

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 ЗСК 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 – гідроксистероїддегідрогенази (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 відносного об'єму клітин.

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 $2,35 \pm 0,83 \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Нхс}$, при 22 °С – $2,71 \pm 0,31 \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Нхс}$, при 37 °С – $4,28 \pm 1,91 \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Нхс}$. Для КМР коефіцієнт фільтрації мембран складав $2,51 \pm 0,83 \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Нхс}$ – при 4 °С, $2,82 \pm 0,95 \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Нхс}$ – при 22 °С, $2,85 \pm 1,03 \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Нхс}$ – 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 стероїдпродукуючих клітин, здатних до секреції альдостерону при наступному культивуванні. Даний режим кріоконсервування, який дозволяє зберегти гетерогенність ЗСК надниркових залоз та її здібність до проліферації після відігріву, 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 3β - hydroxysteroid dehydrogenase (3β -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 $1.066 - 1.076 \text{ g/cm}^3$ 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 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ was approximately 4 minutes, and at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ was about 6 minutes, and at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ was higher than in the MC, and at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ this value increased strongly.

The filtration coefficient of AdCC membranes to water at a temperature of $4 \text{ }^\circ\text{C}$ was $2.35 \pm 0.83 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$, at $22 \text{ }^\circ\text{C}$ – $2.71 \pm 0.31 \times 10^{14} \text{ m}^3/\text{Hxs}$, 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

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. Scopus.
2. Дудецкая ГВ, Гурина ТМ, Бондаренко ТП. Изучение возможности криоконсервирование 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. Проблеми криобіології. 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, Алабедаькарим НМ, Бондаренко ТП. Регидратированные адренкортикоциты 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.

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

8. Устиченко ВД, Дудецкая ГВ, 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. Yurchuk TA, Dudetska GV, 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. Алабедалькарим НМ, Дудецкая ГВ, Бондаренко ТП. Гормонпродуцирующая активность клеток надпочечников новорожденных поросят, выделенных в градиенте плотности сахарозы. Экспериментальна та клінічна ендокринологія: від теорії до практики, Шості Данилевські читання; 2007 лют. 22-23; Харків; с. 40.

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

12. Божок ГА, Алабедалькарим 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 "Інноваційні технології в трансплантації органів, тканин і кліток"; 2008 черв. 18-20; Самара; с.148-150.

13. Дудецкая ГВ, Алабедалькарим 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. Ден Бо, Дудецкая ГВ, 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 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.199–201.

22. Дудецька ГВ, Бондаренко ТП. Вплив криоконсервування на збереження альдостеронпродукуючих клітин наднирників Науково-практична конференція «Медична наука та практика: виклики і сьогодення», 2018

серп. 24-25; Львів, с. 84–87.

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. Тези 44-ї щорічної конференції молодих учених «Холод у біології і медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології» 2020; 30(3): 287.