпродукуючі клітини, про що свідчить високий рівень альдостерону та кількості $3\beta\text{-ГСД}^+$ і НЧ^+ клітин.

2. Встановлено, що цитотоксичний ефект ДМСО на етапі інкубації з ним клітин надниркових залоз проявляється з підвищенням концентрації (5, 7, 10 %) та температури інкубації (4, 22, 37 °С) для загальної суспензії клітин, клітин коркової речовини, а також фракцій клітин, які за своїми морфофункціональними ознаками належать до стероїдпродукуючих клітин. Для клітин, які належать до мозкової речовини наднирників, залежність від температури насичення не виявлена при жодній з використаних концентрацій ДМСО.

3. На основі експериментально визначеної осмотичної поведінки суспензій клітин коркової і мозкової речовин в розчинах ДМСО в концентрації 5, 7, 10 % із залученням математичного моделювання були розраховані коефіцієнти проникності плазматичних мембран клітин для води і

кріопротектору та енергії активації транспорту молекул ДМСО крізь мембрани клітин. Найменша енергія активації встановлена в температурному інтервалі 4–22 °С для обох типів клітин. Виявлено, що при 37 °С проникність мембран клітин коркової речовини для ДМСО вище порівняно з клітинами мозкової речовини.

4. Кріоконсервування загальної суспензії клітин надниркових залоз дозволяє зберегти життєздатність клітин, кількість 3β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітин на рівні контрольних значень при заморожуванні в присутності 7% ДМСО зі швидкістю охолодження 10 °С/хв. Охолодження загальної суспензії клітин зі швидкістю вище 10 °С/хв (20, 40 °С/хв і занурення в \downarrow LN₂) призводить до вірогідного зниження всіх досліджених показників. Найбільш ефективним для клітин ФР 1 було кріоконсервування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв, а для клітин ФР 3 – 5 °С/хв.

5. Встановлено, що при культивуванні кріоконсервована з 7% ДМСО і швидкістю охолодження 10 °С/хв загальна суспензія клітин надниркових залоз зберігає здатність до синтезу та секреції альдостерону з максимумом на 2 добу культивування ($406 \pm 2,35$ пг/10⁶ кл). Наступне зниження рівня гормональної активності кріоконсервованих клітин супроводжувалось домінуванням фібробластоподібних клітин на 14 добу культивування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Teebken O E, Mössinger E, Heitmann Ph, Seeliger H, Klempnauer J, Scheumann GF. Transplantation von Adrenozyten als Alternative zur Hormonsubstitution bei Nebenniereninsuffizienz. *Acta Chir. Austriaca*. 2001 33(6): 305 – 11.
2. Dunn JC, Chu Y, Lam MM, Wu BM, Atkinson JB, McCabe ER. Adrenal cortical cell transplantation. *J Pediatr Surg*. 2004 Dec; 39(12):1856-8. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2004.08.006. PMID: 15616950.
3. Турчін І.С., Ларін О.С., Дроздович І.І. та ін. Застосування комбінованих органних культур ендокринних залоз для лікування ендокринопатій: досягнення та перспектива. *Трансплантологія*. 2007;9(1): 293–95.
4. Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Dec 30;228(1-2):23-38. doi: 10.1016/j.mce.2003.12.020. PMID: 15541570.
5. Melli G, Höke A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discov*. 2009 Oct 1;4(10):1035-1045. doi: 10.1517/17460440903266829. PMID: 20657751; PMCID: PMC2908326.
6. Silani V, Pizzuti A, Strada O, Falini A, Pezzoli G, Scarlato G. Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells. *Brain Res*. 1988 Jun 28;454(1-2):383-6. doi: 10.1016/0006-8993(88)90842-6. PMID: 2900663.
7. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач ЕИ, Гурина ТМ. Изучение возможности получения и криоконсервирования первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят. *Проблемы криобиологии*. 2011;21(1):58 – 67.
8. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач Є.І, Бондаренко ТП. Отримання і криоконсервування первинної культури клітин надниркових залоз новонароджених поросят. *Матеріали ІХ науково-практичної*

конференции "Эндокринная патология у вѳковому аспекте". Харьков, 27-28 жовтня 2011. - С. 89 - 90.

9. Устиченко ВД, Алабедадькарим НМ, Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Позитивний вплив кріоконсервування на стероїдогенез тканини коркової речовини надниркових залоз новонароджених поросят *in vitro* та при ксенотрансплантації. Клінічна хірургія. 2006;№4-5:113–114.

10. Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Кріоконсервирование адренкортикальной ткани и ее использование в клинике. Клін. фармація. –1999; 3(2):112 – 115.

11. Божок ГА, Алабедадькарим НМ, Легач ЄІ, Бондаренко ТП. Вплив кріоконсервування на імунобіологічні властивості фрагментів надниркових залоз при алотрансплантації. Трансплантологія. 2004;5(1):88–92.

12. Бондаренко ТП, Геращенко АВ. Функциональные характеристики органной культуры надпочечников новорожденных поросят после кріоконсервирования. Проблемы кріобиологии. 2001; 2: 108–109.

13. Бондаренко ТП, Алабедадькарим НМ, Божок ГА, Геращенко АВ, Самченко И.И., Легач Е.И. Исследование стероидогенной активности кріоконсервированной органной культуры надпочечников при ксенотрансплантии. Проблемы кріобиологии. 2001; 3:36.

14. Бондаренко ТП, Божок ГА, Алабедадькарим НМ, Легач ЄІ, Луговий СВ, Волкова НО, Самченко П. Ксенотрансплантація кріоконсервованного ендокринного матеріалу як метод корекції гіпофункції залоз в експерименті. Трансплантологія. 2003; 4(1):60 –63.

15. Ден Бо. Дія низьких температур та імуноізоляції на властивості тканин надниркових залоз *in vitro* і при ксенотрансплантації. Автореферат дисертації. 2010; 20.

16. Юрчук Т.А, Божок ГА, Алабедадькарим НМ. Функциональная активность адренкортикоцитов крыс после инкубации в криозащитных

средах на основе ДМСО, содержащих эмбриональную телячью сыворотку *Проблемы криобиологии*. 2014;1(1):47–58.

17. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005 Jul;186(1):1-20. doi: 10.1677/joe.1.06017. PMID: 16002531.

18. Ghorayeb N El, Bourdeau I, Lacroix A. Role of ACTH and Other Hormones in the Regulation of Aldosterone Production in Primary Aldosteronism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016 Jun 27;7:72. doi: 10.3389/fendo.2016.00072. PMID: 27445975; PMCID: PMC4921457.

19. Schinner S, Bornstein SR. Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol*. 2005;16(2):91-8. doi: 10.1385/ep:16:2:091. PMID: 16199893.

20. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998 Apr;19(2):101-43. doi: 10.1210/edrv.19.2.0326. Erratum in: *Endocr Rev* 1998 Jun;19(3):301. PMID: 9570034.

21. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med*. 1993 Oct 21;329(17):1246-53. doi: 10.1056/NEJM199310213291708. PMID: 8105378.

22. Vinson GP. Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. *Front Neurosci*. 2016;10:238. Published 2016 Jun 15. doi:10.3389/fnins.2016.00238

23. Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14211–6. doi:10.1073/pnas.2336140100

24. Дудецкая ГВ, Юрчук ТА, Устиченко ВД, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Регидратированные адренокортикоциты как модель криоконсервированных стероидпродуцирующих клеток. *Холод в*

биологии и медицине – 2006: мат. 30-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 24-25 мая 2006 г.). Проблемы криобиологии. 2006; 16(4): 43.

25. Дудецкая ГВ, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Гормонпродуцирующая активность клеток надпочечников новорожденных поросят, выделенных в градиенте плотности сахарозы. *Експериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики, Шості Данилевські читання; 2007 лют. 22-23; Харків; с. 40.*

26. Дудецкая ГВ, Алабедаькарим НМ Характеристика популяций адренокортикоцитов новорожденных поросят, выделенных в градиенте фикола. *Матеріали I міжнародної наукової конференції “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології”; 2009 лют. 23-26; Донецьк; с. 29.*

27. Бондаренко ТП, Легач ЕИ, Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Устиченко ВД, Билявская СБ, Пахомов АВ, Дудецкая ГВ, Сидоренко ОС *Получение криоконсервированных культур клеток и тканей эндокринных желез для лечения гормональной недостаточности методом трансплантации. IV щорічна науково-практична конференція з міжнародною участю «Новое в практической криомедицине» 2010 листоп. 9 Москва, с. 20–21.*

28. Дудецкая ГВ, Ден Бо, Алабедаькарим НМ *Разделение различных субпопуляций клеток надпочечников крысы в градиенте сахарозы. Мат. IX українського біохімічного з'їзду, 2006 жовтня 24-27 Харків, Т. 2, с.183.*

29. Dudetska GV, Yurchuk TA, Alabedalkarim NM. *Fluorescent and radioimmunological investigation of native and cryopreserved adrenocytes: mitochondrial potential and hormone secretion. International workshop of the physiological society “Molecular physiology of membrane transport and cell excitability”; 2007 Sep 19-23; Yaremche, Ukraine; p. 22.*

30. Dudetska GV, Yurchuk TA, Ustichenko VD, Alabedalkarim NM, Bondarenko TP. *Rehydrated Adrenocorticocytes as a Model of*

Cryopreserved Steroido–Producing Cells. Cell Preservation Teshnology. 2008; 6(1): 99. DOI: 10.1089/cpt.2008.9999.ABS

31. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД, Бондаренко ТП Влияние температуры инкубации и растворов, содержащих различные концентрации диметилсульфоксида, на жизнеспособность клеток надпочечников крыс. Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті. Проблемні питання”; 2010 жовт. 28-29; Харків;с. 36-37.

32. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД Сохранность клеток надпочечников крыс после криоконсервирования в средах различного композиционного состава. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології”; 2011 3-4 берез. Харків; с. 43.

33. Дудецька ГВ, Божок ГА, Зубов ПМ, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Вплив різних швидкостей охолодження на життєздатність та клітинний склад суспензії клітин надниркових залоз при криоконсервуванні. Проблемы криобиологии. 2012; 22(1): 30–8.

34. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Влияние скорости охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс. Проблемы криобиологии. 2010; 20(4): 379–87.

35. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Влияние факторов криоконсервирования на сохранность клеток надпочечников крыс. Холод в биологии и медицине. Проблемы криобиологии. 2010; 20(2): 193.

36. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП Диференціальна чутливість клітин коркової і мозкової речовини наднирників щурів при криоконсервуванні з різними швидкостями охолодження Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Modern methods,

innovations and operational experience in the field of psychology and pedagogics», 2017 груд. 27-28; Люблін, с.199–1.

37. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП Вплив кріоконсервування на збереження альдостеронпродукуючих клітин наднирників Науково-практична конференція «Медична наука та практика: виклики і сьогодення», 2018 серп. 24-25; Львів, с. 84–7.

38. Alabedalkarim NM, Bozhok GA, Legach EI, Ustichenko VD, Zubov PM, Bilyavskaya SB, Dudetskaya GV, et al. Outcome of adrenal tissue fragments allotransplantation: The impact of cryopreservation. *Cryobiology*. 2012; 65(3): 188–5. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.05.013>

39. Дудецкая ГВ, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Изучение возможности кріоконсервирование клеток надпочечников взрослых крыс. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, серія біологія. 2010; 12(920): 111–17.

40. Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Дудецкая ГВ, Колот НВ, Погребняк НЛ, Легач ЕИ. Использование флуоресцентных полиметиновых красителей в клеточной трансплантации. Матеріали III Міжнар. симпозиуму «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»; 2007 квіт. 25–26; Москва; с. 56.

41. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД, Алабедаькарим НМ Цитофлуориметрическая оценка эффективности кріоконсервирования цельной суспензии и различных субпопуляций адреноцитов новорожденных поросят. Проблемы кріобиологии. 2007; 17(2): 204.

42. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП Оценка функциональной активности клеток надпочечников с помощью флуоресцентних красителей. Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті”, 2011 жовт. 27-28 Харків, с. 31-32.

43. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП Подбор условий культивирования клеток надпочечников взрослых крыс. Холод в биологии и медицине. Проблемы криобиологии. 2011; 21(2): 216.

44. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП Підбір умов культивування кріоконсервованих клітин кори надниркових залоз шурів. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології», Вісімнадцяті Данилевські читання; 2019 28 лют-1 бер; Харків, с. 37.

45. Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Боровой ИА, Пахомов АВ, Билявская СБ, Дудецкая ГВ, Легач ЕИ Культивирование и трансплантация клеток эндокринных желез, меченных флуоресцентным полиметиновым красителем, на коллагеновом матриксе. Матеріали Всеросійської конференції з міжнародною участю "Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток"; 2008 черв. 18-20; Самара; с.148-150.

46. Дудецкая ГВ, Коваленко ИФ, Бондаренко ТП. Влияние температуры и различных концентраций диметилсульфоксида на проницаемость мембран клеток надпочечников для воды и криопротектора. Вісник проблем біології і медицини. 2011; 4(90): 85–8.

47. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП Вплив розчинів диметилсульфоксиду і температури інкубації на функціональну активність окремих популяцій клітин наднирників шурів. Тези 44-ї щоріч. конф. мол. учених «Холод у біології і медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології» 2020; 30(3): 287.

48. Ганонг Вільям Ф. Фізіологія людини: Підручник/Переклад з англ. Наук. ред. перекладу Гжегоцький М, Шевчук В, Заячківська О. 2002; 784 с.

49. Дедов ИИ, Мельниченко ГА, Фадеев ВФ. Эндокринология. 2007; 432 с.

50. Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology*. 1999 Jul;140(7):3342-53. doi: 10.1210/endo.140.7.6859. PMID: 10385432.
51. Cooper MJ, Hutchins GM, Israel MA. Histogenesis of the human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and nonchromaffin lineages. *Am J Pathol*. 1990 Sep;137(3):605-15. PMID: 1698027; PMCID: PMC1877529.
52. Cocchia D, Michetti F. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res*. 1981;215(1):103-12. doi: 10.1007/BF00236252. PMID: 7226189.
53. Trojanowski JQ, Walkenstein N, Lee VM. Expression of neurofilament subunits in neurons of the central and peripheral nervous system: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies. *J Neurosci*. 1986 Mar;6(3):650-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-03-00650.1986. PMID: 2420946; PMCID: PMC6568466.
54. Palacios G, Lafarga M. Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res*. 1975 Dec 2;164(2):275-8. doi: 10.1007/BF00218980. PMID: 1238173.
55. Balyura M, Gelfgat E, Steenblock C, Androutsellis-Theotokis A, Ruiz-Babot G, Guasti L, Werdermann M, Ludwig B, Bornstein T, Schally AV, Brennand A, Bornstein SR. Expression of progenitor markers is associated with the functionality of a bioartificial adrenal cortex. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194643. doi: 10.1371/journal.pone.0194643. PMID: 29596439; PMCID: PMC5875767.
56. Finco I, Mohan DR, Hammer GD, Lerario AM. Regulation of stem and progenitor cells in the adrenal cortex. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2019 Oct;8:66-71. doi: 10.1016/j.coemr.2019.07.009. Epub 2019 Aug 6. PMID: 32258821; PMCID: PMC7133706.

57. Kim JH, Choi MH. Embryonic Development and Adult Regeneration of the Adrenal Gland. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2020 Dec;35(4):765-773. doi: 10.3803/EnM.2020.403. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33397037; PMCID: PMC7803617.
58. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology*. 1990 Aug;127(2):900-6. doi: 10.1210/endo-127-2-900. PMID: 2373060.
59. Miyamoto K, Yazawa T, Mizutani T, Imamichi Y, Kawabe SY, Kanno M, Matsumura T, Ju Y, Umezawa A. Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Apr 10;336(1-2):123-6. doi: 10.1016/j.mce.2010.11.031. Epub 2010 Dec 4. PMID: 21134412.
60. Whitworth E, Vinson GP. Zonal differentiation in the rat adrenal cortex. *Endocr Res*. 2000 Nov;26(4):973-8. doi: 10.3109/07435800009048625. PMID: 11196478.
61. Mitani F, Suzuki H, Hata J, Ogishima T, Shimada H, Ishimura Y. A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology*. 1994 Jul;135(1):431-8. doi: 10.1210/endo.135.1.8013381. PMID: 8013381.
62. Wood MA, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Apr 10;336(1-2):206-12. doi: 10.1016/j.mce.2010.11.012. Epub 2010 Nov 20. PMID: 21094677; PMCID: PMC3397472.
63. Simon DP, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar 31;351(1):2-11. doi: 10.1016/j.mce.2011.12.006. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22266195; PMCID: PMC3288146.
64. Lerario AM, Finco I, LaPensee C, Hammer GD. Molecular Mechanisms of Stem/Progenitor Cell Maintenance in the Adrenal Cortex.

Front Endocrinol (Lausanne). 2017;8:52. doi: 10.3389/fendo.2017.00052. PMID: 28386245; PMCID: PMC5362593.

65. Capen CC, DeLellis RA, Yarrington J. Endocrine system. In: Handbook of Toxicologic Pathology, Hasek-Hock WM, Rousseaux MA, Wallig MA (eds). Academic Press, San Diego, 2001.

66. Marsh JM. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. Biol Reprod. 1976 Feb;14(1):30-53. doi: 10.1095/biolreprod14.1.30. PMID: 177107.

67. Розен В.Б. Основы эндокринологии: Учебное пособие для студентов университетов. М.: Высшая школа, 1980. 344с.

68. Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. Compr Physiol. 2014 Jul;4(3):965-94. doi: 10.1002/cphy.c130044. PMID: 24944027; PMCID: PMC4521600.

69. Brown JM, Underwood PC, Ferri C, Hopkins PN, Williams GH, Adler GK, Vaidya A. Aldosterone dysregulation with aging predicts renal vascular function and cardiovascular risk. Hypertension. 2014;63(6):1205-11. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03231. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24664291; PMCID: PMC4016103.

70. Christenson LK, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. Biochim Biophys Acta. 2000 Dec 15; 1529(1-3): 175-87. doi: 10.1016/s1388-1981(00)00147-5. PMID: 11111087.

71. Крехова МА. Предшественник стероидных гормонов – холестерин. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. М.: Наука, 1976; 145 – 170.

72. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. Z Rheumatol. 2000;59(2):12-7. doi: 10.1007/s003930070006. PMID: 11155792.

73. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Güse-Behling H, Stromeyer HG, Rasmussen TN, Scherbaum WA, Adler G, Holst JJ. Sympathoadrenal

regulation of adrenal androstenedione release. *Neuroendocrinology*. 1994 Apr;59(4):406-12. doi: 10.1159/000126685. PMID: 8202222.

74. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Trzeclak WH, Usadel H, Güse-Behling H, Waterman MR, Scherbaum WA. Adrenaline stimulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 mRNA accumulation in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol*. 1991 Nov;131(2):R5-8. doi: 10.1677/joe.0.131r005. PMID: 1660516.

75. Güse-Behling H, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Waterman MR, Scherbaum WA, Adler G. Regulation of adrenal steroidogenesis by adrenaline: expression of cytochrome P450 genes. *J Endocrinol*. 1992 Nov;135(2):229-37. doi: 10.1677/joe.0.1350229. PMID: 1335470.

76. Gwynne JT, Strauss JF 3rd. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev*. 1982 Summer;3(3):299-329. doi: 10.1210/edrv-3-3-299. PMID: 6288367.

77. Vinson GP, Pudney JA, Whitehouse BJ. The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *J Endocrinol*. 1985;105(2):285-94. doi: 10.1677/joe.0.1050285. PMID: 2985728.

78. Wakabayashi T, Kurono C, Asano M, Kimura H, Ozawa T. Steroidogenesis in the zona glomerulosa of the adrenal cortex. II. Distribution of cytochrome P-450 in the zona glomerulosa of the bovine adrenal cortex. *J Bioenerg*. 1976 Feb;8(1):55-71. doi: 10.1007/BF01559389. PMID: 986394.

79. Papreck JR, Martin EA, Lazzarini P, Kang D, Kim D. Modulation of K2P3.1 (TASK-1), K2P9.1 (TASK-3), and TASK-1/3 heteromer by reactive oxygen species. *Pflugers Arch*. 2012;464(5):471-80. doi: 10.1007/s00424-012-1159-y. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23007462; PMCID: PMC3478902.

80. Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage

F, Warth R, Barhanin J. Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J*. 2008 Jan 9;27(1):179-87. doi: 10.1038/sj.emboj.7601934. Epub 2007 Nov 22. PMID: 18034154; PMCID: PMC2206116.

81. Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ. TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 12;105(6):2203-8. doi: 10.1073/pnas.0712000105. Epub 2008 Feb 4. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13696. PMID: 18250325; PMCID: PMC2538899.

82. Bornstein SR, Vaudry H. Paracrine and neuroendocrine regulation of the adrenal gland--basic and clinical aspects. *Horm Metab Res*. 1998 Jun-Jul;30(6-7):292-6. doi: 10.1055/s-2007-978887. PMID: 9694552.

83. Engeland WC. Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res*. 1998 Jun-Jul;30(6-7):311-4. doi: 10.1055/s-2007-978890. PMID: 9694555.

84. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, Connexons, and intercellular communication (Review) *Ann Rev Biochem*. 1996;65:475–502. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355.

85. Kumar NM, Gilula NB. Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin Cell Biol*. 1992;3(1):3–16. doi: 10.1016/S1043-4682(10)80003-0.

86. Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol*. 2000 Oct 15; 226(2):167-79. doi: 10.1006/dbio.2000.9863. PMID: 11023678.

87. Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod*. 2001 Sep;65(3):829-38. doi: 10.1095/biolreprod65.3.829. PMID: 11514348.

88. Murray SA, Davis K, Gay V. ACTH and adrenocortical gap junctions. *Microsc Res Tech*. 2003;61(3):240-6. doi: 10.1002/jemt.10332. PMID: 12768538.
89. Davis KT, McDuffie I, Mawhinney LA, Murray SA. Hypophysectomy results in a loss of connexin gap junction protein from the adrenal cortex. *Endocr Res*. 2000;26(4):561-70. doi: 10.3109/07435800009048571. PMID: 11196429.
90. Colomer C, Olivos Ore LA, Coutry N, Mathieu MN, Arthaud S, Fontanaud P, Iankova I, Macari F, Thouënnon E, Yon L, Anouar Y, Guérineau NC. Functional remodeling of gap junction-mediated electrical communication between adrenal chromaffin cells in stressed rats. *J Neurosci*. 2008;28(26):6616-26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5597-07.2008. PMID: 18579734; PMCID: PMC6670408.
91. Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C, Guérineau NC. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci*. 2001;21(15):5397-405. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-15-05397.2001. PMID: 11466411; PMCID: PMC6762648.
92. Yamagami K, Moritoyo T, Wakamori M, Sorimachi M. Limited intercellular spread of spontaneous Ca²⁺ signals via gap junctions between mouse chromaffin cells in situ. *Neurosci Lett*. 2002;323(2):97-100. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02578-2. PMID: 11950502.
93. Murray SA, Oyoyo UA, Pharrams SY, Kumar NM, Gilula NB. Characterization of gap junction expression in the adrenal gland. *Endocr Res*. 1995 Feb-May;21(1-2):221-9. doi: 10.3109/07435809509030438. PMID: 7588384.
94. Murray SA, Shah US. Modulation of adrenal gap junction expression. *Horm Metab Res*. 1998 Jun-Jul;30(6-7):426-31. doi: 10.1055/s-2007-978909. PMID: 9694574.

95. Murray SA, Kumar NM, Gilula NB. Gap junction expression in rat adrenal gland. Intercellular communication through gap junctions. In: Kanno Y, Kataoka K, Shiba Y, Shibata Y, Shimazu T, eds. Progress in cell research, vol. 4. New York: Elsevier; 1995;293–296.
96. Murray SA, Pharrams SY. Comparison of gap junction expression in the adrenal gland. *Microsc Res Tech.* 1997 Mar 15;36(6):510-9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970315)36:6<510::AID-JEMT8>3.0.CO;2-L. PMID: 9142697.
97. Sewer MB, Li D. Regulation of steroid hormone biosynthesis by the cytoskeleton. *Lipids.* 2008 Dec;43(12):1109-15. doi: 10.1007/s11745-008-3221-2. Epub 2008 Aug 26. PMID: 18726632; PMCID: PMC2717900.
98. Wiederkehr A, Szanda G, Akhmedov D, Matakı C, Heizmann CW, Schoonjans K, Pozzan T, Spät A, Wollheim CB. Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab.* 2011 May 4;13(5):601-11. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.015. PMID: 21531342.
99. Hall PF. The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. *Steroids.* 1997 Jan;62(1):185-9. doi: 10.1016/s0039-128x(96)00179-1. PMID: 9029735.
100. Мазурина НВ, Ершова ЕВ, Трошина ЕА, Сенюшкина ЕС, Тюльпаков АН, Иоутси ВА. Жировая ткань и функция надпочечников: механизмы взаимного влияния. *Медицинский Совет.* 2019;(4):70-77. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-4-70-77>.
101. Briones AM, Nguyen Dinh Cat A, Callera GE, Yogi A, Burger D, He Y, Corrêa JW, Gagnon AM, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Sorisky A, Ooi TC, Ruzicka M, Burns KD, Touyz RM. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2012 May;59(5):1069-78. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190223. Epub 2012 Apr 9. PMID: 22493070.

102. Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, et al. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:864–70.10.1038/sj.ijo.0803508

103. Er LK, Lin MC, Tsai YC, Hsiao JK, Yang CY, Chang CC, Peng KY, Chueh JS, Wu VC; TAIPAI Study Group. Association of visceral adiposity and clinical outcome among patients with aldosterone producing adenoma. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Jul;8(1):e001153. doi: 10.1136/bmjdr-2019-001153. PMID: 32713841; PMCID: PMC7383952.

104. Marzolla V, Armani A, Zennaro MC, Cinti F, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;350(2):281-8. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.011. Epub 2011 Sep 10. PMID: 21945603.

105. Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, et al. Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human adrenocortical cells. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:1605–16.10.1038/sj.ijo.0803642

106. Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, Gaillard RC. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1998 Oct;139(10):4264-8. doi: 10.1210/endo.139.10.6254. PMID: 9751508.

107. Szücs N, Varga I, Jakab C, Patócs A, Gláz E, Tóth M, et al. Leptin inhibits cortisol and corticosterone secretion in pathologic human adrenocortical cells. *Pituitary*.2001;4:71–7.10.1023/A:1012990928218

108. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996 Feb;17(1):64-102. doi: 10.1210/edrv-17-1-64. PMID: 8641224.

109. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA. Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1991 Jul;265(1):1-9. doi: 10.1007/BF00318133. PMID: 1913772.
110. Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:225–32. doi:10.1210/jcem.78.1.7507122
111. Kanczkowski W, Sue M, Bornstein SR. The adrenal gland microenvironment in health, disease and during regeneration. *Hormones (Athens).* 2017 Jul;16(3):251-265. doi: 10.14310/horm.2002.1744. PMID: 29278511.
112. Kanczkowski W, Sue M, Zacharowski K, Reincke M, Bornstein SR. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;408:241–8. doi:10.1016/j.mce.2014.12.019
113. Lefebvre H, Duparc C, Naccache A, Lopez AG, Castanet M, Louiset E. Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Vitam Horm.* 2019;109:303-339. doi: 10.1016/bs.vh.2018.10.001. Epub 2018 Dec 1. PMID: 30678861.
114. Lefebvre H, Prévost G, Louiset E. Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur J Endocrinol.* 2013; 169(5): R115-38. doi: 10.1530/EJE-13-0308. PMID: 23
115. Hodel A. Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol.* 2001 Feb; 13(2):216-20. doi: 10.1046/j.1365-2826.2001.00628.x. PMID: 11168848.

