

НЕКОТОРЫЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПОРОСЯТ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

bozhokgaru@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Свойства криоконсервированных первичных культур клеток эндокринных желез неонатальных животных *in vitro* и *in vivo* при трансплантации», № государственной регистрации 0116U003494.

Вступление. Культуры клеток спинальных ганглиев (СГ) широко используются для оценки чувствительности нейронов к фармакологическим или токсическим воздействиям ряда веществ. Кроме того, они являются ценным модельным объектом для изучения молекулярных механизмов нейрогенеза, нейротрансмиссии, нейрорегенерации, возникновения периферической нейропатии [1-3] и источником нейральных стволовых клеток [4-6] для регенеративной медицины.

В настоящее время широко применяются культуры клеток, полученные из СГ куриного эмбриона [7,8], лабораторных грызунов [9-12], собаки [13,14], быка [15], обезьяны [16]. В то же время, культуры клеток из СГ свиней практически не изучены, несмотря на заявленную перспективность данного вида животных для биомедицинских целей [17].

Ранее нами были разработаны условия получения культуры клеток СГ неонатальных поросят [18]. В настоящей работе нами охарактеризована экспрессия некоторых фенотипических маркеров в ней.

Цель исследования – с помощью иммуноцитохимического метода изучить экспрессию β -III-тубулина, глутаминсинтетазы, белка S100 и хромогранина А в культуре клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят.

Объект и методы исследования. Эксперименты на животных проводились в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (2013 г.) и согласованными с положениями IV Европейской Конвенции (ETS N 123, Страсбург, Франция, 1986).

Суспензию клеток СГ получали от суточных поросят по методу de Luca и соавт. [9]. Полученные клетки в концентрации 5×10^5 кл/мл помещали на пластиковые чашки Петри с поверхностью, обработанной поли-D-лизинном («Orange Scientific», Бельгия), и культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ на питательной

среде α -MEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, «BioSera», Франция), гентамицина (100 мкг/мл) и амфотерицина В (2,5 мкг/мл). После достижения конфлюэнтного монослоя клетки первичной культуры открепляли от подложки 0,25% раствором трипсина-ЭДТА с солями Хенкса (НПП «ПанЭко», Россия), отмывали от ферментативной смеси путем центрифугирования, разводили до вышеуказанной концентрации и пересевали в те же условия. Процедуру пересева повторяли еще один раз.

Сформировавшийся на 7 сутки 2-го пассажа клеточный монослой подвергали иммуноцитохимической проводке и мечению антителами к маркеру нейронов β -III-тубулину, маркерам нейроглии глутаминсинтетазе (ГС) и белку S100, а также маркеру нейроэндокринных клеток хромогранину А (ХрА). Для этого монослой фиксировали в течение 15 минут в 4%-м параформальдегиде («Sigma»), а затем пермеабелизовали в течение 10 минут в 0,3% растворе Triton X-100 («Sigma»). Для блокировки неспецифического связывания антител использовали фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% Triton X-100, 1% бычьего сывороточного альбумина («Биолот», Россия) и 0,3 М глицина («Reanal», Венгрия). Инкубацию с первыми антителами проводили в течение ночи при 4°C, со вторыми – 30 минут в темноте при комнатной температуре. Характеристики используемых в работе антител представлены в **таблице**.

Микрофотосъемку осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z1 («Carl Zeiss», Германия), анализ и обработку изображений – с помощью программ LSM Examiner («Carl Zeiss») и AxioVision Rel. 4.8 («Carl Zeiss»).

