

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.

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). Получение культуры клеток проводили по методу [2] в нашей модификации. Для этого выделяли волосяные фолликулы из вибрисс новорожденных кроликов обоих полов. При помощи бинокулярного микроскопа ДП изолировали и помещали в 6-луночные планшеты (РАА, Австрия), покрытые желатином (Генезис, Украина). Для культивирования использовали питательную среду DMEM/F12 (BioWest, Франция) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, BioWest, Франция) и 1% раствора антибиотик-антимикотик (BioWest, Франция). ДП удаляли из культуры спустя 3 суток, и продолжали культивировать выселившиеся клетки. При достижении конфлюентного монослоя клетки открепляли от поверхности смесью 0,25% раствора трипсина (BioWest, Франция) и Версена (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1 и пересевали на чашки Петри для культур клеток (SPL, Германия). Посевная концентрация составляла $4 \cdot 10^4$ клеток/см³. Замену половины среды осуществляли каждые 3 суток. Пересев культуры производили 1 раз в 5-6 дней.

Для определения активности пролиферации (АП) производилось вычисление отношения концентрации клеток в день учета к начальной (посевой) концентрации. Для этого производилась обработка культуры диспергирующим раствором (0,05% трипсина в Версене (ПанЭко)) с последующим подсчетом числа клеток в камере Горяева. Поскольку МС разрушаются довольно сложно традиционным способом, производилась обработка 0,1 раствором трипсина в Версене, пипетирование и помещение клеток на адгезивный субстрат для прикрепления. Спустя 2-3 часа культивирования, производилась повторная ферментативная и механическая дезагрегация клеточных конгломератов, после чего клетки полученной суспензии подсчитывались в камере Горяева. В каждом варианте исследования подсчитывалось по 3 лунки 12-луночного планшета.

Для изучения влияния ростовых факторов, производилось культивирование параллельно на двух типах сред на основе DMEM/F12 – содержащей ФТС и бессывороточной – содержащей факторы роста. Спустя 7 суток, после формирования культур, производилась замена среды на противоположную, это дало возможность проследить зависимость характера роста культуры – формирования МС или монослоя, в зависимости от типа ростовой среды.

Криоконсервирование клеточной суспензии после субкультивирования производили в криозащитной среде, содержащей 90% DMEM и 10% ДМСО в режиме 1 град/мин до -80°C и погружением в жидкий азот.

Микрофотосъемку осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Leika 2000 (Leika, Германия) с видеокамерой. Морфометрический анализ проводили по микрофотографиям с использованием программы TourView 3.7 (Китай) и AxioVision Rel. 4.8 («CarlZeiss», Германия).

Статистический анализ данных производился с помощью ПО Excel. Статистическую значимость оценивали, рассчитывая параметрический критерий Стьюдента. Отличия считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Установлено, что после помещения эксплантов ДП кролика в условия *in vitro* происходит выселение мелких фибробластоподобных клеток, формирующих субконфлюентный монослой. При этом прослеживается общее свойство прогениторных клеток к колониальному росту – ограничение роста после достижения определенных размеров колонией, рост зачастую тормозится и прекращается после 10-12 суток после посева. Пассирование с низкой плотностью посева (4-5 тыс/см³), позволяет проследить дальнейший рост колониями, которые сливаются с соседними на субстрате спустя несколько суток. Показана возможность бессывороточного культивирования клеток ДП. В условиях отсутствия ФТС, при использовании бессывороточных ростовых добавок – В27 или Нейромакс, происходит формирование 3D-культур флолирующих МС. Обнаружено, что формирование МС происходит за счет миграции и объединения клеток. Рост обеспечивается делением клеток внутри колоний. Формирование сфероидов происходит как при помещении суспензии клеток в бессывороточную среду, так и при замене среды в конфлюентном монослое на бессывороточную. Во втором случае происходит миграция клеток по субстрату с формированием колоний, затем – округление клеток и открепление сфероидов от субстрата. Таким образом, характер роста культуры полностью зависит от морфогенетических факторов, присутствующих в эмбриональной сыворотке, эта особенность может быть связана с онтогенетическим происхождением клеток ДП. Существует мнение, что ФТС содержит факторы, аналогичные таковым в базальной мембране эпителия, которые вызывают поляризацию клеток, приводя к росту в виде монослоя [3]. Удаление этих факторов ведет к формированию конденсатов, аналогичным ДП в условиях организма. Средний размер МС, измеренный на 20 сутки после посева, составлял $370,00 \pm 35,56$, наблюдения свидетельствуют, что после этого срока МС больше не увеличивались в размерах и начинали деградировать. Для исследования влияния криоконсервирования на рост МС производили криоконсервирование в криозащитной среде на основе DMEM с добавлением 10% ДМСО. Средний размер МС, полученных из суспензии криоконсервированной культуры, на 20 сутки после посева, составлял $256,50 \pm 33,00$ ($p=0,05$). Таким образом, наблюдается значимое уменьшение размеров МС, формирующихся из криоконсервированной культуры. Аналогичные данные, свидетельствующие об уменьшении диаметра МС, после криоконсервирования, были получены на модели тканей надпочечников поросят [4]. Подобные изменения могут быть связаны с изменением клеточной поверхности после криоконсервирования, поскольку на начальных этапах формирования агрегатов необходимы контакты большого числа длинноцепочечных волокон поверхностных белков с интегринами [5]. Исследован пролиферативный потенциал клеток в составе 2D и 3D-культур путем подсчета АП на 3 сутки

