

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

клетки в русле крови реципиента. Анализ нарушений липидной асимметрии основан на связывании ФС, экстернализованного на наружной поверхности, со специфическим белком аннексином V, конъюгированным с флуоресцентным красителем FITC.

Цель исследования заключалась в оценке нарушений трансмембранного распределения фосфатидилсерина под влиянием замораживания-отогрева эритроцитов человека в присутствии глицерола и ПЭГ, а также после удаления криопротекторных агентов из размороженных образцов и переноса в физиологические условия *in vitro*.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служили эритроциты крови доноров, заготовленной в Центре службы крови г. Харькова. Эритроциты трижды отмывали от плазмы и лейкоцитарных компонентов крови с помощью центрифугирования при 1200 g в течение 10 мин при комнатной температуре в растворе А (150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl (pH 7.4)). Отмытые эритроциты, инкубированные в среде Рингера (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 32 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM глюкоза, 0.5% БСА), служили контролем.

К аликватам отмытых эритроцитов (2 мл) добавляли равные объемы 30 %-ных растворов глицерола (при 20°C) и ПЭГ (при 5 °C) Растворы КПА дополнительно содержали 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 32 mM HEPES (pH 7.4). Равновесные концентрации КПА в клеточных суспензиях составляли ~20%. Эритроциты замораживали погружением в жидкий азот (-196 °C). Отогрев проводили в водяной бане при 42 °C. После размораживания отдельные аликваты эритроцитов отмывали от КПА. Для образцов, содержащих глицерол, отмывка выполнена в 3 этапа методом центрифугирования (1200 g, 5-7 мин) с использованием 600 mM NaCl (первая отмывка) и 150 mM NaCl (вторая и третья отмывки). Для эритроцитов, криоконсервированных с ПЭГ, отмывка выполнена 1-этапным центрифугированием (800 g, 5-7 мин) с применением раствора А. Размороженные клетки разводили в равновесных сред КПА (20%), содержащих 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 32 mM HEPES (pH 7.4), а клетки, отмытые от КПА – в растворе Рингера до концентрации 10⁷ клеток/мл и инкубировали в течение 1 и 24 ч. Для изменений концентрацию клеток снижали до 10⁶ клеток/мл в соответствующих растворах, содержащих все вышеуказанные компоненты и 2.5 mM CaCl₂, и добавляли 5 мкл аннексина V-FITC. Клетки инкубировали в темноте в течение 20 мин и определяли связывание клетками аннексина V-FITC методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Calibur ("Becton Dickenson", США). В каждом измерении просчитывали 100000 клеток. Данные анализировали с помощью программы "CellQuestPro".

Гемолиз определяли спектрофотометрически (СФ-4А, Россия) с проточной кюветой при λ = 543 нм по количеству вышедшего из клеток гемоглобина. Количество гемо-

глобина выражали в процентах, принимая за 100% гемолиз эритроцитов в присутствии 0.1% детергента Тритона X-100.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием "Statgraphics plus 2.1 for Win". Выборки имели нормальное распределение по тесту Колмагорова-Смирнова. Эксперименты проведены на крови 6 доноров (n = 6). Данные представлены в виде M ± SD (среднее значение ± стандартное отклонение). Различия между экспериментальными группами оценивали с помощью теста Колмагорова-Смирнова.

Результаты исследований и их обсуждение. Замораживание эритроцитов под защитой глицерола и ПЭГ приводило к появлению клеток, связывающих аннексин (рис. 1 б, в), которые на гистограммах распределения представлены зоной маркера M2. Это указывает на экстернализацию ФС на поверхности отдельных клеток. В образцах, содержащих ПЭГ, количество клеток с нарушенной асимметрией ФС больше, чем в образцах, содержащих глицерол (табл. 1). Таким образом, в присутствии обоих КПА под влиянием цикла замораживания-отогрева в некоторых клетках происходит перераспределение мембранных липидов. Однако данные нарушения не ведут к лизису клеток при условии сохранения КПА в среде, что подтверждается низким уровнем гемолиза в присутствии ПЭГ (табл. 2). Следовательно, нарушение липидной асимметрии при криоконсервировании характеризует процессы, которые не связаны с немедленным разрушением клеток, а скорее определяют проблемы их структурно-функциональной полноценности при переносе в физиологические условия вследствие изменений микроокружения периферических и интегральных белков мембраны эритроцитов.