Таблица – Характеристики антител для иммуноцитохимического исследования

№ п/п	Антитело	Мишень	Разведение	Фирма, страна-производитель
1	Mouse Anti-Neuron specific beta-III-Tubulin	Нейрон, нейробласт	1:600	Abcam, Великобритания
2	Rabbit Anti-Glutamine Synthetase	Мантыйный глиоцит	1:600	Abcam, Великобритания
3	Mouse Anti-S100	Шванновская клетка	1:250	Abcam, Великобритания
4	Rabbit Anti-Chromogranin A	Адренергический нейрон, адреномедуллярная клетка	1:300	Abcam, Великобритания
5	Goat Secondary Antibody to Mouse, Hi Lyte Fluor 488-конъюгированные	IgG	1:500	Abcam, Великобритания
6	Goat Secondary Antibody to Rabbit, Alexa Fluor 488-конъюгированные	IgG	1:750	Abcam, Великобритания

Результаты исследований и их обсуждение. Если при получении первичной культуры не используются специальные приемы, позволяющие обогатить исходную суспензию клетками определенного фенотипа (центрифугирование в градиенте плотности, иммуномагнитная селекция и т.д.), то она содержит несколько клеточных субпопуляций. Исходя из того, что анатомически в состав СГ входят чувствительные нейроны, мантийные глиоциты (МГ), Шванновские клетки, клетки эндотелия капилляров и фибробласты, в полученной нами культуре могли пребывать все вышеназванные типы.

Известно, что выбранные условия культивирования (питательная среда, ростовые добавки, поверхность культивирования, количество пассажей) являются селективным фактором, способным значительно изменять цитоморфологический и фенотипический состав культуры по сравнению с исходным. При этом возможна экспансия тех клеточных субпопуляций, которым созданы подходящие условия, и угасание остальных. Например, культивирование чувствительных нейронов проводят в средах, содержащих глюкозу и ростовые факторы, секретируемые нейроглией [19,20]. Для размножения Шванновских клеток используют поверхность, обработанную ламинином, и питательную среду с добавлением форсколина, инсулина и ростовых факторов FGF, NGF, IGF [21,22]. Эндотелиальные клетки в культуре хорошо развиваются на желатинированной подложке в питательной среде с FGF, EGF в присутствии инсулина, гепарина и трансферрина [23]. Использование питательной среды с достаточным содержанием фетальной телячьей сыворотки (10-30%) позволяет получить из СГ первичную культуру клеток, обогащенную МГ [24,25]. Также нужно отметить, что среды с высоким содержанием ФТС способствуют пролиферации фибробластов. Учитывая вышесказанное, актуальным являлось охарактеризовать фенотипический состав культуры, полученной из СГ неонатальных поросят в условиях культивирования на поли-D-лизиновой подложке в присутствии 10% ФТС.

Имуноцитохимическое мечение с антителами показало фенотипическую гетерогенность культуры.

Клетки, экспрессирующие β -III-тубулин, различались морфологически. Одни из них представляли собой мелкие клетки с длинными ветвящимися отростками, формирующими сеть, поэтому были идентифицированы как нейроны (рис. 1,