после пересева (табл.). Установлено, что коэффициент пролиферации в монослое составил 5,44, тогда как в сфероиде – 4,27. Таким образом, вероятно, существует тенденция к снижению показателей пролиферации в составе МС, что может быть связано с отсрочиванием вступления в митоз и удлинением клеточного цикла при миграции и агрегации клеток на начальных этапах формирования сфероидов. На 5 сутки монослой достигал конфлюентного состояния, нами был произведен подсчет коэффициента пролиферации на данном этапе – он составил 8,39 для прикрепленной культуры и 6,17 МС соответственно.

Таблица – Коэффициент пролиферации в культуре клеток ДП при различных способах культивирования

Сутки роста	Нативная культура		Криоконсервированная культура	
	Монослой	МС	Монослой	МС
3	5,44±0,33	4,27±0,54	5,93±0,21	3,87±0,29
7	8,39±0,36	6,17±0,62	8,87±0,29	5,53±0,62
10	9,10±0,29	9,87±0,33	8,53±0,36	10,36±0,35

Далее мы исследовали пролиферативный потенциал в культурах на 7 сутки, когда рост клеток монослоя был ингибирован контактным торможением, коэффициент пролиферации составил 9,10 и 9,87 соответственно. Таким образом, динамика роста культур указывает на продолжение деления клеток в составе МС, в то время как контактное торможение клеток в составе монослоя приводит к значительному замедлению их роста. Замедление скорости роста сфероидов и их деградация (начинающаяся спустя 20-25 суток роста), по-видимому, связана с нарушением транспорта питательных веществ к глубоким слоям клеток и накоплением продуктов их распада. Такая структура организации – рост и деградация от центра к периферии была показана ранее на сфероидах была показана для многих типов МС [5,6].

Исследование пролиферативной активности клеток в составе монослоя показало, что коэффициент пролиферации на 3 сутки культивирования составляет 5,93 и значимо не отличается от такового в нативной культуре; в составе МС – 3,87. На 7 сутки наблюдения сохранялась аналогичная тенденция: коэффициент пролиферации составил 8,87 и 5,53 соответственно. После достижения конфлюентности монослоем, тенденция изменилась – пролиферативная активность монослойной культуры осталась практически неизменной – 8,53, в то время как в сфероидах увеличился почти в 2 раза по сравнению с 7

