

## ••• КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ••• CELL BIOLOGY •••

УДК: 57.085.23

### **Морфологічні особливості первинних культур клітин наднирників неонатальних тварин різних видів О.Ю.Новікова, Г.А.Божок, Т.П.Бондаренко**

Надирник є залозою внутрішньої секреції, яка в процесі органогенезу формується з похідних екто- і мезодерми. Механізми, які змушують об'єднуватися різні за походженням типи клітин, шляхи міграції та клітинні взаємодії досі не з'ясовані повністю. Одним з інструментів для вивчення цих механізмів є первинна культура клітин, отримана з надирника. Метою нашої роботи було порівняння морфологічних особливостей первинних культур клітин модельних тварин, що належать до різних рядів, – свині, кролика і миші *in vitro* в різних умовах культивування (характер ростової поверхні, наявність ростових факторів), а також розробка методичних підходів для отримання і підтримання первинних культур клітин надирників неонатальних тварин. Культивування проводили в стандартних умовах температури і вологості навколишнього середовища, концентрації вуглекислого газу, на культуральних поверхнях з нормальною і зниженою адгезивністю в поживному середовищі ДМЕМ, збагаченому 10% фетальної телячої сироватки (ФТС) або ростовими добавками В-27 і FGF. Було встановлено, що культури клітин надирників неонатальних кроликів і поросят, які культивували в умовах з нормальною адгезією і використанням ФТС, мали гетерогенний склад, представляли собою моношар, що складається з клітин декількох морфологічних типів, і мультиклітинні сфероїди (МС). При культивуванні на поверхні зі зниженими адгезивними властивостями в культурах надирників поросят і кроликів клітинний моношар не утворювався, а відбувалося формування флотуючих МС. Після перенесення на 14-ту добу культивування МС обох видів тварин на адгезивну поверхню спостерігається виселення клітин, їх міграція з МС і формування моношару. Подібні етапи розвитку первинних культур клітин, отриманих від кроликів і поросят, дозволяє припустити наявність універсального клітинного складу в неонатальних надирників даних видів і застосовувати однакові підходи до первинних культур, отриманих з них. На відміну від інших вивчених видів, в культурах клітин мишачих неонатальних надирників не відбувається формування моношару і МС. Культури представляють собою поодинокі прикріплені і флотуючі клітини та невеликі клітинні агрегати.

**Ключові слова:** *первинна культура клітин надирників; неонатальні тварини; свиня; кролик; миша; моношар; мультиклітинні сфероїди.*

### **Morphological features of primary cultures of adrenal cells of neonatal animals of different species O.Yu.Novikova, G.A.Bozhok, T.P.Bondarenko**

The adrenal gland is an endocrine gland, which in the process of organogenesis is formed from ecto- and mesoderm derivatives. The mechanisms that make cell types of different origins unite, migration routes, and cell interactions are still not fully understood. One of the tools for studying these mechanisms is the primary cell culture obtained from the adrenal gland. The aim of our work was to compare the morphological features of primary cell cultures of model animals belonging to different orders – pigs, rabbits and mice *in vitro* under various cultivation conditions (growth surface pattern, presence of growth factors), as well as developing methodological approaches for obtaining and maintaining primary cultures of adrenal cell of neonatal animals. Cultivation was performed under standard conditions of temperature and humidity, carbon dioxide concentration, on culture surfaces with normal and reduced adhesiveness in a nutrient medium DMEM enriched with 10% fetal calf serum (FCS) or growth supplements B-27 and FGF. It was established that cell cultures of adrenal neonatal rabbits and piglets that were cultured under conditions of normal adhesion and using FCS had a heterogeneous composition, and were presented as a monolayer consisting of cells of several morphological types, and multicellular spheroids (MS). When cultivated on the surface with reduced adhesive properties in cultures of adrenal glands of piglets and rabbits, a cell monolayer was not formed, but flotation MCs were formed. After transferring MCs of both species to the adhesive culture surface on day 14, cell eviction, their migration from the MCs and formation of a monolayer are observed. Similar stages in the development of primary cell cultures derived from rabbits and piglets suggest the existence of a universal cellular composition in the neonatal adrenal glands of these species and allow applying the same approaches to the primary cultures derived from them. Unlike other studied species, monolayer and MS formation does not

occur in cell cultures of mouse neonatal adrenal glands. Cultures consist of single attached and floating cells and small cell aggregates.