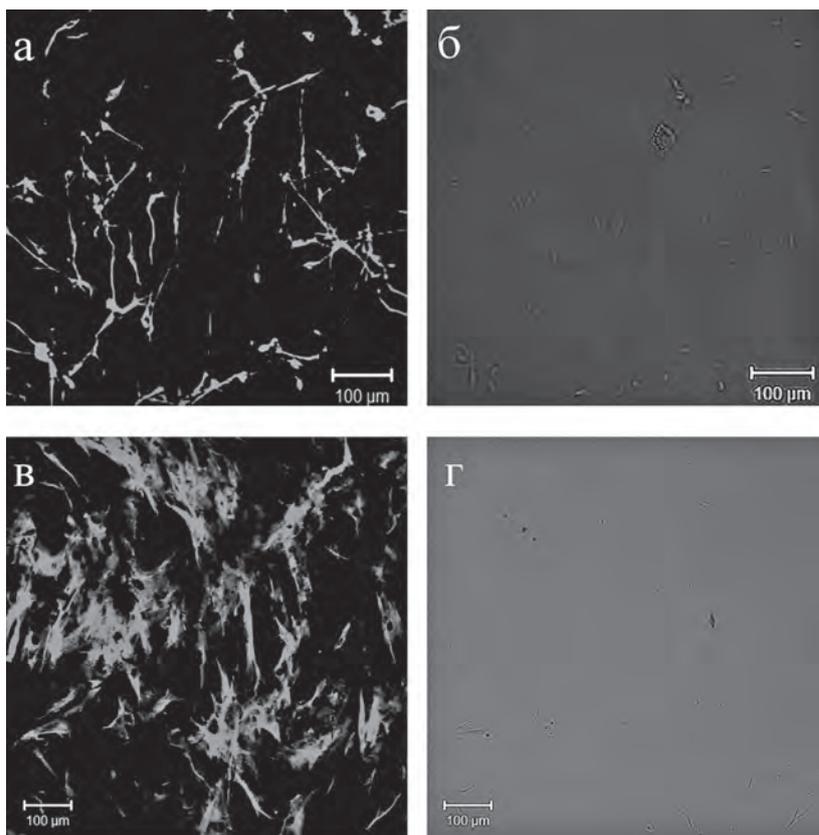


Рисунок 1 – Имуноцитохимическое мечение антителами к β -III-тубулину культуры клеток СГ неонатальных поросят. А – мелкие клетки с длинными отростками (режим флуоресценции), Б – то же, что и А в режиме проходящего света, В – крупные полигональные клетки (режим флуоресценции), Г – то же, что и В в режиме проходящего света.

а, б). Другие являлись крупными, расплыватыми клетками полигональной формы с небольшими отростками (рис. 1, в, г). Поскольку морфологически данные клетки не принадлежат к нейронам, они могут относиться к другим клеткам-производным нервного гребня, которые, как было недавно показано, тоже могут экспрессировать β -III-тубулин [26-28]. Для идентификации этой субпопуляции требуются дальнейшие исследования с привлечением дополнительных фенотипических маркеров.

Мелкие веретеновидные и крупные полигональные клетки экспрессировали ГС, что характеризовало их как МГ (рис. 2). Они представляли собой основную клеточную массу полученной

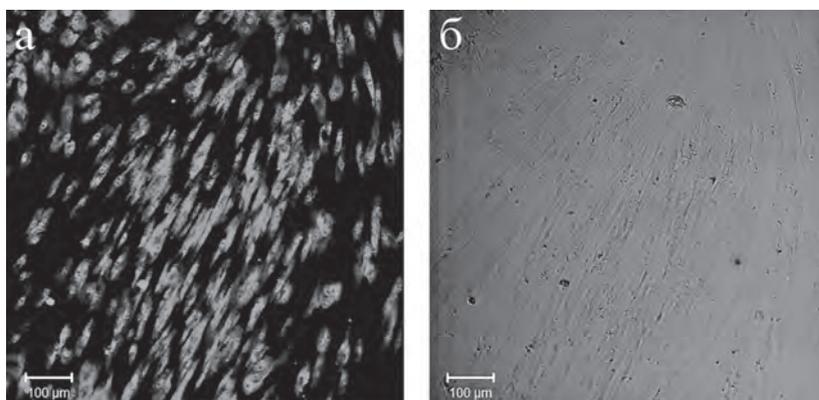


Рисунок 2 – Имуноцитохимическое мечение антителами к ГС культуры клеток СГ неонатальных поросят. А – фото в режиме флуоресценции, Б – фото в режиме проходящего света.

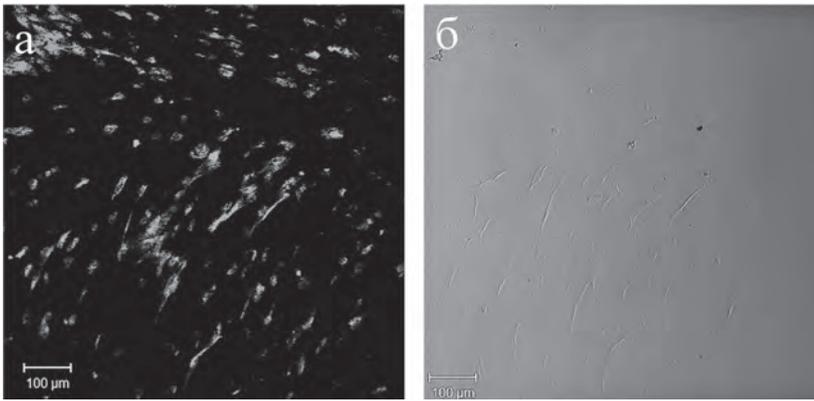


Рисунок 3 – Иммуноцитохимическое мечение антителами к ХрА культуры клеток СГ неонатальных поросят. А – фото в режиме флуоресценции, Б – фото в режиме проходящего света.