116. Shepherd SP, Holzwarth MA. Chromaffin cell depolarization results in modulation of corticosteroidogenesis in co-culture. *Endocr Res.* 1996 Nov; 22(4):839-43. doi: 10.1080/07435809609043783. PMID: 8969947.
117. Gallo-Payet N, Pothier P, Isler H. On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol.* 1987 Jun;65(6):588-92. doi: 10.1139/o87-076. PMID: 3426835.
118. Haase M, Willenberg HS, Bornstein SR. Update on the corticomedullary interaction in the adrenal gland. *Endocr Dev.* 2011;20:28-37. doi: 10.1159/000321211. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21164256.
119. Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lübke C, Ehrhart-Bornstein M. Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology.* 1998 Feb;139(2):772-80. doi: 10.1210/endo.139.2.5740. PMID: 9449652.
120. Shepherd SP, Holzwarth MA. Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Jan;280(1):C61-71. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.1.C61. PMID: 11121377.
121. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999 Jan; 79(1):1-71. doi: 10.1152/physrev.1999.79.1.1. PMID: 9922367.
122. Voutilainen R. Adrenocortical cells are the site of secretion and action of insulin-like growth factors and TNF-alpha. *Horm Metab Res.* 1998 Jun-Jul;30(6-7):432-5. doi: 10.1055/s-2007-978910. PMID: 9694575.
123. Luther JM, Gainer JV, Murphey LJ, Yu C, Vaughan DE, Morrow JD, Brown NJ. Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism. *Hypertension.* 2006 Dec;48(6):1050-7. doi: 10.1161/01.HYP.0000248135.97380.76. Epub 2006 Oct 16. PMID: 17043157.

124. Matsuki K, Hathaway CK, Chang AS, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor beta1 and aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(2):139-144. doi:10.1097/MNH.000000000000010
125. Ganguly A, Hampton T, Sumpter D, Chiou S. Impaired aldosterone secretion from dispersed adrenal capsular cells of chronically alpha-MSH-treated rats. *Steroids*. 1986; 47(4-5): 261-8. doi: 10.1016/0039-128x(86)90096-6. PMID: 3035759.
126. Nonaka Y, Okamoto M, Morohashi K, Kirita S, Hashimoto T, Omura T. Functional expression of cDNAs for bovine 11 beta-hydroxylase-aldosterone synthases, P450(11 beta)-2 and -3 and their chimeras. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;41(3-8):779-80. doi: 10.1016/0960-0760(92)90423-g. PMID: 1562554.
127. Okamoto M, Nonaka Y. Molecular biology of rat steroid 11 beta-hydroxylase [P450(11 beta)] and aldosterone synthase [P450(11 beta, ald)]. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;41(3-8):415-9. doi: 10.1016/0960-0760(92)90367-r. PMID: 1562515.
128. Ansurudeen I, Kopf PG, Gauthier KM, Bornstein SR, Cowley AW Jr, Campbell WB. Aldosterone secretagogues increase adrenal blood flow in male rats. *Endocrinology*. 2014 Jan;155(1):127-32. doi: 10.1210/en.2013-1532. Epub 2013 Dec 20. PMID: 24169551; PMCID: PMC3868807.
129. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009;27(5):1006-20. doi: 10.1002/stem.30. PMID: 19415765; PMCID: PMC2746367.
130. Verjans ET, Doijen J, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J Cell Physiol*. 2018 Apr;233(4):2993-3003. doi: 10.1002/jcp.26052. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28618001.

131. Krowicka H, Robinson JE, Clark R, Hager S, Broyles S, Pincus SH. Use of tissue culture cell lines to evaluate HIV antiviral resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Jul; 24(7):957-67. doi: 10.1089/aid.2007.0242. PMID: 18671478; PMCID: PMC2895164.
132. Rahmanian N, Bozorgmehr M, Torabi M, Akbari A, Zarnani AH. Cell separation: Potentials and pitfalls. *Prep Biochem Biotechnol*. 2017;47(1):38-51. doi: 10.1080/10826068.2016.1163579. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27045194.
133. Brasilina Caroccia, Ambrogio Fassina, Teresa Maria Seccia, Chiara Recarti, Lucia Petrelli, Anna Sandra Belloni, Maria Rosa Pelizzo, Gian Paolo Rossi, Isolation of Human Adrenocortical Aldosterone-Producing Cells by a Novel Immunomagnetic Beads Method, *Endocrinology*, Volume 151, Issue 3, 1 March 2010, Pages 1375–1380, <https://doi.org/10.1210/en.2009-1243>
134. Fisher D, Gillian E. Francis, Guo KT, SchAfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP. Cell Separation: A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells*. 2006;24(10):2220-31. doi: 10.1634/stemcells.2006-0015. Epub 2006 Jun 22. PMID: 16794266.
135. Lemaire S, Day R, Dumont M, Chouinard L, Calvert R. Dynorphin and enkephalins in adrenal paraneurons. Opiates in the adrenal medulla. *Can J Physiol Pharmacol*. 1984 Apr;62(4):484-92. doi: 10.1139/y84-078. PMID: 6203634.
136. Moro MA, López MG, Gandía L, Michelena P, García AG. Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*. 1990; 185(2):243-8. doi: 10.1016/0003-2697(90)90287-j. PMID: 2339781.
137. Preiss B, Lehoux JG. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in hamster adrenal mitochondria purified on a sucrose

gradient. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979; 88(3):1140-6. doi: 10.1016/0006-291x(79)91527-4. PMID: 223570.

138. Miao P, Black VH. Guinea pig adrenocortical cells: in vitro characterization of separated zonal cell types. *J Cell Biol.* 1982 Aug; 94(2):241-52. doi: 10.1083/jcb.94.2.241. PMID: 6286688; PMCID: PMC2112878.

139. Wilson SP. Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J Neurosci Methods.* 1987; 19(2):163-71. doi: 10.1016/0165-0270(87)90031-8. PMID: 3546959.

140. Tezapsidis N, Parish DC. Separation of ovine chromaffin granules from lysosomes by successive isoosmolar and hyperosmolar density gradient centrifugation. *Gen Comp Endocrinol.* 1994; 95(2):248-58. doi: 10.1006/gcen.1994.1122. PMID: 7958754.

141. Chu FW, Hyatt PJ. Purification of dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells by Percoll density gradient centrifugation and the isolation of a population of cells highly responsive to adrenocorticotrophin. *J Endocrinol.* 1986; 109(3) :351-8. doi: 10.1677/joe.0.1090351. PMID: 3016135.

142. Hornsby PJ, O'Hare MJ, Neville AM. Functional and Morphological Observations on Rat Adrenal Zona Glomerulosa Cells in Monolayer Culture, *Endocrinology*, Volume 95, Issue 5, 1 November 1974, Pages 1240–1251, <https://doi.org/10.1210/endo-95-5-1240>

143. Feige JJ, Keramidas M, Chambaz EM. Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. *Horm Metab Res.* 1998; 30(6-7):421-5. doi: 10.1055/s-2007-978908. PMID: 9694573.

144. Сидоренко ОС, Божок ГА, Легач ЄІ, Бондаренко ТП. Експресія β-III-тубуліну в культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят, отриманої з кріоконсервованих фрагментів тканини. *Проблеми кріобіології.* 2012. 22(2):200.

145. Ушакова ЕМ, Сидоренко ОС, Бабийчук ГА, Бондаренко ТП, Божок ГА. Формирование мультиклеточных сфероидов в культурах клеток надпочечников поросят разного возраста. Вестник проблем биологии и медицины. 2018;1(142):79-83.

146. Cronshaw J, Collie MA, Holmes WN. Functional and morphological changes associated with the ageing of primary cultures of embryonic adrenal gland cells derived from the Pekin duck. Cell Tissue Res. 1992; 269(3):535-45. doi: 10.1007/BF00353908. PMID: 1330316.

147. Алабедаькарим НМ, Ден Бо, Устиченко ВД, Бондаренко ТП. Гормонопродуцирующая активность криоконсервированных и SIS-инкапсулированных фрагментов надпочечников новорожденных поросят *in vitro* и при ксенотрансплантации. Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. 2008; 828(8): 119–124.

148. Алабедаькарим НМ, Устиченко ВД, Дудецкая ГВ, Бондаренко ТП. Криоконсервирование органотипических культур надпочечных желез: дополнительные повреждения или репарация. Вісник проблем біології і медицини. 2007; 1: 67–72.

149. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, Gurina TM, Sukach AN, Kholodnyy VS, Ustichenko VD, Bilyavskaya SB, Bondarenko TP, Legach EI. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. Cryobiology. 2016 Oct;73(2):152-61. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.08.006. Epub 2016 Aug 15. PMID: 27539465.

150. Бондаренко Т. П., Легач Є. І. Пат. 34848 А Україна, МПК5 C12N5/02. Спосіб криоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини / заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ. № 99073996; заявл.: 13.07.99; опубл.: 15.03.01, – Бюл. № 2.

151. Бондаренко ТП, Геращенко АВ. Функціональні характеристики органної культури надпочечників новонароджених

поросят после криоконсервирования. Проблеми криобиології. 2001; 2: 108-109.

152. Bondarenko TP, Legach EI, Kiroshka VV. Cultivation, cryopreservation and tissue transplantation of endocrine glands Actual problems of cryobiology and cryomedicine. Kharkiv: IPCC, 361-401

153. Karpenko LG, Gubina NF, Schirova VA, Kaprelyants AS. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex. Cryo Letters. 2001 Jul-Aug; 22(4): 229-34. PMID: 11788863.

154. Гольцев А.Н. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. 2012. Харьков: 767.