**Key words:** *primary culture of adrenal cells; neonatal animals; pig; rabbit; mouse; monolayer; multicellular spheroids.*

### Морфологические особенности первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных разных видов О.Ю.Новикова, Г.А.Божок, Т.П.Бондаренко

Надпочечник представляет собой железу внутренней секреции, которая в процессе органогенеза формируется из производных экто- и мезодермы. Механизмы, заставляющие объединяться разные по происхождению типы клеток, пути миграции и клеточные взаимодействия до сих пор не выяснены полностью. Одним из инструментов для изучения этих механизмов является первичная культура клеток, полученная из надпочечника. Целью нашей работы было сравнение морфологических особенностей первичных культур клеток модельных животных, относящихся к разным отрядам, – свиньи, кролика и мыши *in vitro* в различных условиях культивирования (характер ростовой поверхности, наличие ростовых факторов), а также разработка методических подходов для получения и поддержания первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных. Культивирование проводили в стандартных условиях температуры и влажности окружающей среды, концентрации углекислого газа, на культуральных поверхностях с нормальной и сниженной адгезивностью в питательной среде ДМЕМ, обогащенной 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) либо ростовыми добавками В-27 и FGF. Было установлено, что культуры клеток надпочечников неонатальных кроликов и поросят, которые культивировали в условиях с нормальной адгезией и использованием ФТС, имели гетерогенный состав, представляли собой монослой, состоящий из клеток нескольких морфологических типов, и мультиклеточные сфероиды (МС). При культивировании на поверхности с пониженными адгезивными свойствами в культурах надпочечников поросят и кроликов клеточный монослой не образовывался, а происходило формирование флотирующих МС. После перенесения на 14-е сутки культивирования МС обоих видов животных на адгезивную поверхность наблюдается выселение клеток, их миграция из МС и формирование монослоя. Сходные этапы развития первичных культур клеток, полученных от кроликов и поросят, позволяют предположить наличие универсального клеточного состава в неонатальных надпочечниках данных видов и применять одинаковые подходы к первичным культурам, полученным из них. В отличие от остальных изученных видов, в культурах клеток мышинных неонатальных надпочечников не происходит формирования монослоя и МС. Культуры представляют собой одиночные прикрепленные и флотирующие клетки, и небольшие клеточные агрегаты.

**Ключевые слова:** *первичная культура клеток надпочечников; неонатальные животные; свинья; кролик; мышь; монослой; мультиклеточные сфероиды.*

#### Введение

Надпочечник представляет собой железу внутренней секреции, гормоны которой поддерживают гомеостаз организма, постоянно и оперативно реагируя на изменяющиеся условия внешней и внутренней среды. Анатомически и функционально надпочечник разделен на 2 слоя – мозговой и корковый. В коре синтезируются кортикостероиды, входящие в состав гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, тогда как в мозговом веществе синтезируются катехоламины. У млекопитающих надпочечник представляет собой единый орган, формирующийся из двух различных типов зародышевой ткани – корковое вещество является производным мезодермы, а мозговое вещество имеет общее с периферической нервной системой происхождение и развивается из симпато-адреналовых производных нервного гребня (Theveneau, Mayor, 2012; Bhatt et al., 2013).

Проблема формирования столь сложного органа, как надпочечник, не является решенной, поскольку механизмы, заставляющие объединяться разные по происхождению типы клеток, пути миграции и клеточные взаимодействия до сих пор не выяснены полностью. В то же время любые нарушения сложной системы межклеточных взаимодействий служат причиной развития множества патологий – от психозов до синдромов, затрагивающих многие жизненно важные функции (аддисонова болезнь, синдром Кушинга, адрено-генитальный синдром и др.). Кроме того, предполагается, что некоторые производные симпато-адреналовой линии ответственны за

возникновение нейробластом, поскольку в большинстве случаев локализация опухоли находится в мозговом веществе надпочечников.