В связи с этим важно оценить изменения в мембранах при переносе криоконсервированных клеток в физиологические условия *in vitro*. Отмывка глицерола из суспензии криоконсервированных эритроцитов необходима для их возвращения в организм [1]. Удаление ПЭГ не является обязательной процедурой, поскольку он не проникает через мембрану, и в случае трансфузии его концентрация могла бы уменьшаться путем постепенного разведения в русле крови. Тем не менее, для оценки изменений исследуемого параметра в физиологических условиях ПЭГ также был удален, и отмытые клетки перенесены в раствор Рингера.

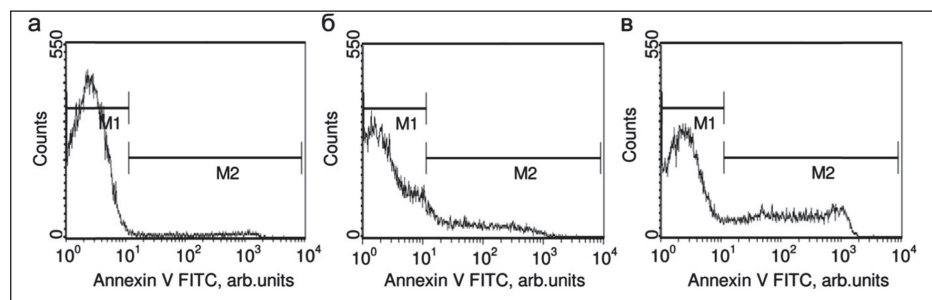


Рисунок 1 – Гистограммы распределения аннексин V-FITC-меченных эритроцитов после размораживания и инкубации в присутствии КПА в течение 1 ч при 37 °C. Нативные эритроциты в среде Рингера (а), криоконсервированные эритроциты в присутствии глицерола (б) и ПЭГ (в). Представлены типичные данные эксперимента.

Таблица 1 – Количество эритроцитов с нарушенной асимметрией ФС в мембране при криоконсервировании под защитой глицерола и ПЭГ

Количество клеток, связывающих аннексин V – FITC, %			
Условия эксперимента	Раствор	Время	
		1 час	24 часа
Контроль	Среда Рингера	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.5
Этап замораживания	глицерол	14.3 ± 2.4*	–
	ПЭГ	27.2 ± 5.2*	–
Отмывка глицерола	Среда Рингера	1.8 ± 0.5*	2.6 ± 1.3
Отмывка ПЭГ	Среда Рингера	15.2 ± 4.1*	38.9 ± 6.4**

Примечание: статистические отличия данных от контроля в соответствующие периоды времени (* p<0.05, ** p<0.001).

Таблица 2 – Гемолитические повреждения эритроцитов при криоконсервировании в присутствии глицерола и ПЭГ

Уровень гемолиза, %			
Этап замораживания-отогрева		Этап отмывки КПА	
глицерол	ПЭГ	глицерол	ПЭГ
6.3 ± 1.8*	2.0 ± 0.5*	17.2 ± 3.5**	24.0 ± 3.9**

Примечание: статистические значимые отличия между соответствующими группами (* p<0.001, ** p<0.01).

