

К.И. Богуславский, Н.М. Алабедалкарим, А.В. Пахомов, Г.А. Божок*

Влияние инкубации с криопротекторами на количество эпитопов Gal- α -1,3-Gal в клетках линии РК-15

UDC 57.085.23:547.42

K.I. Bohuslavskiy, N.M. Alabedalkarim, A.V. Pakhomov, G.A. Bozhok* Effect of Incubation of PK-15 Line Cells with Cryoprotectants on Amount of Gal-alpha-1,3-Gal Epitopes

Реферат: Трансплантация биопротезов, полученных из тканей быка и свиньи, является перспективным способом коррекции дефектов сосудов и клапанов, однако при его использовании может развиваться гиперострый иммунный ответ, обусловленный присутствием Gal- α -1,3-Gal (эпитопа α -Gal) на поверхности мембран клеток. В работе исследовано влияние проникающих и непроникающих криопротекторов на количество эпитопов α -Gal на мембранах клеток линии свиного происхождения РК-15. С помощью мечения клеток FITC-конъюгированным лектином BSI-B4 и проточной цитофлуориметрии было установлено значимое увеличение количества окрашенных клеток после инкубации с разными концентрациями диметилсульфоксида и полиэтиленгликоля с м. м. 1500 (ПЭГ-1500). Выявленный эффект может быть связан с дополнительным экспонированием эпитопов α -Gal на клеточной мембране, подвергшейся локальной деформации вследствие действия криопротекторов.

Ключевые слова: эпитоп Gal- α -1,3-Gal, криопротекторы, диметилсульфоксид, полиэтиленгликоль.

Реферат: Трансплантація біопротезів, отриманих із тканин бика і свині, є перспективним способом корекції дефектів судин і клапанів. Однак при його використанні може розвиватися гіперостра імунна відповідь, що обумовлена присутністю Gal- α -1,3-Gal (епітопи α -Gal) на поверхні мембран клітин. У роботі досліджено вплив проникаючих і непроникаючих криопротекторів на кількість епітопів α -Gal на мембранах клітин лінії свинячого походження РК-15. За допомогою мічення клітин FITC-кон'югованим лектином BSI-B4 та проточної цитофлуориметрії було встановлено значне збільшення кількості забарвлених клітин після інкубації з різними концентраціями диметилсульфоксиду та поліетиленгліколя з м. м. 1500. Виявлений ефект може бути пов'язаний з додатковим експонуванням епітопів α -Gal на клітинній мембрані, яка зазнала локальної деформації внаслідок дії криопротекторів.

Ключові слова: епітоп Gal- α -1,3-Gal, криопротектори, диметилсульфоксид, поліетиленгліколь.

Abstract: Transplantation of bioprostheses derived from bovine and porcine tissues is a promising method of correcting defects in blood vessels and valves, however when using it a hyperacute immune response associated with the presence of Gal-alpha-1,3-Gal (α -Gal epitope) on the surface of cell membranes can develop. We have studied the effect of penetrating and non-penetrating cryoprotectants on the amount of α -Gal epitopes on membranes of PK-15 cell line of porcine origin. Cell labeling with BSI-B4 lectin conjugated with FITC and flow cytometry revealed a significant increase in the number of fluorescent cells after incubation with various concentrations of dimethyl sulfoxide and polyethylene glycol with MW of 1500 (PEG-1500). The revealed effect may be associated with an additional exposure of α -Gal epitopes on cell membrane, locally deformed due to the action of cryoprotectants.

Key words: Gal- α -1,3-Gal epitope, cryoprotectants, dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol.

Углеводный остаток Gal- α -1,3-Gal (эпитоп α -Gal) входит в состав мембранных гликопротеинов и гликолипидов многих клеток млекопитающих [10, 12], а также элементов гликокаликса. В организме млекопитающих эпитоп α -Gal экспрессируется в высокой плотности [12, 14]. В ходе эволюционного развития его экспрессия у человека была подавлена [15], при этом в крови содержится высокий титр натуральных анти- α -Gal антител [13], которые при пересадке биоматериала животного происхождения провоцируют гиперострый иммунный

Carbohydrate residue Gal-alpha-1,3-Gal (α -Gal epitope) is a part of membrane glycoproteins and glycolipids of many mammalian cells [7, 9] and glycocalyx components as well. In mammals α -Gal epitope is highly expressed [9, 11]. During evolutionary development, its expression was suppressed in humans [12], nevertheless their blood contains a high titer of natural anti- α -Gal antibodies [10], which trigger a hyperacute immune response when transplanting animal biomaterial. Herewith the investigation of α -Gal epitope is valuable for transplantation.

Отдел криоэндокринологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Cryoendocrinology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: bozhokgaru@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: bozhokgaru@gmail.com

Поступила 22.09.2016
Принята в печать 28.10.2016

Received September, 22, 2016
Accepted October, 28, 2016

© 2016 K.I. Boguslavsky et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ответ. В связи с этим исследование эпитопа α -Gal является чрезвычайно важным для трансплантологии.

В современной мировой клинической и экспериментальной медицине широко используются клапаны сердца, кожные лоскуты, сосуды, роговица, перикард и подслизистая оболочка тонкого кишечника, полученные от свиней и крупного рогатого скота [18, 25, 28, 32, 34].