В связи с этим необходимы адекватные модели для изучения факторов, влияющих на формирование нормальной клеточной архитектуры как базиса функциональной активности. Одной из таких моделей является культура клеток. В последнее время обнаружена значительная пластичность медуллярных клеток надпочечников, в частности их способность к трансформации в нейрональном направлении и способность к формированию мультиклеточных сфероидов (Плаксина и др., 2015, 2016; Сидоренко и др., 2011; Saxena et al., 2013). Способность формировать сфероиды свойственна многим типам прогениторных клеток, в том числе нейрональным. Мультиклеточные образования могут содержать в своем составе разные типы клеток и межклеточного матрикса, и представляют собой по сути 3D-модели, имитирующие условия формирования ткани *in vivo*. Ввиду перечисленных особенностей первичные культуры стали широко использовать для изучения процессов нейрогенеза *in vitro*, а также для трансплантации животным с модельными патологиями нервной системы (Santana et al., 2012).

Целью нашей работы было сравнение морфологических особенностей первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных, относящихся к разным отрядам (свинья, кролик, мышь) при использовании различных условий культивирования (характер ростовой поверхности, наличие ростовых факторов).

### Материалы и методы

Культивирование в разных условиях является способом селекции клеток с необходимыми свойствами, в том числе и стволовых/прогениторных клеток. Нами была предпринята попытка оценки влияния на качественный морфологический состав клеточной культуры различного характера подложек – с нормальной и слабой адгезией.

Выделение культур клеток из надпочечников всех неонатальных животных производилось ферментативным методом. Надпочечные железы извлекали, помещали в стерильный раствор PBS, содержащий антибиотик-антимикотик (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В, США, Sigma). Затем производилось механическое измельчение желез, после чего они подвергались ферментативной обработке раствором коллагеназы 1-го типа (Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл и дезоксирибонуклеазы (Sigma, США) в концентрации 0,1 мг/мл. Производили 3 последовательные ферментативные обработки, по 10 минут каждая, после каждого этапа собирали суспензию клеток, остатки ферментов нейтрализовали с помощью охлажденного раствора фетальной сыворотки в PBS. Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания трипановым синим, концентрацию клеток – путем подсчета в камере Горяева количества неповрежденных клеток.

Были исследованы культуры клеток, выделенные из надпочечных желез мышей, кроликов и свиней 1–3 суточного возраста. Эксперименты проведены с соблюдением правил биоэтики в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и одобрены комитетом по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Было изучено влияние условий культивирования на рост и морфологию полученных культур клеток. На первом этапе производилось культивирование на адгезивной и слабоадгезивной ростовых поверхностях. В качестве адгезивного субстрата были использованы специализированные чашки Петри для клеточных культур (SPL, Германия), в качестве неадгезивного – пластиковые чашки Петри (SPL, Германия), не предназначенные для культивирования клеток. В качестве среды для культивирования – среды следующего состава: 1) DMEM (Biowest, Франция), содержащие в качестве ростового фактора стандартную фетальную телячью сыворотку (Sigma, США); 2) DMEM (Biowest, Франция), содержащие добавку B-27 (Sigma, США) и 10 нг/мл FGF (Sigma, США) – предположительно, данная среда не содержит факторов адгезии и поддерживает рост суспензионных культур.

Культивирование производилось при +37°C при 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе. Для моделирования условий низкой адгезии при использовании некультуральной подложки производилось поддержание в бессывороточной среде.

Пассирование производили путем дезагрегации монослоя с помощью диспергирующего раствора трипсина (0,05%) в растворе EDTA (ПанЭко, РФ).

Мікроскопірування нативної культури вироблялось з допомогою світлового мікроскопа Leica-2000, при збільшенні  $\times 100$  і  $\times 200$ .

Визначення співвідношення живих і мертвих клітин в культурі вироблялось з допомогою окрашування досліджуваної суспензії 0,4% розчином трипанового синього.