В физиологических условиях *in vitro* эритроциты, замороженные под защитой глицерола, после удаления КПА не отличалось от контроля по числу клеток, связывающих аннексин на протяжении 1 ч (табл. 1). В то время как клетки, замороженные под защитой ПЭГ, продемонстрировали значительные нарушения асимметричного распределения ФС в аналогичных условиях (табл. 1). Длительная инкубация (24 ч) эритроцитов, отмытых от КПА, более убедительно демонстрирует различия 2 групп криоконсервированных эритроцитов. Замороженные под защитой глицерола клетки оставались стабильными, а количество клеток, связывающих аннексин, статистически не отличалось от контроля (табл. 1). В аналогичных условиях в образцах, замороженных в присутствии ПЭГ, отмечалось нарастание гемолиза и увеличение числа клеток, связывающих аннексин (табл. 1).

Известно, что экстернализация ФС контролируется переносчиками липидов – скрэмблазами и флипазами [5]. При этом скрэмблазы разрушает асимметричное распределение фосфолипидов, способствуя появлению ФС на поверхности мембраны, а флипазы восстанавливают нарушенную асимметрию, перенося ФС из наружного липидного слоя во внутренний. Активация скрэмблаз и ингибирование флипаз происходят параллельно и вызываются повышением уровня внутриклеточного Ca²⁺ [5]. Учитывая, что ПЭГ вызывает снижение активности Ca²⁺-АТФазы [3] и способствует входу Ca²⁺ в эритроциты [4], наблюдаемые нарушения асимметрии ФС в мембране эритроцитов могут быть следствием критического увеличения концентрации Ca²⁺ в клетке. Стабильность клеток, криоконсервированных в присутствии глицерола, и сохранение липидной асимметрии могут быть обусловлены незначительным, в сравнении с ПЭГ, влиянием данного КПА на регуляцию уровня внутриклеточного Ca²⁺ [7,8].

Важно отметить, что нарушение липидной асимметрии затрагивает отдельные клетки. Такая реак-

ция может быть обусловлена возрастной гетерогенностью эритроцитов и неоднородностью изменений физических параметров среды при замораживании-оттаивании. Старые эритроциты, характеризующиеся низкой активностью Ca²⁺-АТФазы и повышенным уровнем Ca²⁺ [9,10], в сравнении с юными и зрелыми клетками, более чувствительны к стрессам и могут первыми демонстрировать признаки нарушения липидной асимметрии. Кроме того, разная удаленность клеток от стенок контейнера предполагает неоднородность изменений среды в пределах замораживаемого образца. В результате некоторые клетки могут быть подвергнуты в большем мере неблагоприятным воздействиям, что также определяет их опережающую реакцию по отношению к другим клеткам на стресс и нарушение асимметрии ФС.

Перераспределение ФС связано с изменением эластических свойств мембраны эритроцитов благодаря нарушениям взаимодействий цитоскелетных белков с ФС [11,12]. Это способствует снижению устойчивости клеток. Очевидно, поэтому в условиях активного метаболизма при 37°C в среде Рингера клетки, криоконсервированные в присутствии ПЭГ, проявляют нестабильность и подвергаются гемолизу, в отличие от эритроцитов, криоконсервированных под защитой глицерола.

Выводы

1. Использование глицерола при криоконсервировании эритроцитов сопровождается появлением популяции клеток с экстернализованным ФС. Данные клетки являются поврежденными и разрушаются в процессе отмывки КПА из размороженных клеточных суспензий.

2. Размороженные эритроциты, отмытые от глицерола, при переносе в физиологические условия *in vitro* способны поддерживать асимметричное распределение ФС в мембране и остаются стабильными.

3. В эритроцитах, криоконсервированных под защитой ПЭГ, несмотря на низкий уровень гемолиза после размораживания, нарушения асимметричного распределения ФС в мембране проявляются в большей степени, чем при использовании глицерола.

4. Популяция эритроцитов с экстернализованным ФС обнаруживается после отмывки ПЭГ из криоконсервированных образцов и их количественно увеличивается при продолжительной инкубации в физиологических условиях *in vitro*. Нестабильность клеток, замороженных с ПЭГ, в физиологических условиях *in vitro* может быть обусловлена нарушениями асимметрии ФС и белок-липидных взаимодействий в мембране.