155. Легач ЕИ, Чуйко ВА, Бондарева ИМ. Влияние димексида и пропандиола на освобождение кортизола срезами адренокортикальной ткани и ее чувствительность к действию стимуляторов. Проблемы криобиологии. 1997; 4:37–41.

156. Till H, Stachel D, Müller-Höcker J, St Kellnar, Joppich I. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats. Eur J Pediatr Surg. 1998 Aug;8(4):240-3. doi: 10.1055/s-2008-1071162. PMID: 9783149.

157. Карпенко ЛГ, Губина НФ, Щирова ВА. Активность аденилатциклазы в плазматических мембранах тироцитов и кортикоцитов после действия замораживания и ДМСО. Проблемы криобиологии. 2000; 2:58–63.

158. Легач ЕИ. Синтез кортизола тканевыми и клеточными культурами коры надпочечниковых желез новорожденных и половозрелых свиней. Проблемы криобиологии. 1997;3:63-65.

159. Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Секретирующая способность адренокортикальной ткани новорожденных и половозрелых свиней при действии низких температур. Проблемы криобиологии. 1998; 2:50–4.

160. Гуріна ТМ, Алабедацькарім НМ, Устиченко ВД, Бондаренко ТП. Спосіб кріоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят. Патент № 4567, к/м. МПК7. А01N1/02. заявл.: 07.06.04. публ. 17.01.05. Бюл №1. 2005.

161. Ustichenko VD, Alabedalkarim NM, Bilyavskaya SB, Bondarenko TP. cAMP-dependent regulation of hormonopoesis in newborn piglets cryopreserved organ cultures of thyroid and adrenal glands. Укр. біохім журнал. 2005;77(2):81.

162. Бондаренко ТП, Геращенко АВ, Алабедацькарім НМ, Божок ГА. Влияние экстрактов гипофиза на содержание белка и 11-ОКС при культивировании органной культуры надпочечников новорожденных поросят. Труды науч. конф. посвященной 100-летию со дня рождения акад. ИН Буланкина; 2001 янв. 16-17; Харьков. Харьков: с. 22-23.

163. Бондаренко ТП, Геращенко АВ, Кирюшина ИИ (Самченко ИИ). Влияние димексида и экстрактов гипофиза на гормональную активность клеток культуры коры надпочечников новорожденных поросят. Проблемы криобиологии. 1998; 3:55-57.

164. Грищенко ВИ, Чуйко ВА, Пушкарь НС. Крiоконсервация тканей и клеток эндокринных органов. Киев: Наук. думка, 1993; 242 с.,

165. Устиченко ВД, Алабедацькарім НМ, Сирота ВВ. Суспензія адренкортикоцитів та органна культура надниркових залоз як об'єкти дослідження базального та стимульованого стероїдогенезу. Укр. біохім. журн. 2004;76(4):139–140.

166. Устиченко ВД. Морфофункціональні характеристики клітин надниркових залоз при дії різних режимів заморожування [дисертація]. Харків: ПІКІК НАНУ; 2008. 170 с.

167. Устиченко ВД, Алабедацькарім НМ, Бондаренко ТП. Иммуномодулирующее влияние димексида и криоконсервирования при ксенотрансплантации надпочечников. Трансплантологія. 2007; 1(9):296–298.

168. Легач ЕИ, Чуйко ВА. Криозащитная эффективность димексида и 1,2-пропандиола при замораживании адренкортикальной ткани. Проблемы криобиологии. 1998; 4: 68-69.
169. Алабедацькарім НМ, Ден Бо, Губіна НФ, Бондаренко ТП. Селективне збереження зонально диференційованих клітин надниркових залоз новонароджених поросят при SIS-інкапсульованій трансплантації щурам. Науковий вісник ЛНАВМ ім. С.З. Гжицького. 2007; 9(2): 39-43.
170. Устиченко ВД, Алабедацькарім НМ, Бондаренко ТП. Влияние сохранения архитектоники ткани на криочувствительность надпочечных желез мышей и новорожденных поросят. Проблемы криобиологии. 2004;3:39–45.
171. Устиченко ВД, Бондаренко ТП. Влияние дегидратации и регидратации на клеточность и жизнеспособность адренкортикальных клеток в суспензии. Матеріали науково-практичної конференції «Сучасні напрямки розвитку ендокринології». 2004; 267.
172. Тамарина ИВ, Божок ГА, Гурина ТМ, Губина НФ, Бондаренко ТП. Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников новорожденных мышей. I. Влияние концентрации ДМСО в составе криозащитной среды. Проблемы криобиологии. 2012;22(1):79–87.
173. Тамарина ИВ, Божок ГА. Вплив різних концентрацій ДМСО і ЕТС в складі криозахисних середовищ на морфо-функціональні властивості клітин надниркових залоз новонароджених мишей. Проблемы криобиологии. 2012; 22(2):201.
174. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 Ендокринологія 2003, 8(1): 142-145.
175. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011. 691 с.

176. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015; 111:A3.B.1-A3.B.3. Published 2015 Nov 2. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111
177. Устиченко ВД, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Оценка жизнеспособности клеток надпочечников новорожденных поросят при помощи флуоресцентных красителей. *Вісник проблем біології і медицини.* 2010; 4: 247-250.
178. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, Soni R, Dwarakanath BS, Bhatt AN. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* 2018; 8(1):1531. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w. PMID: 29367754; PMCID: PMC5784148.
179. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol.* 1985 Mar; 100(3):965-73. doi: 10.1083/jcb.100.3.965. PMID: 3972906; PMCID: PMC2113505.
180. Tchoukalova YD, Harteneck DA, Karwoski RA, Tarara J, Jensen MD. A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *J Lipid Res.* 2003 Sep; 44(9):1795-801. doi: 10.1194/jlr.D300001-JLR200. Epub 2003 Jun 1. PMID: 12777477.
181. Chou CW, Lin J, Hou HY, Liu YW. Visualizing the Interrenal Steroidogenic Tissue and Its Vascular Microenvironment in Zebrafish. *J Vis Exp.* 2016; (118):54820. Published 2016 Dec 21. doi:10.3791/54820
182. Гордиенко Е. А., Пушкарь Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. К.: Наукова думка. 1994;142 с.
183. Безуглый НД, Осташко ФИ, Волкова ЕГ и др. Волюмометрия как метод изучения проницаемости мембранного аппарата яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих/ Научн.-техн. бюл. НИИ животновод.- Лесостепья и Полесья УССР. 1986. №43. С. 29–35.

184. Пирс Э. Гистохимия. издательство иностранной литературы, Москва 196; с.962/
185. Юрчук ТА, Божок ГА, Боровой ИА, Гурина ТМ, Зубов ПМ, Бондаренко ТП, Малюкин ЮВ. Влияние условий криоконсервирования в бессывороточных, сывороткосодержащих криозащитных средах на формирование j-агрегатов в клетках коры надпочечников крыс. Проблемы криобиологии. 2011;21(4):406–415.
186. Poli G, Sarchielli E, Guasti D, Benvenuti S, Ballerini L, Mazzanti B, Armignacco R, Cantini G, Lulli M, Chortis V, Arlt W, Romagnoli P, Vannelli GB, Mannelli M, Luconi M. Human fetal adrenal cells retain age-related stem- and endocrine-differentiation potential in culture. *FASEB J.* 2019 Feb;33(2):2263-2277. doi: 10.1096/fj.201801028RR. Epub 2018 Sep 24. PMID: 30247985.
187. Roskelley C. D., Auersperg N. Density Separation of Rat Adrenocortical Cells: Morphology, Steroidogenesis, and P-450scc Expression in Primary Culture *In Vitro Cellular & Developmental Biology* Vol. 26, No. 5 (May, 1990), pp. 493-501.
188. Hoj JP, Davis JA, Fullmer KE, Morrell DJ, Saguibo NE, Schuler JT, Tuttle KJ, Hansen MD. Cellular contractility changes are sufficient to drive epithelial scattering. *Exp Cell Res.* 2014 Aug 15;326(2):187-200. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.011. Epub 2014 Apr 26. PMID: 24780819.
189. Cardoso CC, Bornstein SR, Hornsby PJ. Optimizing orthotopic cell transplantation in the mouse adrenal gland. *Cell Transplant.* 2010;19(5):565-72. doi: 10.3727/096368910X509077.
190. Hornsby PJ. Transplantation of adrenocortical cells. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2:313–321. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Jun;85(2-5):285-90.
191. Thomas M, Wang X, Hornsby PJ. Human adrenocortical cell xenotransplantation: model of cotransplantation of human adrenocortical cells and 3T3 cells in scid mice to form vascularized functional tissue and prevent

adrenal insufficiency. *Xenotransplantation*. 2002 Jan;9(1):58-67. doi: 10.1046/j.0908-665x.2001.00138.x. PMID: 12005105.

192. Teebken OE, Scheumann GF. Differentiated corticosteroid production and regeneration after selective transplantation of cultured and noncultured adrenocortical cells in the adrenalectomized rat. *Transplantation*. 2000 Sep 15;70(5):836-43. doi: 10.1097/00007890-200009150-00022. PMID: 11003367.

193. Chen L, Huang H, Sharma HS, Zuo H, Sanberg PR. Cell transplantation as a pain therapy targets both analgesia and neural repair. *Cell Transplant*. 2013;22 Suppl 1:S11-9. doi: 10.3727/096368913X672091. Epub 2013 Aug 29. PMID: 23992823.

194. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.

195. Kina T, Ikuta K, Takayama E, Wada K, Majumdar AS, Weissman IL, Katsura Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol*. 2000 May;109(2):280-7. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.02037.x. PMID: 10848813.