### Результати і обговорення

На перших етапах росту культури кліток, отримані з надпочечників поросят і кроликів, мали схожі особливості. При культивуванні на адгезивній поверхні к субстрату прикріплялись фібробластоподібні клітки, формуючі монослой к 5–7 суткам (рис. 1а, б). На монослой фібробластоподібних кліток зустрічався другий тип кліток – мелкі веретеновидні клітки, існуючі отростки на полюсах і розташовані ланцюжками. Даний тип кліток має менші адгезивні властивості, оскільки першим відшаровується при пересеві. При цьому фібробластоподібні клітки виконують роль фідерного шару для них, за межами монослоя веретеновидні клітки не зустрічаються. В клітках розрізняється мелке ядро, цитоплазма однорідна. По зовнішньому виду і характеру росту, ці клітки були віднесені к нейробластоподібним. Раніше була показана можливість виділення в культуру кліток на різних підложках і середовищах, з нормальним і пониженим вмістом сироватки – на культурах кліток надпочечників поросят (Плаксина і др., 2016).

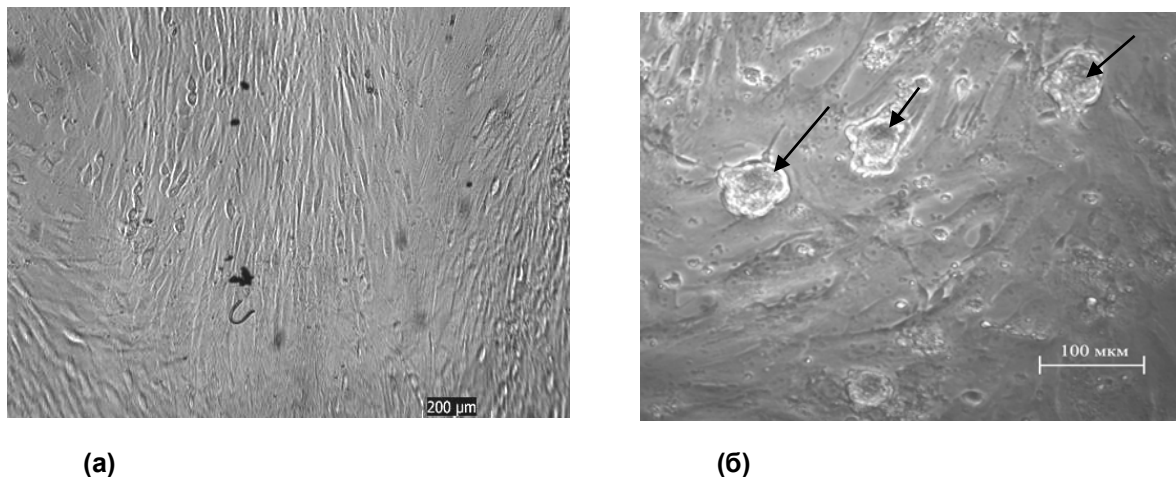


Рис. 1. Монослой первичной культуры клеток надпочечника неонатального кролика (а) и поросенка (б) на 7 сутки роста (стрелкой указаны МС)

В культуре клеток кроликов и поросят к этому сроку обнаруживались прикрепленные мультিকлеточные сфероиды (МС), имеющие плотную структуру, которые продолжали увеличиваться в размерах в процессе культивирования (рис. 1). На культуре клеток надпочечников свиней неонатального возраста (от 0 до 30 суток) показано прогрессирующее снижение способности к образованию МС в культуре, их прикреплению и формированию монослоя в зависимости от возраста животного (Сидоренко и др., 2011; Плаксина и др., 2015), что подтверждается также в нашей работе.

При культивировании на поверхности с пониженными адгезивными свойствами в культурах надпочечников поросят и кроликов клеточный монослой не образовывался, а происходило формирование флотирующих МС, которые постепенно увеличивались в размерах. К 7–9 суткам размеры МС в культурах достигали 100–150 мкм (рис. 2), а в течение последующих 14 суток наблюдения продолжали увеличиваться до 200–250 мкм. МС формируются во всех вариантах исследованных условий – на адгезивной и неадгезивной поверхности, как в присутствии 10% ФТС, так и на бессывороточной среде, содержащей факторы роста (1% В27, 10 нг/мл FGF). В процессе культивирования размеры сфероидов увеличиваются за счет деления клеток.