Перспективы дальнейших исследований. Блокирование нарушений липидной асимметрии мембран эритроцитов может быть использовано для улучшения результатов криоконсервирования эритроцитов с применением консервантов, основанных на непроникающих КПА. В настоящее время известны ингибиторы, тормозящие и даже блокирующие развитие экстернализации ФС [6]. К их числу относятся антиоксиданты, катехоламины, нитропруссид натрия (донор NO) и ряд других фармацевтических веществ. Однако правильный выбор блокирующих агентов нарушений липидной асимметрии при криоконсервировании в присутствии непроникающих

КПА должен быть основан на детальном понимании механизма нарушения данного параметра, который может включать дополнительные регуляторные звенья. Тем не менее, учитывая ведущую роль Ca^{2+} в качестве триггера нарушений асимметрии ФС, включение в состав криопротекторных сред фармацевти-

ческих блокаторов Ca^{2+} , может быть первым шагом для изучения возможности биохимической коррекции негативных процессов, связанных с экстернализацией ФС, в эритроцитах в присутствии непроникающих КПА.

Литература

1. Scott KL, Lecak J, Acker P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev.* 2005 Apr;19(2):127-42.
2. Babychuk LA, Zemlyanskikh NG. Optimizatsiya i preimushchestva bezotmyvochnogo metoda kriokonservirovaniya eritrotsitov s PEO-1500. *Probl. kriobiol.* 2001;1:35-41. [in Russian].
3. Zemlianskikh NG, Babychuk LA. The changes in erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity induced by PEG-1500 and low temperatures. *Cell and Tissue Biology.* 2017;11(2):4-10.
4. Kucherenko YV, Bernhardt I. The study of Ca^{2+} influx in human erythrocytes in isotonic polyethylene (glycol) 1500 (PEG-1500) and sucrose media. *Ukr. Biokhim Zh.* 2006;78(6):46-52.
5. Arashiki N, Takakuwa Y. Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions. *Curr Opin Hematol.* 2017 May;24(3):167-72.
6. Lang E, Lang F. Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int.* 2015;2015:513518. 16 p.
7. Zemlyanskikh NG, Kofanova OA. Modulation of human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activity by glycerol: the role of calmodulin. *Biochemistry (Mosc).* 2006 Aug;71(8):900-5.
8. Kofanova OA, Zemlyanskikh NG, Ivanova L, Bernhardt I. Changes in the intracellular Ca^{2+} content in human red blood cells in the presence of glycerol. *Bioelectrochemistry.* 2008 Aug;73(2):151-4.
9. Romero PJ, Romero EA. Differences in Ca^{2+} pumping activity between sub-populations of human red cells. *Cell Calcium.* 1997 May;21(5):353-8.
10. Aiken NR, Satterlee JD, Galey WR. Measurement of intracellular Ca^{2+} in young and old human erythrocytes using ^{19}F -NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Aug 12;1136(2):155-60.
11. An X, Guo X, Wu Y, Mohandas N. Phosphatidylserine binding sites in red cell spectrin. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 May-Jun;32(3):430-2.
12. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Feb 19;99(4):1943-8.

АСИМЕТРИЧНИЙ РОЗПОДІЛ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА У МЕМБРАНІ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ З ГЛІЦЕРОЛОМ І ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЕМ

Землянських Н. Г., Бабійчук Л. А., Мигунова Р. К.