Для получения пригодных для трансплантации биопротезов необходима элиминация эпитопа α -Gal, поскольку может развиваться гиперострая иммунная реакция и биопротез будет отторгнут [10, 11]. Основным способом подготовки ксеногенных биопротезов является обработка первичного материала химическими сшивающими агентами, например, глутаровым альдегидом [6]. Дополнительно используются химическая или механическая децеллюляризация, а также обработка специальными агентами, которые снижают кальцификацию и увеличивают биосовместимость протеза [31]. В настоящее время в качестве таких агентов применяются полиэтиленгликоли (ПЭГ) с м. м. > 1000 [5, 31].

При использовании ПЭГ для консервирования органов и тканей был получен положительный эффект: стабилизация белков и их защита от протеолитической деградации [20]. Это позволило разработать на их основе консервирующие растворы-наполнители (*space fillers*) и высокосовместимые биопротезы нового поколения [27].

Еще одним из этапов предимплантационной подготовки тканеинженерных конструкций на основе материала животного происхождения (клапанов сердца, сосудов и т. д.) является криоконсервирование с применением диметилсульфоксида (ДМСО) или глицерина [17, 33, 35, 37]. При этом следует учитывать, что все криопротекторные вещества (проникающие и непроникающие) влияют на мембрану клетки и модифицируют ее поверхность [7, 19, 29], в том числе и антигенные эпитопы [2, 36]. Однако остается неясным, попадает ли под мембранно-модифицирующее действие криопротекторов эпитоп α -Gal.

Для изучения этого явления можно использовать модельную систему, в которой клетки потенциальных доноров, например свиньи, подвергаются воздействию криопротекторов. Нами была выбрана линия клеток почки свиньи PK-15, экспрессирующая эпитоп α -Gal в высокой плотности [9].

Цель представленной работы – изучение влияния инкубации с диметилсульфоксидом и полиэтиленгликолем с м. м. 1500 на присутствие эпитопа α -Gal в линии клеток PK-15.

Nowadays clinical and experimental medicine widely utilizes heart valves, dermal grafts, blood vessels, cornea, pericardium and submucosa of small intestine derived from pigs and cattle [15, 22, 26, 31, 33].

To obtain bioprosthesis suitable for transplantation the elimination of α -Gal epitope is required, since a hyperacute immune response may develop and bioprosthesis will be rejected [7, 8]. Treatment of primary material with chemical crosslinking agents, such as glutaric aldehyde is the main method of preparing xenogeneic bioprostheses [2]. Additionally, there are used chemical or mechanical decellularization, treatment with the special agents as well reducing calcification and increasing biocompatibility of prosthesis [30]. Nowadays there have been used the agents such as polyethylene glycols (PEG) with MW > 1000 [1, 30].

When using PEG to preserve organs and tissues a positive effect was observed in terms of stabilization of proteins and their protection from proteolytic degradation [17]. This allowed to develop on their basis preservative filler solution (space fillers) and a high compatible bioprostheses of new generation [25].

Cryopreservation with dimethyl sulfoxide (DMSO) or glycerol is another preimplantation stage for preparation of tissue-engineered constructs based on animal-derived material (cardiac valves, blood vessels etc.) [14, 32, 34, 36]. It should be noted that all cryoprotective agents (penetrating and non-penetrating) affect the cell membrane and modify its surface [4, 16, 27], *inter alia* antigenic epitopes [35, 37]. However, it remains unclear whether α -Gal epitope is a subject of membrane-modifying effect of cryoprotectants.

This phenomenon could be studied in a model system wherein the cells of potential donors, such as pigs are exposed to cryoprotectants. We chose the pig kidney of PK-15 cell line highly expressing α -Gal epitope [6].

The research aim was to study the incubation effect with dimethyl sulfoxide and polyethylene glycol with MW of 1500 on α -Gal epitope presence in PK-15 cell line.

Materials and methods

The experiments were performed in PK-15 porcine kidney cell line. The epitope was labelled by lectin of *Bandeiraea simplicifolia* plant, which is capable of specific binding [13, 21]. Changes in fluorescence nature and intensity of the cells, labelled with fluorochrome-conjugated isolectin can serve as indirect evidence of modification of α -Gal epitope on membrane surface.

The PK-15 cell line was maintained under the standard conditions using DMEM/F12 (PAA, Austria), containing 100 U/ml of Penicillin (Arterium, Ukraine), 100 mg/ml of Streptomycin (Arterium) and 10% of



Материалы и методы

Эксперименты выполняли на линии клеток почки свиньи РК-15. Эпитоп идентифицировали применяя лектином из растения *Bandeiraea simplicifolia*, который способен специфически связываться с ним [16, 24]. Изменение характера и интенсивности флуоресценции клеток, меченных флуорохром-конъюгированным изолектином, может служить косвенным доказательством модификации эпитопа α -Gal на поверхности мембраны.

Линию клеток РК-15 поддерживали в стандартных условиях с использованием среды DMEM/F12 («РАА», Австрия), содержащей 100 ЕД/мл пенициллина («Arterium», Украина), 100 мг/мл стрептомицина («Arterium») и 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС; «Biowest», Франция). Для эксперимента клеточный монослой снимали с подложки, используя смесь трипсина 0,5% («Sigma», США) и раствора Версена (1:1) («ПанЭко», Россия). После отмывания от фермента клетки ресуспендировали в среде, затем инкубировали с криопротекторами. Жизнеспособность клеток в исходной суспензии, которую определяли по методу окрашивания с трипановым синим, составляла 97–98%.