Для того чтобы выяснить, сохраняется ли способность к адгезии у флотирующих МС, их спустя 14 суток культивирования переносили в условия с адгезивной поверхностью. При этом в

культуре, полученной из надпочечников кролика, из МС мигрировали (выселялись) клетки фибробластоподобной и полигональной формы (рис. 3, а, б). При дальнейшем культивировании сфероиды распластывались на субстрате, и рост монослоя продолжался, до конца срока наблюдения (21 сутки) сфероиды окончательно деградировали. Таким образом, показано влияние характера ростовой поверхности на поведение клеток и сохранение адгезивных свойств у клеток, культивируемых в составе сфер, по крайней мере, в течение первых 7 суток роста.

При переносе флотирующих сфероидов культуры НП порослят из неадгезивных в адгезивные условия происходило их прикрепление к субстрату и выселение клеток, имеющих нейробластоподобную морфологию, расположенных цепочками.

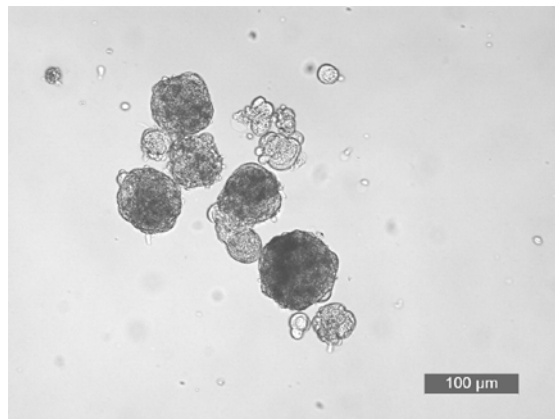
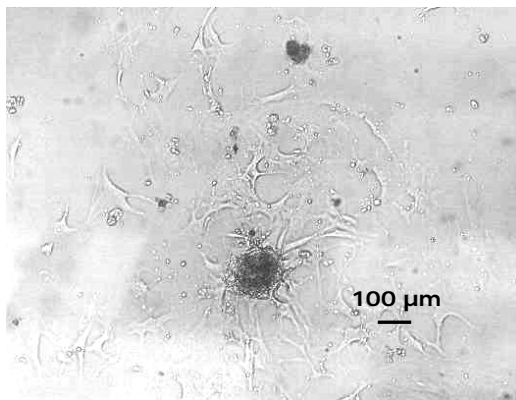
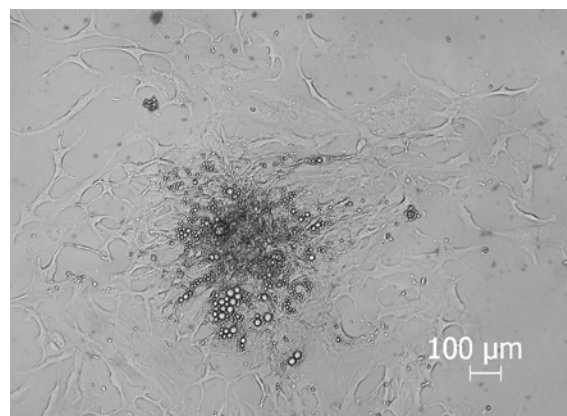


Рис. 2. Мультиклеточные сфероиды в первичной культуре клеток, полученной из надпочечника неонатального кролика (14 сутки роста)



(а)



(б)

Рис. 3. МС из надпочечников неонатального кролика, полученный в условиях слабой адгезии и перенесенный на адгезивную поверхность на 7-е сутки. (а) – расселение клеток фибробластоподобной и полигональной формы из прикрепившегося МС; (б) – монослой клеток, сформировавшийся из прикрепленной цитосферы

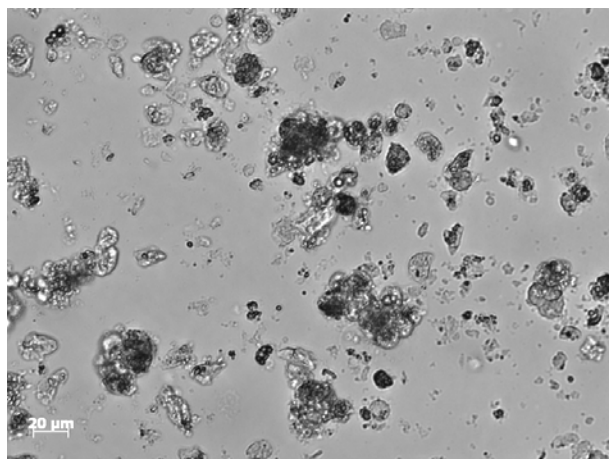
При культивировании на слабоадгезивной поверхности в среде, содержащей ростовые добавки, аналогично культуре с 10% ФТС, большая часть клеток формировала флотирующие МС.