сутками – 10,36. Наши данные подтверждают литературные, полученные на ДП вибрисс мышей были получены данные, подтверждающие отсутствие влияния криоконсервирования на рост и индукцию данного типа клеток [7,8,9]. Сравним показатели АП в МС нативной и криоконсервированной культуры, заметно, что значимых отличий в скорости деления клеток в составе сфероидов нет. Таким образом, различия в размерах сфероидов, вероятно, связаны с нарушением агрегации клеток на этапе формирования МС, вследствие чего формируется большее число менее крупных сфероидов, при этом общая клеточность культуры сохраняется. Известно, что при криоконсервировании существует несколько критических этапов воздействия повреждающих факторов на клетку – как при контакте с криопротектором, так и непосредственно в процессе фазовых переходов [10]. В наибольшей степени повреждению подвержена мембрана и связанный с ней белковые структуры [11,12]. Таким образом, изменения свойств белков микротрубочек поверхностного цитоскелета может нарушать подвижность, межклеточный контакт и, как следствие, замедлять формирование матрикса, необходимого для объединения клеток.

Выводы

1. Криоконсервирование приводит к существенному уменьшению размера МС, измеренному на 20 сутки роста по сравнению с нативной культурой, что, вероятно, связано с замедлением агрегации клеток и скорости пролиферации при формировании МС.
2. Криоконсервирование не оказывает значимого влияния на интенсивность пролиферации в культуре ДП кролика – как в составе монослоя, так и МС.
3. Активность пролиферативных процессов в МС сфероидах уступает таковой в монослойной культуре на начальных этапах роста, однако, в связи с отсутствием контактного торможения, рост их происходит дольше.

Перспективы дальнейших исследований. Данные указывают на отсутствие качественных морфологических изменений в культурах ДП кролика как в монослое, так и в составе сфероидов. Дальнейшего изучения требует воздействие криоконсервирования на биохимические и иммунологические характеристики данной культуры. Перспективным направлением применения клеток ДП является направленная индукция с целью трансплантации при заместительной терапии. В связи с высокой пластичностью, будет проведено изучение криоконсервирования на индукционный потенциал клеток ДП.

Литература

1. Duval K, Grover H, Han LH. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture, *Physiology*, Bethesda. 2017;32(4):266-77.
2. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn*. 2004 Oct;231(2):258-69. DOI: 10.1002/dvdy.20129
3. Morgan BA. The dermal papilla: an instructive niche for epithelial stem and progenitor cells in development and regeneration of the hair follicle. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(7):a015180. DOI: 10.1101/cshperspect.a015180
4. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach YI, Bondarenko TP. Characteristics of Newborn Piglets Adrenal Cell Culture Obtained from Cryopreserved Tissue Fragments. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2013;4(1):95-9.
5. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface*. 2017;14(127):20160877. DOI: 10.1098/rsif.2016.0877
6. Tamatsu Y, Tsukahara K, Hotta M, Shimada K. Vestiges of vibrissal capsular muscles exist in the human upper lip. *Clin Anat*. 2017;20(6):628-31. DOI: 10.1002/ca.20497
7. Kajjura S, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. Cryopreservation of the Hair Follicle Maintains Pluripotency of Nestin-Expressing Hair Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(8):825-31. DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0500

8. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem cells*. 2004;23:727-37.
9. Biernaskie JA, McKenzie IA, Toma JG, Miller FD. Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nature protocols*. 2006;1:2803-12.
10. Fuller B, Lane N, Benson E, editors. *Life in the frozen state*. CRC Press; 2004. 663 p.
11. Van der Elst J, Van der Abbeel R, Jacobs E, Wisse A. Van Steirteghem Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction*. 1988;3(8):960-7.
12. Pajot-Augy E. Comparative effects of cryosolvents on tubulin association, thermal stability, and binding of microtubule-associated proteins. *Cryobiology*. 1993 Jun;30(3):286.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАТИВНОЇ ТА КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ КУЛЬТУР КЛІТИН ДЕРМАЛЬНОЇ ПАПИЛИ ВІБРИСИ НОВОНАРОДЖЕНИХ КРОЛІВ

Новікова О. Ю., Бондаренко Т. П.