В опытах использовали ДМСО в концентрациях 5; 7,5 и 10% и ПЭГ-1500 в концентрациях 5, 10 и 15%. Криопротекторы готовили на среде DMEM/F12 («Sigma») в двойной концентрации и по каплям добавляли к равному объему клеточной суспензии. Клетки инкубировали при комнатной температуре с ДМСО в течение 20 мин, с ПЭГ-1500 в течение 60 мин (с учетом капельного добавления 20 мин). В качестве контрольных образцов использовали пробы, в которых клетки находились в питательной среде без криопротекторов. После инкубации клетки отмывали от криопротекторов в фосфатно-солевом буфере (PBS) путем центрифугирования (3 мин, 1500 об/мин).

Клетки окрашивали с помощью FITC-конъюгированного изолектина BSI-B4 («Sigma») по методу N. Deglon и соавт. [8]. Для этого 1×10^6 кл помещали в 0,25 мл PBS (pH 7,4). Меченый изолектин добавляли к пробам в разведении 1:150, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, отмывали путем центрифугирования и ресуспендировали в 0,5 мл PBS.

Клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра «BD FACS Calibur» («BD Bioscience», США) с использованием программного обеспечения «CellQuest Pro» («BD Bioscience», США) и «WinMDI 2.8» («Scripps Research Institute», США).

Для флуоресцентной микроскопии использовали культуру прикрепленных клеток. Ядра кле-

т fetal calf serum (FCS; Biowest, France). For the experimental applications the cell monolayer was detached from the substrate using a mixture of 0.5% Trypsin (Sigma, USA) and Versene solution (1:1) (PanEco, Russia). After enzyme washing-out the cells were resuspended in medium, and then incubated with cryoprotectants. The cell viability in initial suspension, determined by staining with trypan blue, was 97–98%.

In the experiments, we used 5; 7.5 and 10% DMSO and 5, 10 and 15% PEG-1500. Cryoprotectants were prepared with DMEM/F12 (Sigma, USA) in a double concentration and added dropwise to an equal volume of cell suspension. Cells were incubated at room temperature with DMSO for 20 min, with PEG-1500 for 60 min (considering the dropwise addition, 20 min). The cells in medium without cryoprotectants were the control samples. After incubation, the cells were washed free of cryoprotectants with phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation (3 min, 1,500 rot/min).

The cells were stained with FITC-conjugated isolectin BSI-B4 (Sigma) by the method of N. Deglon *et al.* [5]. To do this 1×10^6 cells were placed into 0.25 ml of PBS (pH 7.4). Labelled isolectin was added to the samples in the 1:150 ratio, incubated for 30 min at room temperature, washed by centrifugation and resuspended in 0.5 ml PBS.

The cells were analyzed with flow cytometer BD FACS Calibur (BD Bioscience, USA) using CellQuest Pro (BD Bioscience, USA) and WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute, USA) softwares.

The culture of adhered cells was used for fluorescence microscopy. The cell nuclei were stained with propidium iodide (Sigma). Fluorescence of labelled isolectin was observed using fluorescent inverted microscope Olympus IX-71 (Japan) at 488 nm excitation and 525 nm emission.

Each set comprised nine experiments in duplicate samples. For statistical processing we used Excel (Microsoft, USA) and Statistica 7.0 softwares (StatSoft, USA). Data were presented as the mean \pm SD. Differences between the samples were evaluated using ANOVA and considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The results of the staining of PK-15 cell culture with fluorochrome-conjugated lectin BSI-B4 confirmed the presence of α -Gal epitope (Fig. 1). Culture of cells in the presence of marker kept the main morphological features: a round shape of cells and nuclei, membrane integrity, monolayer confluency, adhesion to substrate. Most of cells were specifically labelled, testifying to lectin binding on cell surface, whereby the cell membrane was stained in green.

Fig. 2 shows dot plots of a typical distribution of cell culture in coordinates of direct (FSC) and side



ток окрашивали пропидий йодидом («Sigma»). С помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа «Olympus IX-71» (Япония) наблюдали флуоресценцию меченного изолектина при возбуждении 488 нм и испускании 525 нм.

В каждой серии было проведено по 9 экспериментов в двух параллельных пробах. Для статистической обработки данных использовали программные приложения «Excel» («Microsoft», США) и «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Данные представляли в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Различия между выборками оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты окрашивания клеток культуры РК-15 флуорохром-конъюгированным лектином BSI-B4 подтвердили наличие эпитопов α -Gal (рис. 1). В присутствии метки клетки культуры сохраняли основные морфологические особенности: округлую форму клеток и ядер, целостность мембраны, конфлюэнтность монослоя, адгезию к подложке. Для большинства клеток было характерно специфическое мечение, свидетельствующее о связывании лектина на поверхности клетки, за счет чего мембрана клетки окрашивалась в зеленый цвет.

На рис. 2 даны точечные графики (dot plots) типичного распределения клеток культуры в координатах прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, представлены неокрашенные (B) и окрашенные (C) клетки выделенной области.

Установлено, что после инкубации в присутствии разных концентраций ДМСО и ПЭГ-1500 значительно увеличивается количество BSI-B4-позитивных клеток по сравнению с клетками, необработанными криопротекторами (рис. 3). При повышении концентрации ДМСО количество меченных клеток не увеличивалось (рис. 3, А). В случае обработки ПЭГ-1500 установлена концентрационная зависимость, которая выражалась в увеличении количества меченных клеток при повышении концентрации криопротектора (рис. 3, В).

Проявляя свой криозащитный эффект, эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы неизбежно влияют на различные структуры клетки. На плазматическую мембрану клетки, которая является собой сложнейший макромолекулярный комплекс клеточной рецепции, адгезии и транспортировки веществ, направлено основное действие криопротекторных веществ.