культуры. S100-позитивных клеток в культуре не наблюдалось. Это свидетельствовало о том, что в выбранных нами условиях культивирования рост Шванновских клеток не поддерживается.

Интересно, что в культуре наблюдалось некоторое количество ХрА-позитивных клеток. Морфологически они представляли собой клетки различных размеров и форм, среди которых преобладали отростчатые клетки (рис. 3).

Известно, что ХрА экспрессируется в some большинства тормозных, возбуждающих и адренергических нейронов головного и спинного мозга [29]. В работе Хие Z. и соавт. было показано появление нейронов адренергического фенотипа в культуре клеток, полученной из СГ [30]. Это объясняется

присутствием в ганглиях клеток-производных нервного гребня, способных дифференцироваться в симпато-адреналовом направлении [31].

Выводы. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что культура клеток СГ неонатальных поросят, полученная при использовании поли-D-лизиновой подложки и питательной среды с 10% ФТС, является гетерогенной по фенотипическому составу. Основными клеточными субпопуляциями в ней являются нейроны и МГ. Это позволяет рекомендовать полученную культуру в

качестве модельного объекта, содержащего комбинацию нейронов и глиальных клеток, физиологически близкую к той, которая наблюдается в организме.

Перспективы дальнейших исследований. В современных исследованиях особое внимание уделяется МГ как клеткам, участвующим в процессах развития нейронов, поддержания их функции, регенерации поврежденных чувствительных нервов. Кроме того, они играют ведущую роль в возникновении нейропатической боли и являются возможной мишенью для ее терапевтического облегчения. Учитывая это, изучение МГ является перспективным, а полученная нами культура клеток позволяет проведение исследований в данном направлении.

Литература

1. Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc.* 2007;2(1):152-60. DOI: 10.1038/nprot.2006.461
2. Wong AW, KP Yeung J, Payne SC, Keast JR, Osborne PB. Neurite outgrowth in normal and injured primary sensory neurons reveals different regulation by nerve growth factor (NGF) and artemin. *Mol Cell Neurosci.* 2015;65:125-34. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.03.004 PMID: 25752731
3. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG, Fornaro M. Generation of new neurons in dorsal root ganglia in adult rats after peripheral nerve crush injury. *Neural Plast.* 2015. 860546. DOI: 10.1155/2015/860546
4. Ciaroni S, Cecchini T, Cuppini R, Ferri P, Ambrogini P, Bruno C, et al. Are there proliferating neuronal precursors in adult rat dorsal root ganglia? *Neurosci Lett.* 2000;281(1):69-71.
5. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells.* 2007;25(8):2053-65.
6. Singh RP, Cheng YH, Nelson P, Zhou FC. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells. *Cell Transplant.* 2009;18(1):55-68.
7. Meller K. The Reaggregation of Neurons and Their Satellite Cells in Cultures of Trypsin-Dissociated Spinal Ganglia. *Cell Tiss. Res.* 1974;152:175-83.
8. Mudge AW. Effect of non-neuronal cells on peptide content of cultured sensory neurones. *J Exp Biol.* 1981;95:195-203.
9. de Luca AC, Faroni A, Reid AJ. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration. *J Vis Exp.* 2015;96: e52543. [Cited 28.07.2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354675/>
10. Huang T, Cherkas P, Rosenthal D. Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;1036(1-2):42-9.
11. Backström E, Chambers BJ, Kristensson K, Ljunggren HG. Direct NK cell-mediated lysis of syngenic dorsal root ganglia neurons in vitro. *J Immunol.* 2000;165(9):4895-900.
12. Svenningsen A, Colman DR, Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors. *Fex Neuron Glia Biol.* 2004;1(1):85-93.
13. Gerhauser I, Hahn K, Baumgärtner W, Wewetzer K. Culturing adult canine sensory neurons to optimise neural repair. *Vet Rec.* 2012;170(4):102.
14. Morgan BR, Coates JR, Johnson GC. Characterization of thoracic motor and sensory neurons and spinal nerve roots in canine degenerative myelopathy, a potential disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 2014;92(4):531-41. DOI: 10.1002/jnr.23332
15. Fadda A, Bärtschi M, Hemphill A, Widmer HR, Zurbriggen A, Perona P, et al. Primary postnatal dorsal root ganglion culture from conventionally slaughtered calves. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168228. DOI: 10.1371/journal.pone.0168228
16. Tongtako W, Lehmecker A, Wang Y, Hahn K, Baumgärtner W, Gerhauser I. Canine dorsal root ganglia satellite glial cells represent an exceptional cell population with astrocytic and oligodendrocytic properties. *Sci Rep.* 2017;7(1):13915.
17. Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabrià J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: a proteomics perspective. *Proteomics Clin. Appl.* 2014;8(9):715-31.
18. Ali SG, Sidorenko OS, Bozhok GA. Vliyaniye sostava pitatel'noy sredy na morfologicheskiye kharakteristiki kul'tury kletok spinal'nykh gangliyev neonatal'nykh porosyat. *Visnyk Kharkivs'koho natsional'noho universytetu imeni V.N. Karazina. Seriya «Biologiya».* 2018;30:49-59. DOI: 10.26565/2075-5457-2018-30-6 [in Russian].
19. Delree P, Leprince P, Schoenen J, Moonen G. Purification and culture of adult rat dorsal root ganglianeurons. *J Neurosci Res.* 1989;23(2):198-206.