196. Murray SA, Shah U. Modulation of adrenal gap junction expression-paracrine and neuroendocrine regulation of the adrenal cortex. *Horm Metab Res Exp Endocrinol Metab*. 1998;30:426-431.

197. Vantyghem MC, Douillard C, Balavoine AS. Hypotensions d'origine endocrinienne [Hypotension from endocrine origin]. *Presse Med*. 2012 Nov;41(11):1137-50. French. doi: 10.1016/j.lpm.2012.03.023. Epub 2012 Sep 10. PMID: 22975403.

198. Werumeus Buning J, van Faassen M, Brummelman P, Dullaart RP, van den Berg G, van der Klauw MM, Kerstens MN, Stegeman CA, Muller Kobold AC, Kema IP, Wolffenbuttel BH, van Beek AP. Effects of

Hydrocortisone on the Regulation of Blood Pressure: Results From a Randomized Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Oct;101(10):3691-3699. doi: 10.1210/jc.2016-2216. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27490921.

199. Murray SA, Pharrams S. Comparison of gap junction expression in the adrenal gland. *Microscope Res Technol.* 1997; 36: 510–519.

200. El Ghorayeb N, Bourdeau I, Lacroix A. Role of ACTH and Other Hormones in the Regulation of Aldosterone Production in Primary Aldosteronism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016 Jun 27;7:72. doi: 10.3389/fendo.

201. Natarajan R, Ploszaj S, Horton R, Nadler J. Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis. *Endocrinology* 1989; 125: 3084-9.

202. Sirianni R, Nogueira E, Bassett MH, Carr BR, Suzuki T, Pezzi V, Andò S, Rainey WE. The AP-1 family member FOS blocks transcriptional activity of the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *J Cell Sci.* 2010 Nov 15;123(Pt 22):3956-65. doi: 10.1242/jcs.055806. Epub 2010 Oct 27. PMID: 20980388; PMCID: PMC2972275.

203. Nussdorfer G.G. (1986). *Cytophysiology of the adrenal cortex.* Int. Rev. Cytol. Vol 98, 1-405 Academic Press Inc. London

204. Ock S, Rho G. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). *Cell Transplant.* 2011; 20(8); 1231–1239.

205. Odermatt A, Strajhar P, Engeli RT. Disruption of steroidogenesis: Cell models for mechanistic investigations and as screening tools *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2016; 158: 9–21 doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.01.009

206. Oelkers W, Diederich S, Bahr V. Therapeutic strategies in adrenal insufficiency. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2001;62(2):212-216.

207. Okamoto M, Nonaka Y. Molecular biology of rat steroid 11 beta-hydroxylase [P450(11 beta)] and aldosterone synthase [P450(11 beta, ald)]. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 41(3-8): 415-9. doi: 10.1016/0960-0760(92)90367-r. PMID: 1562515.
208. Orth DN, Kavacs WJ, Rowan DeBold C The Adrenal Cortex. In: Wilson JD, Foster DW (eds) *William's Textbook of Endocrinology*. Saunders, Philadelphia, 1992; 489–619.
209. Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol.* 2007 Jun;193(3):331-47. doi: 10.1677/JOE-07-0055.
210. Palacios G, Lafarga M. Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell and Tissue Research.* 1975;2:275-278.
211. Papreck JR, Martin EA, Lazzarini P, Kang D, Kim D. Modulation of K2P3.1 (TASK-1), K2P9.1 (TASK-3), and TASK-1/3 heteromer by reactive oxygen species. *Pflugers Arch.* 2012;464(5):471-80. doi: 10.1007/s00424-012-1159-y.
212. Park KS, Kim JH, Ku EJ, Hong AR, Moon MK, Choi SH, Shin CS, Kim SW, Kim SY. Clinical risk factors of postoperative hyperkalemia after adrenalectomy in patients with aldosterone-producing adenoma. *Eur J Endocrinol.* 2015; 172(6):725-31. doi: 10.1530/EJE-15-0074.
213. Pedersen RC. Cholesterol biosynthesis, storage, and mobilization in peptide hormone and steroidogenesis. *Vit Horm.* 1996;52:129-148.
214. Penton D, Bandulik S, Schweda F, Haubs S, Tauber P, Reichold M, Cong LD, El Wakil A, Budde T, Lesage F, Lalli E, Zennaro MC, Warth R, Barhanin J. Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension. *Endocrinology.* 2012;153(10):4740-4748.
215. Peter M, Dubuis JM. Transcription factors as regulators of steroidogenic P-450 enzymes. *Eur J Clin Invest.* 2000; 3:14-20. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.0300s3014.x. PMID: 11281362.

216. Petrovic-Kosanovic D, Ajdzanovic V, Cakic-Milosevic M, Koko V, Milosevic V. The effects of acute heat stress on proliferative and apoptotic processes in the rat adrenal cortex. *Arch. Biol. Sci.* 2013; 65: 905–909. [10.2298/ABS1303905K](https://doi.org/10.2298/ABS1303905K)
217. Pihlajoki M, Dörner J, Cochran RS, Heikinheimo M, Wilson DB. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015; 6: 27. doi: [10.3389/fendo.2015.00027](https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00027).
218. Plaksina, E. M., Sidorenko, O. C., & Bozhok, G. A. Cryopreservation of Multicellular Spheroids Derived From Newborn Piglet Adrenal Glands. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, (2017). 27(4), 322–333. <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.322>,
219. Poli G, Sarchielli E, Guasti D, Benvenuti S, Ballerini L, Mazzanti B, Armignacco R, Cantini G, Lulli M, Chortis V, Arlt W, Romagnoli P, Vannelli GB, Mannelli M, Luconi M. Human fetal adrenal cells retain age-related stem- and endocrine-differentiation potential in culture. *FASEB J.* 2019 Feb;33(2):2263-2277. doi: [10.1096/fj.201801028RR](https://doi.org/10.1096/fj.201801028RR). Epub 2018 Sep 24. PMID: 30247985.
220. Popnikolov N.K., Hornsby P.J. 1999 Subcutaneous transplantation of bovine and human adrenocortical cells in collagen gel in scid mice. *Cell Transplant* 8: 617-625.
221. Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, et al. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1998;139:4264–8. [10.1210/endo.139.10.6254](https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6254)
222. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, Soni R, Dwarakanath BS, Bhatt AN. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep.* 2018;8(1):1531. doi: [10.1038/s41598-018-19930-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w).

223. Rashid S, Lewis GF. The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38:401–409.
224. Raven PW, McAuley ME, Vinson GP. Serine proteases selectively control the output of 18-hydroxycorticosterone and aldosterone in stimulated zona glomerulosa tissue of the rat adrenal. *J Endocrinol*. 1983;99(1):13-22. doi: 10.1677/joe.0.0990013. PMID: 6313838.
225. Ravindra R, Grosvenor CE. Involvement of cytoskeleton in polypeptide hormone secretion from the anterior pituitary lobe: a review. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1990.71:165-176.
226. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med* 1993; 329: 1246-53.
227. Roskelley C, Auersperg N. Mixed parenchymal-stromal populations of rat adrenocortical cells support the proliferation and differentiation of steroidogenic cells. *Differentiation*. 1993;55(1):37-45. doi: 10.1111/j.1432-0436.1993.tb00031.x. PMID: 8299879.
228. Rossi GP, Belfiore A, Bernini G, Fabris B, Caridi G, Ferri C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mannelli M, Palumbo G, Patalano A, Rizzoni D, Rossi E, Pessina AC, Mantero F; Primary Aldosteronism Prevalence in hYpertension Study Investigators. Body mass index predicts plasma aldosterone concentrations in overweight-obese primary hypertensive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(7): 2566-71. doi: 10.1210/jc.2008-0251.
229. Scheumann GF, Heitmann P, Teebken OE, Mössinger E, Mellon SH, Pichlmayr R. Enzymatic properties of transplanted glomerulosa cells. *World J Surg*. 1996;20(7):933-8; discussion 938-9. doi: 10.1007/s002689900142. PMID: 8678974.
230. Schinner S, Bornstein SR. Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol*. 2005;16(2):91-8. doi: 10.1385/ep:16:2:091. PMID: 16199893.

231. Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, et al. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:864–70. doi:10.1038/sj.ijo.0803508
232. Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H. Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Front Horm Res*. 2004;31:1-25. doi:10.1159/000074656. PMID: 14674302.
233. Seccia TM, Caroccia B, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Rossi GP. The Biology of Normal Zona Glomerulosa and Aldosterone-Producing Adenoma: Pathological Implications. *Endocr Rev*. 2018;39(6):1029-1056. doi:10.1210/er.2018-00060
234. Seeliger H, Hoffmann MW, Behrend M, Teebken OE, Tschernig T, Philippens K, Schürmeyer TH, Klempnauer J, Scheumann GF. Transplantation of H-2Kb-transgenic adrenocortical cells in the mouse having undergone an adrenalectomy: functional and morphological aspects. *Transplantation*. 2000;69(8):1561-6. doi: 10.1097/00007890-200004270-00007.
235. Shepherd SP, Holzwarth MA. Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jan;280(1):C61-71. doi:10.1152/ajpcell.2001.280.1.C61. PMID: 11121377.
236. Чуйко ВА, Карпенко ЛГ, Иванова ЕИ и др. Криоконсервация коры надпочечников. *Проблемы криобиологии*. 1995; 1: 47–51.
237. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of Expression of mRNA and Protein by Glucocorticoids and cAMP *Cell Biology and Metabolism*. 1992; 271(10): 5301-5304.
238. Simpson ER, Waterman MR. Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Can J Biochem Cell Biol*. 1983 Jul;61(7):692-707. doi: 10.1139/o83-088. PMID: 6313163.

239. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):489-539. doi: 10.1152/physrev.00030.2003. PMID: 15044681.
240. Spät A. Glomerulosa cell-a unique sensor of extracellular K⁺ concentration. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Mar 31; 217(1-2): 23-6. doi: 10.1016/j.mce.2003.10.046.
241. Stocco D. M. Elements involved in the regulation of the StAR gene *Mol. Cell Endocrinol.* 2001;177:55-59.
242. Stocco DM, Clark BJ. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:197-205.
243. Strauss JF, Golos TG, Silavin SL, Soto EA, Takagi K: Involvement of cyclic AMP in the functions of granulosa and luteal cells: regulation of steroidogenesis. *Prog Clin Biol Res.* 1988;267:177-200. PMID: 2853367.
244. Юрчук ТА. Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные свойства клеток коры надпочечных желез крыс [дисертація]. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2016. 146 с.
245. Sun N, Wu Y, Nanba K, Sbiera S, Kircher S, Kunzke T, Aichler M, Berezowska S, Reibetanz J, Rainey WE, Fassnacht M, Walch A, Kroiss M. High-Resolution Tissue Mass Spectrometry Imaging Reveals a Refined Functional Anatomy of the Human Adult Adrenal Gland. *Endocrinology.* 2018;159(3):1511-1524. doi: 10.1210/en.2018-00064.
246. Szücs N, Hampton RY, Holz RW. Effects of changes in osmolality on the stability and function of cultured chromaffin cells and the possible role of osmotic forces in exocytosis. *J Cell Biol.* 1983 Apr;96(4):1082-8. doi: 10.1083/jcb.96.4.1082. PMID: 6833392; PMCID: PMC2112313.
247. Nishisako H, Ikehara T, Shiraishi T, Minami Y, Sasaki HI, Houchi H, Kawazoe K, Minakuchi K, Kitamura M, Shono M, Yoshizaki K, Kinouchi Y, Miyamoto H. Effects of a 1.5 T time-varying magnetic field on

- cell volume regulation of bovine adrenal chromaffin cells in hyposmotic media. *J Med Invest.* 2011 Feb; 58(1-2):95-105. doi: 10.2152/jmi.58.95. PMID: 21372493.
248. Sharpe RL, Milligan CL. Lactate efflux from sarcolemmal vesicles isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* white muscle is via simple diffusion. *J Exp Biol.* 2003 Feb;206(Pt 3):543-9. doi: 10.1242/jeb.00126. PMID: 12502775.
249. Thomas M, Northrup SR, Hornsby PJ. Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med.* 1997 Sep; 3(9): 978-83. doi: 10.1038/nm0997-978. PMID: 9288723.
250. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G., et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. 197 (1): 40-45.
251. Di Blasio AM, Fujii DK, Yamamoto M, Martin MC, Jaffe RB. Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotrophic hormone: rationalization of in vitro and in vivo findings. *Biol Reprod.* 1990 Apr;42(4):683-91. doi: 10.1095/biolreprod42.4.683. PMID: 2161262.
252. Tischler AS, DeLellis RA, Perlman RL, Allen JM, Costopoulos D, Lee YC, Nunnemacher G, Wolfe HJ, Bloom SR. Spontaneous proliferative lesions of the adrenal medulla in aging Long-Evans rats. Comparison to PC12 cells, small granule-containing cells, and human adrenal medullary hyperplasia. *Lab Invest.* 1985 Oct;53(4):486-98. PMID: 2864475.
253. Tischler AS, Ruzicka LA, Van Pelt CS, Sandusky GE. Catecholamine-synthesizing enzymes and chromogranin proteins in drug-induced proliferative lesions of the rat adrenal medulla. *Lab Invest.* 1990 Jul;63(1):44-51. PMID: 1695697.

254. Tokar SL, Koval LM, Lukynetz EA, Yavorskaya EN Features of cultural rat adrenocortical cells ultrastructure in norm and after adrenocorticotropic hormone or calcim ionofore A23187 application *Фізіол журнал* 2004, т. 50, № 2 ISSN 0201-8489.

255. Torpy DJ, Stratakis CA, Chrousos GP. Hyper- and hypoaldosteronism. *Vitam Horm.* 1999; 57:177-216. doi: 10.1016/s0083-6729(08)60644-5. PMID: 10232050.

256. Tron'ko ND, Pushkarev VM, Bogdanov TI, Sautin IuIu, Mikosha AS. Poluchenie i fraktsionirovanie v gradiente perkolla kletok kory nadpochechnikov morskikh svinok i kharakteristika ikh funktsional'nogo sostoianiia [Isolation and fractionation in percoll gradient of guinea pig adrenal cortex cells and their functional characteristics]. *Fiziol Zh.* 1989 Jul-Aug; 35(4):52-61. Russian. PMID: 2551744.

257. Udhane S, Kempna P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE (2013) Differential Regulation of Human 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 for Steroid Hormone Biosynthesis by Starvation and Cyclic Amp Stimulation: Studies in the Human Adrenal NCI-H295R Cell Model. *PLoS ONE* 8(7): e68691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068691>

258. Mazur P, Karow AM, Pegg DE. Organ preservation for transplantation. New York: Bassel, 1981:143–176.

259. Цуцаева АА. Криоконсервирование клеточных суспензий. Киев: Наук. Думка, 1983. 240 с.

260. Ramos TV, Mathew AJ, Thompson ML, Ehrhardt RO. Standardized cryopreservation of human primary cells. *Curr Protoc Cell Biol.* 2014 Sep 2;64: A.3I.1-8. doi: 10.1002/0471143030.cba03is64. PMID: 25181304.

261. Vo Morris CB. Cryopreservation of animal and human cell lines. *Methods Mol Biol.* 2007;368:227-36. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_16. PMID: 18080474.

262. Stacey GN, Dowall S. Cryopreservation of primary animal cell cultures. *Methods Mol Biol.* 2007;368:271-81. doi: 10.1007/978-1-59745-362-2_19. PMID: 18080477.
263. Wang T, Rowland JG, Parmar J, Nesterova M, Seki T, Rainey WE. Comparison of aldosterone production among human adrenocortical cell lines. *Horm Metab Res.* 2012; 44(3):245-50. doi: 10.1055/s-0031-1298019. Epub 2012 Jan 20. PMID: 22266826; PMCID: PMC4269336.
264. Wang X, Hua TC, Sun DW, Liu B, Yang G, Cao Y. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology.* 2007 Aug;55(1):60-5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.05.006.
265. Williams B, MacDonald TM, Morant S, Webb DJ, Sever P, McInnes G, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Salsbury J, Mackenzie I, Padmanabhan S, Brown MJ; British Hypertension Society's PATHWAY Studies Group. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet.* 2015 Nov 21; 386(10008):2059-2068. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00257-3.
266. Wolkersdörfer GW, Bornstein SR. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochem Pharmacol.* 1998 Jul 15;56(2):163-71. doi: 10.1016/s0006-2952(98)00067-7. PMID: 9698069.
267. Wood MA, Acharya A, Finco I, Swonger JM, Elston MJ, Tallquist MD, Hammer GD. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Development.* 2013; 140(22): 4522-32. doi: 10.1242/dev.092775.
268. Huebinger J. Modification of cellular membranes conveys cryoprotection to cells during rapid, non-equilibrium cryopreservation. *PLoS One.* 2018 Oct 10;13(10):e0205520. doi: 10.1371/journal.pone.0205520. PMID: 30304023; PMCID: PMC6179263.

269. Коваленко ГВ, Коваленко ИФ, Линник ТП. Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика. Вісник Харків. нац. універ. ім. ВН Каразіна. 2009; 10(878): 106–109.

270. Yao J, McHedlishvili D, McIntire WE, Guagliardo NA, Erisir A, Coburn CA, Santarelli VP, Bayliss DA, Barrett PQ. Functional TASK-3-Like Channels in Mitochondria of Aldosterone-Producing Zona Glomerulosa Cells. *Hypertension*. 2017 Aug; 70(2): 347–356. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08871. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28630209; PMCID: PMC5551440.

271. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep*. 1994;14(6):259-81. doi: 10.1007/BF01199051. PMID: 7620078.

272. Zhou D, Kusnecov AW, Shurin MR, DePaoli M, Rabin BS. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 1993 Dec; 133(6):2523-30. doi: 10.1210/endo.133.6.8243274. PMID: 8243274.

273. Zupekan T, Dunn JC. Adrenocortical cell transplantation reverses a murine model of adrenal failure. *J Pediatr Surg*. 2011;46(6):1208-13. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.03.057. PMID: 21683224; PMCID: PMC3118992.

274. MacKenzie SM, van Kralingen JC, Davies E. Regulation of Aldosterone Secretion. *Vitam Horm*. 2019; 109:241-263. doi: 10.1016/bs.vh.2018.07.001.

275. Zennaro MC, Boulkroun S, Fernandes-Rosa F. An update on novel mechanisms of primary aldosteronism. *J Endocrinol*. 2015 Feb; 224(2):R63-77. doi: 10.1530/JOE-14-0597. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25424518.