Известно, что характер влияния криопротектора на мембрану клетки определяется его молекулярной массой и проникающей способностью [1]. Так, ДМСО легко проникает между полярными головками фосфолипидов мембраны, вследствие

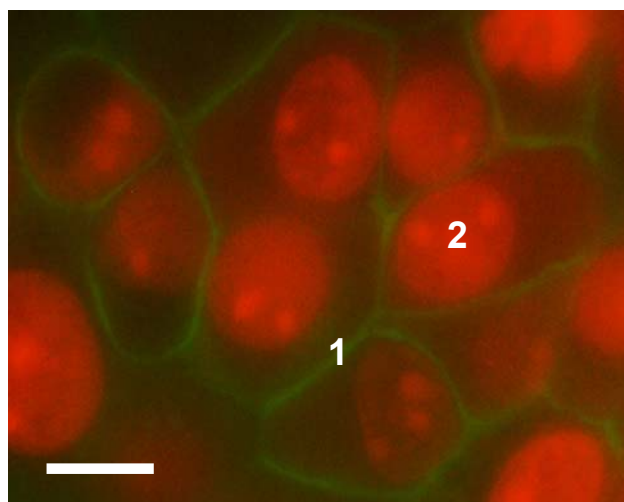


Рис. 1. Флуоресцентная микроскопия клеток линии РК-15, окрашенных изолектином BSI-B4 в разведении 1:150. $\times 900$. 1 – мембрана клеток со специфическим мечением изолектином BSI-B4; 2 – ядра, окрашенные пропидий йодидом. Масштабная линейка 20 мкм.

Fig. 1. Fluorescent microscopy of PK-15 cell line stained with BSI-B4 isolectin in 1:150 ratio. $\times 900$. 1 – cell membrane with a specific labeling of BSI-B4 isolectin, 2 – propidium iodide stained nuclei. Bar 20 μm .

(SSC) light scattering, there are represented unstained (B) and stained (C) cells of marked region.

It has been found that after incubation in the presence of different concentrations of DMSO and PEG-1500 the number of BSI-B4-positive cells was significantly increased if compared with the cells untreated with cryoprotectants (Fig. 3). When rising DMSO concentration a number of labelled cells was not increased (Fig. 3A). Treatment with PEG-1500 was characterized with a concentration dependence, *i. e.* the number of labelled cells was increased together with concentration of cryoprotectant (Fig. 3B).

Cryoprotective effect is accompanied with an inevitable action of either endo- or exocellular cryoprotectants on various cell structures. Mainly cryoprotective substances affect cell membrane, which is a macromolecular complex performing cellular reception, adhesion and transport of substances.

It has been known that the nature of cryoprotectant effect on the cell membrane is determined by its molecular weight and permeability [3]. For example, DMSO can easily penetrate between polar heads of membrane phospholipids, thereby lipid bilayer is expanded and getting thinner and its fluidity is increased [16]. High molecular weight polymers based on ethylene glycol, including PEG-1500, do not penetrate, however, being surface-active substances, they affect the structural and functional characteristics of cell membranes [3], packing of lipid bilayer and structure of membrane proteins [18, 24].



чего расширяется и истончается липидный бислой, повышается его текучесть [19]. Высокомолекулярные полимеры, полученные на основе этиленгликоля, в том числе и ПЭГ-1500, не обладают проникающей способностью, однако, будучи поверхностно-активными веществами, они влияют на структурно-функциональные характеристики клеточных мембран [1], упаковку липидного бислоя и структуру мембранных белков [21, 26].

Немаловажно, что частичное обезвоживание клеток, находящихся в растворах ПЭГ-1500, приводит к деформации клеточных мембран [3, 4]. При этом возможно не только экспонирование ранее закрытых от внешней среды участков, но и перераспределение компонентов клеточной мембраны. Так, нарушение асимметричного распределения фосфатидилсерина в эритроцитах, криоконсервированных в присутствии 20%-го раствора ПЭГ-1500, было описано в работе Н.Г. Землянских и соавт. [2].

Влияние криопротекторов на экспрессию различных мембранных эпитопов и рецепторов клетки изучено многими исследователями [2, 30, 38]. Например, показано изменение экспрессии рецептора адгезии CD44 в эритроцитах после инкубации в 20%-м растворе ПЭГ-1500 и криоконсервирования [2, 38]. Концентрационно зависимое увеличение экспрессии раннего маркера апоптоза на мембранах клеток линии HT-29 при инкубации с ПЭГ-800 установлено Н.К. Роу и соавт. [30].

D. Jarocha и соавт. [22] установили, что в результате обработки ядросодержащих клеток кордовой крови в течение часа 10%-м раствором ДМСО количество клеток, экспрессирующих маркер CXCR4, увеличивалось на 30%. Вместе с тем почти вдвое увеличивалось количество клеток, экспрессирующих маркеры CD34 и CD38. Авторы объяснили данный эффект нарушением механизмов экспонирования и интернализации рецепторов при увеличении текучести мембран под действием ДМСО.