Резюме. Порушення асиметрії фосфатидилсерина (ФС) в мембрані під впливом криоконсервування еритроцитів людини з гліцеролом і ПЕГ досліджені за допомогою аннексина V-FITC методом проточної цитометрії. Заморожування з гліцеролом веде до появи популяції клітин з екстерналізованим ФС, яка руйнується при відмиванні криопротектору з розморожених зразків. Перенесення в фізіологічні умови *in vitro* еритроцитів, відмитих від гліцеролу, характеризується збереженням асиметрії ФС в мембрані і стабільністю клітин. Використання ПЕГ веде до більших, в порівнянні з гліцеролом, порушень розподілу ФС в розморожених еритроцитах, незважаючи на низький рівень гемолізу. Інкубація еритроцитів, відмитих від ПЕГ, в фізіологічних умовах *in vitro* супроводжується збільшенням числа клітин з екстерналізованим ФС і підвищенням гемолізу. Порушення в мембранах еритроцитів при заморожуванні з ПЕГ, вочевидь, викликані підвищенням концентрації Ca^{2+} в клітині. Включення блокаторів Ca^{2+} до складу криоконсерванту на основі ПЕГ може сприяти збереженню асиметрії ФС в мембрані еритроцитів і підвищенню їх стабільності.

Ключові слова: еритроцит, мембрана, ліпідна асиметрія, криоконсервування, гліцерол, ПЕГ.

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

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

Резюме. Нарушения асимметрии фосфатидилсерина (ФС) в мембране под влиянием криоконсервирования эритроцитов человека с глицеролом и ПЭГ исследованы с помощью аннексина V-FITC методом проточной цитометрии. Замораживание с глицеролом ведет к появлению популяции клеток с экстернализованным ФС, которая разрушается при отмывке криопротектора из размороженных образцов. Перенос в физиологические условия *in vitro* эритроцитов, отмытых от глицерола, характеризуется сохранением асимметрии ФС в мембране и стабильностью клеток. Использование ПЭГ ведет к большему, в сравнении с глицеролом, нарушению распределения ФС в размороженных эритроцитах, несмотря на низкий уровень гемоллиза. Инкубация эритроцитов, отмытых от ПЭГ, в физиологических условиях *in vitro* сопровождается увеличением числа клеток с экстернализованным ФС и повышением гемоллиза. Нарушения в мембранах эритроцитов при замораживании с ПЭГ, по-видимому, вызваны повышением концентрации Ca^{2+} в клетке. Включение блокаторов Ca^{2+} в состав криоконсерванта на основе ПЭГ может способствовать сохранению асимметрии ФС в мембране эритроцитов и повышению их стабильности.

Ключевые слова: эритроцит, мембрана, липидная асимметрия, криоконсервирование, глицерол, ПЭГ.

ASYMMETRIC DISTRIBUTION OF PHOSPHATIDYL SERINE IN ERYTHROCYTE MEMBRANE AT CRYOPRESERVATION WITH GLYCEROL AND POLYETHYLENE GLYCOL

Zemlianskikh N. G., Babychuk L. A., Migunova R. K.

Abstract. This study was aimed to the examination of disturbances of the transmembrane distribution of phosphatidylserine (PS) in human erythrocytes under freeze-thawing effect in the presence of glycerol and polyethylene