20. Liu R, Lin G, Xu H. An efficient method for dorsal root ganglia neurons purification with a one-time anti-mitotic reagent treatment. PLoS One. 2013;8(4):e060558. DOI: 10.1371/journal.pone.0060558
21. Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. J Cell Biol. 2003;163(4):889-99.
22. Haastert K, Mauritz C, Chaturvedi S, Grothe C. Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective non-viral transfection protocol. Nat Protoc. 2007;2(1):99-104.
23. Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. Journal of Immunological Methods. 2001;254(1-2):183-90. DOI: 10.1016/S0022-1759(01)00408-2
24. Belzer V, Shraer N, Hanani M. Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia. Neuron Glia Biol. 2010;6(4):237-43. DOI: 10.1017/S1740925X1100007X
25. Capuano A, De Corato A, Lisi L, Tringali G, Navarra P, Dello Russo C. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. Molecular Pain. 2009;5:43.
26. Locher H, de Rooij KE, de Groot JC, van Doorn R, Gruis NA, Löwik CW, et al. Class III β -tubulin, a novel biomarker in the human melanocyte lineage. Differentiation. 2013;85(4-5):173-81. DOI: 10.1016/j.diff.2013.05.003
27. Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, Marková V, Smejkalová B, Bertrand L, et al. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. J Neuropathol Exp Neurol. 2008;67(4):341-54. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31816a686d
28. Locher H, Saadah N, de Groot S, de Groot JC, Frijns JH, Huisman MA. Hair follicle bulge cultures yield class III- β -tubulin-positive melanoglia cells. Histochem Cell Biol. 2015;144(1):87-91. DOI: 10.1007/s00418-015-1312-8
29. Schafer MK, Mahata SK, Stroth N, Eiden LE, Weihe E. Cellular distribution of chromogranin A in excitatory, inhibitory, aminergic and peptidergic neurons of the rodent central nervous system. Regul Pept. 2010;165(1):36-44. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.11.021
30. Xue ZG, Smith J, Le Douarin NM. Expression of the adrenergic phenotype by dorsal root ganglion cells of the quail in culture in vitro. C R Acad Sci III. 1985;300(13):483-8.
31. Furlan A, Dyachuk V, Kastrić ME, Calvo-Enrique L, Abdo H, Hadjab S, et al. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. Science. 2017;357(6346). DOI: 10.1126/science.aal375

ДЕЯКІ ФЕНОТИПОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРИ КЛІТИН СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІВ НЕОНАТАЛЬНИХ ПОРОСЯТ

Алі С. Г., Коваленко І. Ф., Божок Г. А.