Посттрансляционные модификации белков, как правило, включают гликозилирование, при котором к молекуле белка ковалентно присоединяется по-

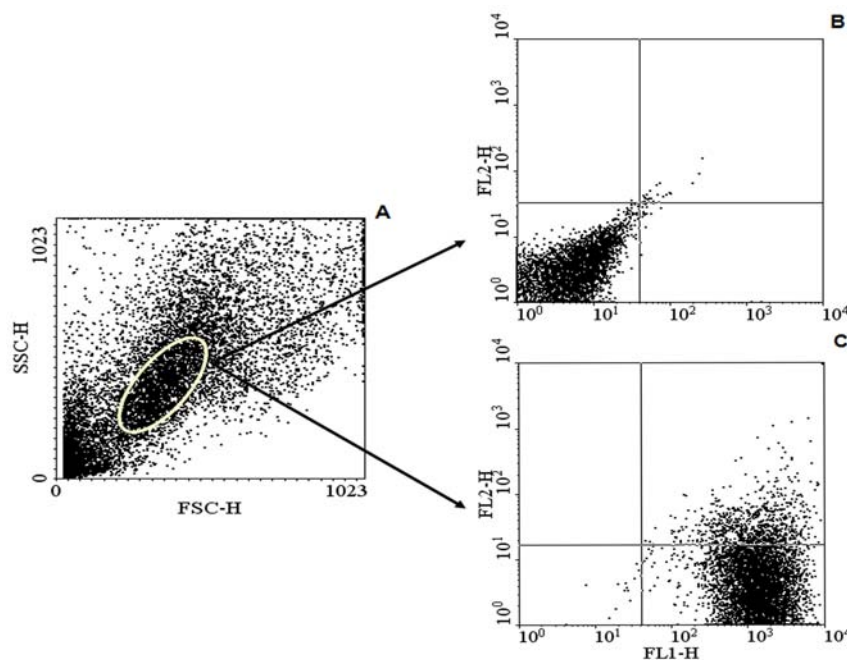


Рис. 2. Окрашивание клеток линии PK-15 изолектином BSI-B4: точечный график распределения клеток (A) в координатах прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния (анализируемая область выделена овалом); точечные графики неокрашенных (B) и окрашенных изолектином (C) клеток исследуемой области в координатах логарифма интенсивности флуоресценции: ось X – интенсивность в канале FL-1 (связывание изолектина клетками); ось Y – интенсивность в канале FL-2 (не содержит исследуемых параметров).

Fig. 2. Staining of PK-15 cell line with BSI-B4 isolectin: dot plots of cell distribution (A) in coordinates of direct (FSC) and side (SSC) light scattering (studied area is oval marked); dot plots of unstained (B) and stained with isolectin (C) cells of studied area in coordinates of fluorescence intensity logarithm: X axis – the intensity in FL-1 channel (isolectin binding with cells), Y axis – the intensity in FL-2 channel (does not comprise the studied parameters).

It is worth to mention, that the partial dehydration of cells in PEG-1500 solutions leads to a deformation of cell membrane [23, 28]. It is possible not only to exhibit the previously unexposed regions, but also to redistribute the components of cell membrane. For example, impairments of asymmetric distribution of phosphatidylserine in erythrocytes, cryopreserved in the presence of 20% PEG-1500, was described by N.G. Zemlianskykh *et al.* [37].

Influence of cryoprotectants on expression of various membrane epitopes and cell receptors has been studied by many researchers [29, 37, 38]. For example, there was shown the change in expression of CD44 adhesion receptor of erythrocytes after incubation with 20% PEG-1500 and cryopreservation [37, 38]. Concentration-dependent increase in expression of early marker of apoptosis on cell membranes of HT-29 cell line during incubation with PEG-800 was revealed by H.K. Roy *et al.* [29].

D. Jarocha *et al.* [19] found treatment of cord blood nucleated cells for an hour with 10% DMSO results in

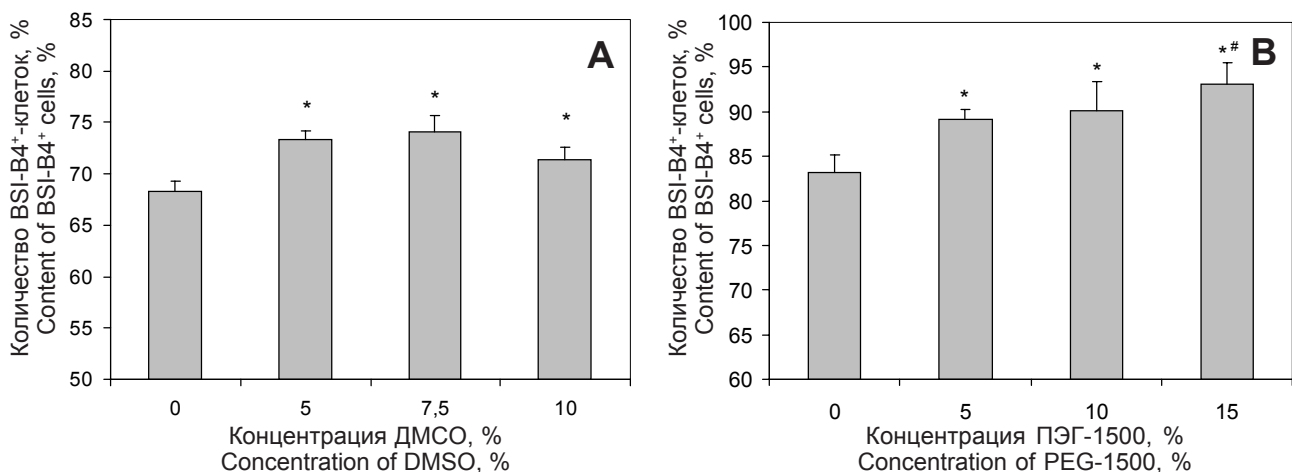


Рис. 3. Связывание клетками линии РК-15 изолектина BSI-B4 после инкубации с криопротекторами в разной концентрации: **А** – ДМСО; **В** – ПЭГ-1500; * – различия значимы по отношению к контролю, $p < 0,05$; # – различия значимы к показателям, полученным после инкубации в 5%-м растворе криопротектора соответственно, $p < 0,05$.