glycol (PEG), as well as after removing of cryoprotective agents out of freeze-thawed samples and transferring them to the physiological conditions *in vitro*. The PS externalization on the outer surface was assessed using annexin V-FITC by the flow cytometry. Freezing with glycerol that penetrates through the plasma membrane led to the appearance of cell population with externalized PS, which was destroyed during the cryoprotectant removal out of the thawed samples. Transfer of the glycerol-free erythrocytes to the physiological conditions *in vitro* was characterized by the preserved PS asymmetric distribution in the membrane and the cell stability. Freezing of erythrocytes in the PEG presence, which does not penetrate through the plasma membrane, caused more pronounced disturbances of PS asymmetry in erythrocytes in a comparison with glycerol, despite a low level of hemolysis after freeze-thawing. PEG removal is not a mandatory procedure, since it does not penetrate through the membrane, and in the case of transfusion, its concentration could be reduced by gradual dilution in bloodstream. However, to determine the ability of erythrocytes cryopreserved with PEG to control the PS asymmetry distribution in membranes under the physiological conditions, the cryoprotectant was removed and the washed cells were transferred into Ringer's solution. The incubation of PEG-free erythrocytes under the physiological conditions *in vitro* was characterized by an increase in the amount of erythrocytes with the externalized PS and a rise of hemolysis with the course of time that indicated the instability of structural and functional parameters of the erythrocytes. Disturbances in cell membranes during freezing with PEG can result from an increase in Ca^{2+} concentration inside the cells, since previously a reduction in Ca^{2+} -ATPase activity and an increase in Ca^{2+} influx at the presence of this compound have been shown, unlike glycerol, whose effect on the intracellular Ca^{2+} regulation was not as substantial as in the PEG presence. Increasing in Ca^{2+} concentration inside the cells stimulates the scramblase activity and the flipase inhibition that leads to the PS externalization in erythrocyte membranes. The instability of the cells frozen with PEG under the physiological conditions *in vitro* may be related to impaired protein-lipid interactions in the membrane-cytoskeleton complex due to the disturbances in the PS asymmetry distribution. Prevention of the lipid asymmetry distortion in erythrocyte membranes can be used to improve the outcomes of erythrocyte cryopreservation with the use of cryoprotective medium based on non-penetrating substances. Given the most likely mechanism of the development of disorders in membrane structure the inclusion of Ca^{2+} blockers in the PEG-based cryoprotective medium can help to preserve the PS asymmetry in erythrocyte membrane and increase the cell stability.

Key words: erythrocyte, membrane, lipid asymmetry, cryopreservation, glycerol, PEG.

*Рецензент – проф. Міщенко І. В.
Стаття надійшла 25.07.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-3-152-54-57

УДК 611.481.085

Новикова О. Ю., Бондаренко Т. П.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАТИВНОЙ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ВИБРИСС НОВОРОЖДЕННЫХ КРОЛИКОВ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

ksuhanew7@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Работа выполнялась в рамках ведомственной темы отдела криоэндокринологии Института проблем криобиологии и криомедицины (ИПКМК) НАН Украины «Структурно-функциональні властивості та проліферативний потенціал ендокринних тканин при культивуванні, криоконсервуванні та трансплантації» (шифр 2.2.6.64, № государственной регистрации – 0111U001196).

Вступление. Волосяной фолликул представляет собой сложное динамично меняющееся образование, сформированное клетками разных зародышевых слоев. Особый интерес представляет пул клеток дермальной папиллы (ДП), являющихся производными нервного гребня, обеспечивающих рост волоса в течение жизни. Вибриссы являются наиболее ранним типом волос, которые закладываются в онтогенезе, они имеют ряд особенностей, вызывающих особый интерес – связь с механорецепторами и чувствительными нейронами, постоянный репаративный рост в течение жизни. ДП обеспечивает формирование всех типов клеток, в составе ВФ – обладает широким дифференцировочным потенциалом. В ряде исследований [1,2] обнаружено, что при помещении в условия *in vitro* клетки ДП сохраняют свой

дифференцировочный потенциал, и в определенных условиях формируют трехмерные структуры – мультиклеточные сфероиды (МС), обеспечивая, таким образом микроокружение, приближенное к естественной среде. Изучение свойств мультиклеточных сфероидов (МС) позволит лучше понять гуморальные и пространственные взаимодействия, которые инициируют специализацию клеток. Кроме того, плюрипотентные клетки из ДП могут представлять источник клеток, пригодных для заместительной терапии, поскольку их получение является относительно малоинвазивным, а пролиферативный потенциал высок, что дает возможность в короткий срок накапливать значительное количество биоматериала. Поскольку криоконсервирование является единственным способом долгосрочного хранения биоматериала, необходимо понимание того, насколько воздействие факторов криоконсервирования влияют на ростовые характеристики данного типа клеток.

Целью работы было исследование влияния криоконсервирования на морфофункциональные свойства и ростовой потенциал культуры клеток ДП вибрисс кроликов в нативной и криоконсервированной культурах и при различных способах культивирования.