276. Changlong Hu, NickA. Guagliardo, Paula Q. Barrett Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are in trinsicelectricaloscillators J Clin Invest. 2012;122(6):2046-2053. <https://doi.org/10.1172/JCI6199>

277. Chang LL, Wun WS, Wang PS. Effects of dehydroepiandrosterone on aldosterone release in rat zona glomerulosa cells. J Biomed Sci. 2008 Jul; 15(4):463-70. doi: 10.1007/s11373-008-9241-3. Epub 2008 Mar 7. PMID: 18324480.

278. Auersperg N. Effects of culture conditions on the growth and differentiation of transformed rat adrenocortical cells. Cancer Res. 1978 Jul; 38(7): 1872–84. PMID: 207413.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації *Статті у фахових журналах України*

1. Дудецька ГВ, Божок ГА, Зубов ПМ, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Вплив різних швидкостей охолодження на життєздатність та клітинний склад суспензії клітин надниркових залоз при кріоконсервуванні. Проблемы криобиологии. 2012; 22(1): 30–8.

2. Дудецкая ГВ, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Изучение возможности кріоконсервирование клеток надпочечников взрослых крыс. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, серія біологія. 2010; 12(920): 111–17.

3. Дудецкая ГВ, Коваленко ИФ, Бондаренко ТП. Влияние температуры и различных концентраций диметилсульфоксида на проницаемость мембран клеток надпочечников для воды и криопротектора. Вісник проблем біології і медицини. 2011; 4(90): 85–8.

4. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Влияние скорости охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс. Проблемы криобиологии. 2010; 20(4): 379–87.

Статті у фахових зарубіжних журналах

5. Alabedalkarim NM, Bozhok GA, Legach EI, Ustichenko VD, Zubov PM, Bilyavskaya SB, Dudetskaya GV, et al. Outcome of adrenal tissue fragments allotransplantation: The impact of cryopreservation. Cryobiology. 2012; 65(3): 188–5. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.05.013> Scopus.

Тези наукових конференцій

6. Дудецкая ГВ, Юрчук ТА, Устиченко ВД, Алабедалькарим НМ, Бондаренко ТП. Регидратированные адренкортикоциты как модель кріоконсервированных стероидпродуцирующих клеток. Холод в биологии и медицине – 2006: мат. 30-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 24-25 мая 2006 г.). Проблемы криобиологии. 2006; 16(4): 43.

7. Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Дудецкая ГВ, Колот НВ, Погребняк НЛ, Легач ЕИ. Использование флуоресцентных полиметиновых красителей в клеточной трансплантации. Матеріали ІІІ Міжнар. симпозиуму «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»; 2007 квіт. 25–26; Москва; с. 56.
8. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД, Алабедаькарим НМ. Цитофлуориметрическая оценка эффективности криоконсервирования цельной суспензии и различных субпопуляций адреноцитов новорожденных поросят. Холод в биологии и медицине – 2007: мат. 31-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 16-17 мая 2007 г.). Проблемы криобиологии. 2007; 17(2): 204.
9. Dudetska GV, Yurchuk TA, Alabedalkarim NM. Fluorescent and radioimmunological investigation of native and cryopreserved adrenocytes: mitochondrial potential and hormone secretion. International workshop of the physiological society “Molecular physiology of membrane transport and cell excitability”; 2007 Sep 19-23; Yaremche, Ukraine; p. 22.
10. Дудецкая ГВ, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Гормонпродуцирующая активность клеток надпочечников новорожденных поросят, выделенных в градиенте плотности сахарозы. Експериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики, Шості Данилевські читання; 2007 лют. 22-23; Харків; с. 40.
11. Dudetska GV, Ustichenko VD, Yurchuk TA, Alabedalkarim NM, Bondarenko TP. Rehydrated Adrenocorticytes as a Model of Cryopreserved Steroido–Producing Cells Cell Preservation Teshnology. 2008; 6(1): 99.
12. Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Боровой ИА, Пахомов АВ, Билявская СБ, Дудецкая ГВ, Легач ЕИ. Культивирование и трансплантация клеток эндокринных желез, меченных флуоресцентным полиметиновым красителем, на коллагеновом матриксе. Матеріали Всеросійської конференції з міжнародною участю ”Иновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток”; 2008 черв. 18-20; Самара; с.148-150.

13. Дудецкая ГВ, Алабедаькарим НМ. Характеристика популяций адренкортикоцитов новорожденных поросят, выделенных в градиенте фикола. Матеріали I міжнародної наукової конференції “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології”; 2009 лют. 23-26; Донецьк; с. 29.

14. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Влияние факторов криоконсервирования на сохранность клеток надпочечников крыс. Холод в биологии и медицине – 2010: мат. 34-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 27-28 мая 2010 г.). Проблемы криобиологии. 2010; 20(2): 193.

15. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД, Бондаренко ТП. Влияние температуры инкубации и растворов, содержащих различные концентрации диметилсульфоксида, на жизнеспособность клеток надпочечников крыс. Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті. Проблемні питання”; 2010 жовт. 28-29; Харків; с. 36-37.

16. Дудецкая ГВ, Устиченко ВД. Сохранность клеток надпочечников крыс после криоконсервирования в средах различного композиционного состава. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю “Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології”; 2011 3-4 берез. Харків; с. 43.

17. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Подбор условий культивирования клеток надпочечников взрослых крыс. Холод в биологии и медицине. Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии – 2011: мат. 35-й ежегодн. конф. Молодых ученых (г. Харьков, 27-28 мая 2011 г.). Проблемы криобиологии. 2011; 21(2): 216.

18. Бондаренко ТП, Легач ЕИ, Божок ГА, Алабедаькарим НМ, Устиченко ВД, Билявская СБ, Пахомов АВ, Дудецкая ГВ, Сидоренко ОС. Получение криоконсервированных культур клеток и тканей эндокринных желез для лечения гормональной недостаточности методом трансплантации.

IV щорічна науково-практична конференція з міжнародною участю «Новое в практической криомедицине» 2010 листоп. 9 Москва, с. 20–21.

19. Дудецкая ГВ, Ден Бо, Алабедаькарим НМ Разделение различных субпопуляций клеток надпочечников крысы в градиенте сахарозы. Матеріали ІХ українського біохімічного з'їзду, 2006 жовт. 24-27 Харків, Т. 2, с.183.

20. Дудецкая ГВ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Оценка функциональной активности клеток надпочечников с помощью флуоресцентных красителей. Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті”, 2011 жовт. 27-28 Харків, с. 31-32.

21. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Диференціальна чутливість клітин кіркової і мозкової речовини наднирників щурів при кріоконсервуванні з різними швидкостями охолодження Матріали Міжнародної науково-практичної конференції «Modern methods, innovations and operational experience in the field of psychology and pedagogics», 2017 груд. 27-28; Люблін, с. 199–201.

22. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Вплив кріоконсервування на збереження альдостеронпродукуючих клітин наднирників Науково-практична конференція «Медична наука та практика: виклики і сьогодення», 2018 серп. 24-25; Львів, с. 84–7.

23. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Підбір умов культивування кріоконсервованих клітин кори надниркових залоз щурів. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології», Вісімнадцяті Данилевські читання; 2019 28 лют-1 бер; Харків, с. 37.

24. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Вплив розчинів диметилсульфоксиду і температури інкубації на функціональну активність окремих популяцій клітин наднирників щурів. Холод у біології і медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології: мат. 44-ї щорічн. конф. молодих учених Харків; 2020; 30(3): 287.

ДОДАТОК Б

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на наступних конференціях:

«Холод в биологии и медицине» 30-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків 24-25.05.2006 р.

Матеріали III Міжнародного симпозіуму «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». Тези. Росія, м. Москва, 25–26.04.2007 р.

«Холод в биологии и медицине» – 31-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків 16-17. 05. 2007 р.

International workshop of the physiological society «Molecular physiology of membrane transport and cell excitability». Усна доповідь. Ukraine, Yaremche 19-23. 09. 2007 р.

«Експериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики, Шості Данилевські читання». Тези. Україна, м. Харків 22-23. 02. 2007 р.

Всеросійська конференція з міжнародною участю «Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток». Тези. Росія, м. Самара; 18-20. 06. 2008 р.

I міжнародна наукова конференція «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології»; Усна доповідь. Україна, м. Донецьк; 23-26. 02. 2009 р.

«Холод в биологии и медицине»; 34-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків 27-28. 05. 2010 р.

Науково-практична конференція з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті. Проблемні питання». Тези. Україна, м. Харків жовт. 28-29. 10. 2010 р.

Науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Тези. Україна, м. Харків 3-4. 03. 2011 р.

«Холод в биологии и медицине.Актуальные проблемы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии»; 35-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків 27-28. 05. 2011 р.

IV щорічна науково-практична конференція з міжнародною участю «Новое в практической криомедицине». Тези. Росія, м. Москва, 9. 11. 2010 р.

IX український біохімічний з'їзд. Тези. Україна, м. Харків 24-27. 10. 2006 р.

Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендокринна патологія у віковому аспекті”. Тези. Україна, м. Харків 27-28. 10. 2011 р.

Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Modern methods, innovations and operational experience in the field of psychology and pedagogics». Тези. Польща, м. Люблін 27-28.12. 2017 р.

Науково-практична конференція «Медична наука та практика: виклики і сьогодення». Тези. Україна, м. Львів. 24-25. 08. 2018 р.

Наук.-практ. конф. з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології». Тези. Вісімнадцяті Данилевські читання; Україна, м. Харків 28. 02.-1. 03. 2019 р.

Холод у біології і медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології: 44-а щорічна конференція молодих учених. Усна доповідь. Україна, м. Харків 19-21. 05. 2020 р.