Fig. 3. Binding BSI-B4 isolectin with PK-15 cell line after incubation with cryoprotectants of various concentrations: **A** – DMSO; **B** – PEG-1500; * – differences are significant versus the control, $p < 0.05$; # – differences are significant versus the indices obtained after incubation in 5% cryoprotectant solution, respectively, $p < 0.05$.

лисахаридная цепочка N- или O-гликанов. Длина и разветвленность таких цепочек, как и набор сахаров, входящих в их состав, изменяются в зависимости от типа клеток и выполняемых функций (адгезия, миграция, распознавания и т. д.).

Галактозный остаток Gal- α -1,3-Gal широко представлен на гликолипидах и гликопротеинах мембран многих животных клеток, однако его функция до конца не определена. Учитывая, что удаление эпитопа α -Gal важно для нормального функционирования протезов животного происхождения, необходимо определить условия, влияющие на его экспрессию и элиминацию. Возможным фактором, модифицирующим экспонирование эпитопа на клеточной мембране, является действие мембранотропных веществ, в том числе и криопротекторов. Однако исследований в данном направлении на сегодняшний день проведено очень мало.

В данной работе впервые установлено, что количество клеток, реагирующих с изолектином BSI-B4, увеличивается после инкубации с проникающим ДМСО и непроникающим ПЭГ-1500 криопротекторами. После инкубации в растворах ДМСО количество клеток значительно увеличивалось на 5% (инкубация в 5%-м ДМСО), 5,8% (инкубация в 7,5%-м ДМСО) и 3% (инкубация в 10%-м ДМСО).

При использовании ПЭГ-1500 в концентрации 5% количество меченных изолектином клеток увеличилось на 6%, а в концентрациях 10 и 15% – на 7 и 10%.

Увеличение количества меченных изолектином клеток после инкубации может быть связано с дополнительным экспонированием эпитопов α -Gal на

an increase in number of cells expressing CXCR4 marker, by 30%. Moreover a number of cells expressing CD34 and CD38 markers increased nearly twice. The authors explained this effect by impairments of exposure mechanisms and receptor internalization when increasing fluidity of membranes under the effect of DMSO.

Posttranslational modifications of proteins typically include glycosylation, wherein polysaccharide chain of N- or O-glycans covalently binds to protein molecule. The length and branching of these chains as well as the diversity of sucroses being their components, vary depending on a cell type and functions (adhesion, migration, recognition *etc.*).

Galactose residue Gal- α -1,3-Gal is widely presented in glycolipids and glycoproteins membranes of many animal cells, but its function is not completely defined. Considering that the removal of α -Gal epitope is important for the normal functioning of prostheses of animal origin, it is necessary to identify the conditions affecting its expression and elimination. Action of membranotropic substances, including cryoprotectants is a possible factor modifying an epitope exposure on cell membrane. However, nowadays there are only few researches in this area.

In our study, it has been firstly established that the number of cells reacting with BSI-B4 isolectin, was increased after incubation with penetrating DMSO and non- penetrating PEG-1500 cryoprotectants. After incubation in DMSO solutions the number of the cells was significantly increased by 5% (incubation in 5% DMSO), 5.8% (incubation in 7.5% DMSO) and 3% (incubation in 10% DMSO).



их мембранах, подвергшихся локальной деформации вследствие действия криопротекторов.

Известно, что антитела имеют невысокое сродство к одиночным эпитопам α -Gal [23]. Если количество антигенов на мембране клеток увеличивается, то стабильность комплекса антиген-антитело повышается, следовательно, увеличивается количество меченных изолектином клеток. Результаты исследования показали, что поскольку влияние ПЭГ-1500 и ДМСО на количество эпитопов α -Gal, представленных на мембранах клеток, похоже, то данный эффект в большей степени зависит от мембранной деформации, чем от специфического действия использованных криозащитных веществ.

Выводы

Таким образом, обработка проникающим (ДМСО) и непроникающим (ПЭГ-1500) криопротектрами клеток линии РК-15 приводит к увеличению специфического мечения эпитопов α -Gal.

Представленные в работе данные могут быть применены для разработки стратегии получения, обработки и хранения протезов животного происхождения. Тестирование биоматериала на присутствие эпитопов α -Gal необходимо проводить после консервирования в криозащитных средах, содержащих ДМСО или ПЭГ-1500, а также после хранения в ПЭГ-содержащих растворах-наполнителях.

When using 5% PEG-1500 the number of isolectin labelled cells increased by 6%, for 10 and 15% PEG-1500 the number was by 7 and 10%, respectively.

Increasing the number of labelled cells after incubation may be associated with additional exposure of α -Gal epitopes on their membranes, subjected to local deformation due to the action of cryoprotectants.

It has been known that antibodies have a low affinity for α -Gal single epitopes [20]. If the number of antigens on the cell membrane grows, the stability of antibody-antigen complex increases, thus the number of labelled cells rises. The results of studies have shown that since the effects of PEG-1500 and DMSO on the number of α -Gal epitopes, presented on cell membranes, were similar, this effect largely depended on membrane deformation than on specific action of the used cryoprotective substances.

Conclusions

Thus, treatment with penetrating (DMSO) and non-penetrating (PEG-1500) cryoprotectants performed in PK-15 cell line results in increasing the specific labelling of α -Gal epitopes.