Резюме. Волосяний фолікул являє собою складне динамічне утворення, сформоване клітинами різних зародкових шарів. Особливий інтерес становить пул клітин дермальної папили (ДП), що є похідними нервового гребеня. Метою роботи було дослідження впливу кріоконсервування на морфофункціональні властивості і ростовий потенціал культури клітин ДП вібриси кроля в нативній і кріоконсервованій культурах і при різних способах культивування – в моношарі і у вигляді мультиклітинних сфероїдів (МС). Встановлено, що кріоконсервування призводить до суттєвого зменшення розміру МС на 20 добу росту в порівнянні з нативною культурою, що пов'язано з уповільненням агрегації клітин і швидкості проліферації при формуванні МС. Кріоконсервування не чинить значного впливу на інтенсивність проліферації в культурі ДП кролика – в моношарі і МС. Активність проліферативних процесів в МС є нижчою ніж в моношаровій культурі на початкових етапах росту, однак, у зв'язку з відсутністю контактного гальмування, зростання їх відбувається довше.

Ключові слова: дермальна папіла, проліферація, мультиклітинні сфероїди, кріоконсервування.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАТИВНОЇ И КРІОКОНСЕРВИРОВАНОЇ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЇ ПАПИЛЛЫ ВІБРИСС НОВОРОЖДЕНИХ КРОЛИКОВ

Новікова О. Ю., Бондаренко Т. П.

Резюме. 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. Целью работы было исследование влияния кріоконсервирования на морфофункциональные свойства и ростовой потенциал культуры клеток ДП вибрисс кроликов в нативной и кріоконсервированной культурах и при различных способах культивирования – в монослое и в виде мультиклеточных сфероидов (МС). Установлено, что кріоконсервирование приводит к существенному уменьшению размера МС на 20 сутки роста по сравнению с нативной культурой, что связано с замедлением агрегации клеток и скорости пролиферации при формировании МС. Кріоконсервирование не оказывает значимого влияния на интенсивность пролиферации в культуре ДП кролика – в монослое и МС. Активность пролиферативных процессов в МС уступает таковой в монослойной культуре на начальных этапах роста, однако, в связи с отсутствием контактного торможения, рост их происходит дольше.

Ключевые слова: дермальная папилла, пролиферация, мультиклеточные сфероиды, кріоконсервирование.

CHARACTERISTICS OF NATIVE AND CRYOPRESERVED CULTURE OF DERMAL PAPILLA OF NEWBORN RABBITS VIBRISSA

Novikova O. Yu., Bondarenko T. P.

Abstract. The hair follicle is a complex dynamically changing formation formed by cells of different germ layers. Of particular interest is the pool of cells of the dermal papilla (DP), which are derivatives of the neural crest. The aim of the work was to study the effect of cryopreservation on the morphofunctional properties and growth potential of the culture of DP vibrissa DP cells in rabbits in native and cryopreserved cultures and in various cultivation methods, in a monolayer and in the form of multicellular spheroids (MS). The average size of the MS, measured on the 20th day after reseeding, was 370.00 ± 35.56 ; observations indicate that after this period the MS did not increase in size anymore and began to degrade. To study the effect of cryopreservation on the growth of MS, cryopreservation was performed in a cryoprotective medium based on DMEM with the addition of 10% DMSO. The average size of MS obtained from a suspension of cryopreserved culture, on the 20th day after reseeding, was 256.50 ± 33.00 ($p = 0.05$). Thus, there is a significant decrease in the size of MS formed from a cryopreserved culture, which is associated with a slowdown in cell aggregation and proliferation rate during the formation of MS. The proliferative potential of cells in the composition of 2D and 3 D-cultures was studied by counting AP on the 3rd day after reseeding. It was found that the proliferation coefficient in the monolayer was 5.44, while in the spheroids it was 4.27. Thus, there is probably a tendency toward a decrease in proliferation indices in the MS. Cryopreservation does not have a significant effect on the proliferation intensity in the rabbit DP culture – in the monolayer and in the MS. On the 15th day, the proliferative activity of the monolayer culture remained practically unchanged – 8.53, while in spheroids it increased almost 2 times compared to 7 days – 10.36. Thus, the activity of proliferative processes in MS is inferior to that in a monolayer culture at the initial stages of growth, however, due to the absence of contact inhibition, their growth takes longer.

Key words: dermal papilla, proliferation, multicellular spheroids, cryopreservation.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 25.08.2019 року*