Полученные данные позволяют предположить, что данный тип роста – в виде МС является примером способности формировать сферические колонии разных типов стволовых и прогениторных клеток, которые присутствуют и в надпочечнике на ранних сроках неонатального развития. Показано их присутствие в надпочечниках человека, быка, свиньи (Chung et al., 2009; Santana et al., 2012; Плаксина и др., 2015). Из исследований на разных видах животных известно,

что подобные сфероиды могут формироваться в культурах клеток надпочечников ранними предшественниками хромаффинных клеток, имеющих происхождение из нервного гребня, общее с нейронами и глиальными клетками. В настоящей работе мы показали возможность получения МС из надпочечных желез кролика и сходство этапов развития с таковыми в культуре клеток надпочечников поросят.

Процесс формирования сфероида на клеточном уровне описан в литературе. Отсутствие адгезивной поверхности на этапе помещения клеток в искусственные условия является стимулом к запуску взаимодействия клетка-клетка, затем происходит выделение межклеточного матрикса, используемого для опоры делящимися клетками, формирование градиента веществ, что обеспечивается избирательной экспрессией генов и обуславливает развитие по одному из альтернативных путей (Duval et al., 2017). Ростовая поверхность является селективным фактором для избирательного роста фибробластоподобных клеток либо флолирующих сфероидов, что может свидетельствовать в пользу сохранения некомитированного состояния клеток в 3D-условиях, в которых они пребывают в составе цитосфер (Vukicevic et al., 2015). Можно предположить один из механизмов, объясняющих зависимость морфологии и свойств клеток от наличия ФТС в ростовой среде, согласующийся с общими представлениями «модели по умолчанию» индукции нервных клеток. В ФТС выявлен ингибирующий нейрогенез белок BMP (Kodaïra et al., 2006), а также, возможно, другие, неисследованные пока, ингибирующие факторы. Отсутствие такого ингибирующего влияния при использовании среды, содержащей B27 и FGF, способствует индукции развития по нейрогенному пути.

Культивирование производных нервного гребня, выделенных из надпочечников мышей, было подробно описано в работе (Saxena et al., 2013). Показана возможность получения культур, содержащих флолирующие цитосферы в неадгезивных бессывороточных условиях. Причем формируются сфероиды и сохраняют способность к увеличению в размерах только в культурах 2-3-дневных мышей. В нашей работе в культуре клеток мышей, по описанным выше протоколам, при культивировании на адгезивной поверхности в присутствии как 10% ФТС, так и бессывороточных ростовых добавок, не наблюдалось формирования клеточного монослоя (рис. 5). Культура содержала округлые прикрепленные и флолирующие клетки, а также их агрегаты с небольшим количеством клеток в составе и рыхлой структурой. При окрашивании трипановым синим показано, что клетки не повреждены. Вероятно, клетки в данных культурах имеют иные механизмы роста, чем у других исследованных видов и требуют применения других ростовых факторов для получения монослоя. В культуре можно выделить два основных морфологических типа: прозрачные одиночные клетки и более темные, чаще встречающиеся в составе агрегатов. Сфероиды, имеющие плотную структуру, также не образовывались.



**Рис. 4. Первичная культура клеток, полученная из надпочечников неонатальных мышей, на 7 сутки**

По всей видимости, клетки, имеющие происхождение из нервного гребня, заканчивают миграцию из надпочечных желез мышей раньше в онтогенезе, чем у других исследуемых

животных. Также это может быть обусловлено особенностями гуморальной регуляции в онтогенезе. В частности, показано существование стресс-гипореспонсивного периода в раннем постнатальном развитии грызунов, во время которого отсутствует синтез кортикостероидов и снижается чувствительность к АКТГ (Vazquel et al., 1998), возможно, в данный момент происходят перестройки, меняющие характер взаимодействия клеток друг с другом и окружающим матриксом.