Presented data can be used to develop a strategy for derivation, treatment and storage of prostheses of animal origin. Biomaterial should be tested for the presence of α -Gal epitopes after preservation in cryoprotective media containing either DMSO or PEG-1500, and following storage in PEG-containing filler solutions.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. – К.: Наук. думка, 1994. – 431 с.
2. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Влияние криоконсервирования в присутствии криопротектора ПЭГ-1500 на поверхностные характеристики эритроцитов // Проблемы кробиологии и кривомицины. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 104–113.
3. Кулешова Л.Г. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1. Морфологический аспект взаимодействия // Проблемы кробиологии. – 1999. – №1. – С. 9–13.
4. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Цветков Ц.Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования. – К.: Наук. думка, 1984. – 264 с.
5. Aravind S., Paul W., Vasudev S.C. et al. Polyethylene glycol (PEG) modified bovine pericardium as a biomaterial: a comparative study on immunogenicity // J. Biomater. Appl. – 1998. – Vol 13, №2. – P. 158–165.
6. Badylak S. F., Gilbert T. W. Immune response to biologic scaffold materials // Semin. Immunol. – 2008. – Vol. 20, №2. – P. 109–116.
7. Blackall D.P., Armstrong J.K., Meiselman H.J. et al. Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycoprotein A-specific antibodies and are impervious to invasion by the Plasmodium falciparum malaria parasite // Blood. – 2001. – Vol. 97, №2. – С. 551–556.
8. Deglon N., Aubert V., Spertini F.P. et al. Presence of Gal-alpha 1,3-Gal epitope on xenogeneic lines: implications for cellular

References

1. Aravind S., Paul W., Vasudev S.C. et al. Polyethylene glycol (PEG) modified bovine pericardium as a biomaterial: a comparative study on immunogenicity. J Biomater Appl 1998; 13(2): 158–165.
2. Badylak S. F., Gilbert T. W. Immune response to biologic scaffold materials. Semin. Immunol 2008; 20(2): 109–116.
3. Belou A.M., Grischenko V.I. Cryobiology. Kyiv: Naukova Dumka; 1994.
4. Blackall D.P., Armstrong J.K., Meiselman H.J. et al. Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycoprotein A-specific antibodies and are impervious to invasion by the Plasmodium falciparum malaria parasite. Blood 2001; 97(2): 551–556.
5. Deglon N., Aubert V., Spertini F.P. et al. Presence of Gal-alpha 1,3-Gal epitope on xenogeneic lines: implications for cellular gene therapy based on the encapsulation technology. Xenotransplantation. 2003; 10(3): 204–213.
6. Diaz T.M., Pertega S., Ortega D. et al. FDA/PI flow cytometry assay of complement-mediated cytotoxicity of antibodies generated during xenotransplantation. Cytometry A 2004; 62(1): 54–60.
7. Ezzelarab M., Ayares D., Cooper D.K.C. Carbohydrates in xenotransplantation. Immunol Cell Biol 2005; 83(4): 396–404.
8. Galili U. The α -Gal epitope (Gal α 1-3Gal α 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. Biochemie 2001; 83(7): 557.
9. Galili U. The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. Immunol Cell Biol 2005; 83(6): 674–686.