Резюме. Культури клітин спінальних гангліїв (СГ) є сучасною науковою платформою для дослідження механізмів нейрогенезу, нейротрансмісії, нейрорегенерації, а також цінним джерелом нейральних стовбурових клітин для регенеративної медицини. Раніше нами були підібрані умови отримання культури клітин з СГ неонатальних поросят. Метою представленої роботи було вивчення в ній експресії фенотипових маркерів β -III-тубуліну, глутамінсинтетази, білку S100 та хромограніну А.

Суспензію клітин отримували зі СГ добових поросят ферментативним методом. Отримані клітини висівали на чашки Петрі з поверхнею, обробленої полі-D-лізином, та культивували на живильному середовищі α -MEM з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (ФТС). Фенотипову характеристику моно шару, який утворився в процесі культивування, проводили за допомогою імуноцитохімічного методу.

Встановлено, що отримана в даних умовах культура клітин є гетерогенною за фенотиповим складом. В якості основних клітинних субпопуляцій в ній представлені нейрони, які експресують β -III-тубулін, і мантийні гліоцити, які експресують глутамінсинтетазу. Це дозволяє рекомендувати культуру клітин СГ неонатальних поросят в якості цінного модельного об'єкта, що містить комбінацію нейронів і гліальних клітин, фізіологічно близьку до тієї, яка спостерігається в організмі.

Ключові слова: спінальні ганглії, культура клітин, нейрони, мантийні гліоцити, β -III-тубулін, глутамінсинтетаза, хромогранін А.

НЕКОТОРЫЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ НЕОНАТАЛЬНЫХ ПОРОСЯТ

Али С. Г., Коваленко И. Ф., Божок Г. А.

Резюме. Культуры клеток спинальных ганглиев (СГ) являются современной научной платформой для исследования механизмов нейрогенеза, нейротрансмиссии, нейрорегенерации, а также ценным источником нейральных стволовых клеток для регенеративной медицины. Ранее нами были подобраны условия получения культуры клеток из СГ неонатальных поросят. Целью представленной работы являлось изучение в ней экспрессии фенотипических маркеров β -III-тубулина, глутаминсинтетазы, белка S100 и хромогранина А.

Суспензию клеток получали из СГ суточных поросят ферментативным методом. Полученные клетки высевали на чашки Петри с поверхностью, обработанной поли-D-лизином, и культивировали на питательной среде α -MEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС). Фенотипическую характеристику образованного в процессе культивирования монослоя проводили с помощью иммуноцитохимического метода.

Установлено, что полученная в данных условиях культура клеток является гетерогенной по фенотипическому составу. В качестве основных клеточных субпопуляций в ней представлены нейроны, экспрессирующие β -III-тубулин, и мантийные глиоциты, экспрессирующие глутаминсинтетазу. Это позволяет рекомендовать культуру клеток СГ неонатальных поросят в качестве ценного модельного объекта, содержащего комбинацию нейронов и глиальных клеток, физиологически близкую к той, которая наблюдается в организме.

Ключевые слова: спинальные ганглии, культура клеток, нейроны, мантийные глиоциты, β -III-тубулин, глутаминсинтетаза, хромогранин А.

SOME PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF THE DORSAL ROOT GALGLIA CELL CULTURE OF NEONATAL PIGLETS

Ali S. G., Kovalenko I. F., Bozhok G. A.

Abstract. Cell culture of dorsal root ganglia (DRG) is a modern scientific platform for studying the mechanisms of neurogenesis, neurotransmission, neuroregeneration, as well as a valuable source of neural stem cells for regenerative medicine.

Goal. To study the expression of β -III-tubulin, glutamine synthetase, S100 protein and chromogranin A in the dorsal root ganglia cell culture of neonatal piglets by immunocytochemical method.