#### **Выводы:**

1. Характер ростовой поверхности и состав ростовой среды влияют на морфологию и динамику роста клеток надпочечников неонатальных кроликов и поросят: в адгезивных условиях формируется конгломератный монослой, содержащий несколько типов клеток и прикрепленные сфероиды, в неадгезивных формируются флотирующие сфероиды.

2. Этапы развития первичных культур клеток, полученных из надпочечников неонатальных кроликов и поросят, характер формирования и роста МС позволяют предположить универсальный клеточный состав для данных групп животных и применять одинаковые подходы к их культивированию.

3. В культурах клеток мышей не происходит формирования монослоя и МС – структур, типичных для культур надпочечных желез других исследованных видов. Независимо от условий культивирования, из клеток мышей формируются флотирующие мультিকлеточные агрегаты.

#### **Список литературы / References**

- Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Божок Г.А. Морфологические и фенотипические особенности цитосфер, формирующихся в культуре клеток надпочечников неонатальных поросят, в обычных и низкоадгезивных условиях // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т.25, №2. – С. 190–196. /Plaksina Ye.M., Sidorenko O.S., Bozhok G.A. Morphological and phenotypic characteristics of cytospheres forming in adrenal gland cell culture of neonatal piglets under normal and low adhesion conditions // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2015. – Vol.25, no. 2. – P. 190–196./
- Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Легач Е.И., Божок Г.А. Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т.26, №2. – С. 188–195. /Plaksina E.M., Sidorenko O.S., Legach E.I., Bozhok G.A. Obtaining a culture of neuroblast-like cells from adrenal glands of newborn piglets by the method of selective adhesion // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2016. – Vol.26, no. 2. – P. 188–195./
- Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И. Экспрессия  $\beta$ -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т.21, №2. – С. 218–223. /Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I.  $\beta$ -III tubulin expression in adrenal gland cell culture of newborn piglets // Problems of Cryobiology. – 2011. – Vol.21, no. 2. – P. 218–223./
- Bhatt S., Diaz R., Trainor P.A. Signals and switches in mammalian neural crest cell differentiation // Cold Spring Harb Perspect Biology. – 2013. – No. 5 – P. 519–523.
- Chung K.F., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla // Stem Cells. – 2009. – Vol.27, no. 10. – P. 2602–2613.
- Duval K., Grover H., Han L.H. et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture // Physiology (Bethesda). – 2017. – Vol.32 (4). – P. 266–277.
- Kodaira K., Imada M., Goto M. et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2006. – Vol.345 (3). – P. 1224–1231.
- Santana M., Chung K., Vukicevic V. et al. Isolation, characterization and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – Vol.1 (11). – P. 783–791.
- Saxena S., Wahl J., Huber-Lang M.S. et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands // PLoS ONE. – 2013. – Vol.8 (5). – e64454.
- Theveneau E., Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration // Developmental Biology. – 2012. – No. 12. – P. 34–54.
- Vazquel M.-D., Bouchet P., Mallet J.-L. et al. 3D Reconstruction of the mouse's mesonephros // Anat. Histol. Embryol. – 1998. – No. 27. – P. 283–287.
- Vukicevic V., Rubin de Celis M.F., Pellegata N.S. et al. Adrenomedullary progenitor cells: isolation and characterization of a multi-potent progenitor cell population // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2015. – Vol.408. – P.178–184.

**Представлено: О.А.Нікольченко / Presented by: O.A.Nikolchenko**

**Рецензент: Ю.Г.Кот / Reviewer: Yu.G.Kot**

*Подано до редакції / Received: 20.02.2019*

**Про авторів:** О.Ю.Новікова – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, ksuhanev7@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0563-6174>

Г.А.Божок – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

Т.П.Бондаренко – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, tpbondarenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5258-3741>

**About the authors:** O.Yu.Novikova – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, ksuhanev7@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0563-6174>

G.A.Bozhok – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

T.P.Bondarenko – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NASU, Pereyaslavskaya Str., 23, Kharkiv, Ukraine, 61016, tpbondarenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5258-3741>

**Об авторах:** О.Ю.Новікова – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, ksuhanev7@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0563-6174>

Г.А.Божок – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, bozhokgaru@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

Т.П.Бондаренко – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, tpbondarenko@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5258-3741>