Methods. Cell suspension was obtained enzymatically from DRG of new-born piglets. Cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cell/ml on plastic Petri dishes with a surface covered by poly-D-lysine, and cultured in a nutrient medium α -MEM with the addition of 10% fetal calf serum (FCS). After reaching the confluent monolayer, the cells of the primary culture were detached from the surface with a trypsin-EDTA mixture, washed by centrifugation, diluted to the above concentration and subcultured in the same conditions. The cell monolayer formed on day 7 of second passage was subjected to immunocytochemical labeling with antibody against neuronal marker β -III-tubulin, neuroglia markers glutamine synthetase (GS) and S100 protein, as well as neuroendocrine cell marker chromogranin A (ChrA).

Results. The immunocytochemical labeling showed a phenotypic heterogeneity of the culture. Cells expressing β -III-tubulin differed morphologically. Some of them were small with long branching processes that form a network, so they were identified as neurons. Others were large elongated polygonal cells with small processes. Small spindle-shaped and large polygonal cells expressed GS, which characterized them as satellite glial cells (SGC). They represented the main cell mass of the obtained culture. S100-positive cells were not observed in the culture. A certain number of ChrA-positive cells were present in the culture. Morphologically, they were cells of various sizes and shapes, among which cells with processes prevailed.

Conclusions. The results of the study allow us to conclude that neonatal piglets' DRG derived cell culture obtained in conditions of poly-D-lysine growth surface and 10% FCS supplemented nutrient medium is heterogeneous in phenotypic composition. The main cellular subpopulations in it are neurons and SGC. This allows us to recommend the obtained culture as a valuable model containing a combination of neurons and glial cells, physiologically close to observed in the body.

Key words: dorsal root ganglia, cell culture, neurons, satellite glial cells, β -III-tubulin, glutamine synthetase, chromogranin A.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 07.08.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-3-152-50-54

УДК 577.352:57.053:577.15:576.3:57.086.13

Землянских Н. Г., Бабийчук Л. А., Мигунова Р. К.

АСИММЕТРИЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ С ГЛИЦЕРОЛОМ И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

nzemliansky@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Публикация подготовлена в рамках темы «Изучение механизмов модификации структурных параметров и метаболического состояния ядродержащих клеток кордовой и эритроцитов донорской крови под влиянием различных криозащитных растворов и низких температур» (№ государственной регистрации 0109U00278).

Вступление. Глицерол, проникающий через плазматическую мембрану, обеспечивает защиту эритроцитов человека при замораживании. Стабильность криоконсервированных клеток в физиологических условиях позволяет использовать их в практической трансфузиологии [1]. Однако технология криоконсервирования на основе глицерола включает многоэтапный процесс его отмывки из размороженных клеток, что требует значительных материальных затрат. Поэтому разработка безотмывочных методов на основе непроникающих криопротекторных агентов (КПА) остается актуальной проблемой криобиологических исследований. К числу таких КПА относится полиэтиленгликоль с м.м. 1500 (ПЭГ), который позволяет сохранить до 98% эритроцитов после размораживания. Однако в физиологических усло-

виях клетки демонстрируют нестабильность, т.е. лизируют с течением времени [2]. Понимание причин данной проблемы может послужить основой для коррекции стабильности клеток, консервированных в присутствии ПЭГ и способствовать созданию безотмывочной технологии криоконсервирования крови.

Ранее было показано, что ПЭГ вызывает снижение активности Ca^{2+} -АТФазы [3] и способствует входу Ca^{2+} в эритроциты [4]. Однако последствия таких изменений для стабильности мембран и клеток, в целом, во многом не понятны. В частности, неизвестно, как это влияет на асимметричное трансмембранное распределение фосфолипидов. Маркером нарушения липидной асимметрии является экстернализация фосфатидилсерина (ФС) на поверхности клетки, поскольку в норме он локализован только во внутреннем слое мембраны [5]. Важность оценки данного параметра обусловлена тем, что асимметричное распределение ФС в мембране контролирует активность и структурное состояние периферических и интегральных белков, и, следовательно, влияет на свойства мембраны в целом. Кроме того, экстернализация ФС является признаком эрипроза [6], вследствие чего макрофаги элиминируют такие