- gene therapy based on the encapsulation technology // Xenotransplantation. – 2003. – Vol. 10, №3. – P. 204–213.
9. Diaz T.M., Pertega S., Ortega D. et al. FDA/PI flow cytometry assay of complement-mediated cytotoxicity of antibodies generated during xenotransplantation // *Cytometry A*. – 2004. – Vol. 62, №1. – P. 54–60.
 10. Ezzelarab M., Ayares D., Cooper D.K.C. Carbohydrates in xenotransplantation // *Immunol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 83, №4. – P. 396–404.
 11. Galili U. The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation // *Biochemie*. – 2001. – Vol. 83, №7. – P. 557.
 12. Galili U. The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy // *Immunol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 83, №6. – P. 674–686.
 13. Galili U., Clark M.R., Shohet S.B. et al. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal- α -1,3-Gal epitope in primates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1987. – Vol. 84, №5. – P. 1369–1373.
 14. Galili U., Shohet S.B., Kobrin E. et al. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells. // *J. Biol. Chem*, 1988. – Vol. 263, №33. – P. 17755–17762.
 15. Galili U., Swanson K. Gene sequences suggest inactivation of α -1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – Vol. 88, №16. – P. 7401–7404.
 16. Goldstein I.J., Blake D.A., Ebisu S. et al. Carbohydrate binding studies on the *Bandeiraea simplicifolia* 1 isolectins. Lectins which are mono-, di-, tri-, and tetravalent for N-acetyl-D-galactosamine // *J. Biol. Chem.* – 1981. – Vol. 256, № 8. – P. 3890–3893.
 17. Goldstein S., Clarke D.R., Walsh S.P. et al. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xenograft // *Ann. Thorac. Surg.* – 2000. – Vol. 70, №6. – P. 1962–1969.
 18. Gonzalez-Andrades M., de la Cruz C.J., Ionescu A.M. et al. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52, №1. – P. 215.
 19. Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide // *J. Phys. Chem. B*. – 2007. – Vol. 111, №35. – P. 10453–104560.
 20. Han D.K., Jeong S.Y., Kim Y.H. Evaluation of blood compatibility of PEO grafted heparin immobilized polyurethanes // *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* – 1989. – Vol. 23, №A2 Suppl. – P. 211–228.
 21. Hui S. W., Isac T., Boni L. T. et al. Action of polyethyleneglycol on the fusion of human erythrocyte membranes // *J. Membr. Biol.* – 1985. – Vol. 84, №2. – P. 137–146.
 22. Jarocha D., Zuba-Surma E., Majka M. Dimethyl sulfoxide (DMSO) increases percentage of CXCR4(+) hematopoietic stem/progenitor cells, their responsiveness to an SDF-1 gradient, homing capacities, and survival cell // *Cell Transplant.* – 2016. – Vol. 25, №7. – P. 1247–1257.
 23. Katopodis A.G., Warner R.G., Duthaler R.O. et al. Removal of anti-Gal α 1,3 Gal xenoantibodies with an injectable polymer // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110, №12. – P. 1869–1877.
 24. Kirkeby S., Moe D. Binding of *Griffonia simplicifolia* 1 isolectin B4 (GS1 B4) to α -galactose antigens // *Immunol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 79. – P. 1211–1227.
 25. Konakci K.Z., Bohle B., Blumer R. et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 35, №1. – P. 17–23.
 26. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes // *Biophys. J.* – 1995. – Vol. 68, №2. – P. 525–535.
 27. Lim H. G., Kim G. B., Jeong S. et al. Development of a next-generation tissue valve using a glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve treated with decellularization, α -galactosidase,
 28. Galili U., Clark M.R., Shohet S.B. et al. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal- α -1,3-Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(5): 1369–1373.
 29. Galili U., Shohet S.B., Kobrin E. et al. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988; 263(33): 17755–17762.
 30. Galili U., Swanson K. Evolution gene sequences suggest inactivation of α -1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 7401–7404.
 31. Goldstein I.J., Blake D.A., Ebisu S. et al. Carbohydrate binding studies on the *Bandeiraea simplicifolia* 1 isolectins. Lectins which are mono-, di-, tri-, and tetravalent for N-acetyl-D-galactosamine. *J Biol Chem* 1981; 256(8): 3890–3893.
 32. Goldstein S., Clarke D.R., Walsh S.P. et al. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xenograft. *Ann Thorac Surg* 2000; 70(6): 1962–1969.
 33. Gonzalez-Andrades M., de la Cruz C.J., Ionescu A.M. et al. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(1): 215.
 34. Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J Phys Chem B* 2007; 111(35): 10453–104560.
 35. Han D.K., Jeong S.Y., Kim Y.H. Evaluation of blood compatibility of PEO grafted heparin immobilized polyurethanes. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 1989; 23(A2 Suppl): 211–228.
 36. Hui S. W., Isac T., Boni L. T. et al. Action of polyethyleneglycol on the fusion of human erythrocyte membranes. *J Membr Biol* 1985; 84(2): 137–146.
 37. Jarocha D., Zuba-Surma E., Majka M. Dimethyl sulfoxide (DMSO) increases percentage of CXCR4(+) hematopoietic stem/progenitor cells, their responsiveness to an SDF-1 gradient, homing capacities, and survival cell. *Cell Transplant* 2016; 25(7): 1247–1257.
 38. Katopodis A.G., Warner R.G., Duthaler R.O. et al. Removal of anti-Gal α 1,3 Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J Clin Invest* 2002; 110(12): 1869–1877.
 39. Kirkeby S., Moe D. Binding of *Griffonia simplicifolia* 1 isolectin B4 (GS1 B4) to α -galactose antigens. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 121–127.
 40. Konakci K.Z., Bohle B., Blumer R. et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest* 2005; 35(1): 17–23.
 41. Kuleshova L.G. Transformation of human erythrocytes in non-electrolytes of H-alcohols series. Part I. Morphological aspects of interaction. *Problems of Cryobiology* 1999; (1): 9–13.
 42. Lehtonen J.Y., Kinnunen P.K. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes. *Biophys J* 1995; 68(2): 525–535.
 43. Lim H. G., Kim G. B., Jeong S. et al. Development of a next-generation tissue valve using a glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve treated with decellularization, α -galactosidase,



- space filler, organic solvent and detoxification // *EJCTS*. – 2015. – Vol. 48, №1. – P. 104–113.
28. Mangold A., Szerafin N., Hoetzenecker K. et al. Alpha-Gal specific IgG immune response after implantation of boi-prostheses // *Thorac. Cardio. Surg.* – 2009. – Vol. 57, №4. – P. 191–195.
 29. McIntyre J.A., Gilula N.B., Karnovsky M.J. Cryoprotectant-induced redistribution of intramembranous particles in mouse lymphocytes // *J. Cell Biol.* – 1974. – Vol. 60, №1. – P. 192–203.
 30. Roy H.K., Di Baise J.K., Black J. et al. Polyethylene glycol induces apoptosis in HT-29 cells: potential mechanism for chemoprevention of colon cancer // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 496, №2–3. – P. 143–146.
 31. Saeromi J., Yoon E.J., Lim H.G. et al. The effect of space fillers in the cross-linking processes of bioprosthesis // *Biores. Open Access*. – 2013. – Vol. 2, №2. – P. 98–106.
 32. Sandomirsky B.P., Repin N.V., Mikhailova I.P. et al. Application of cryoirradiation-modified xenopericardium for building bladder wall defect // *Int. J. Artif Organs*. – 2016. – Vol. 39, №3. – P. 121–127.
 33. Schenke-Layland K., Madershahian N., Riemann I. et al. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets // *Ann. Thorac. Surg.* – 2006. – Vol. 81, №3. – P. 918–926.
 34. Siddiqui R.F., Abraham J.R., Butany J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure // *Histopathology*. – 2009. – Vol. 55, №2. – P. 135–144.
 35. Simon P., Kasimir M.T., Seebacher G. et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients // *Eur. J. Cardiothorac Surg.* – 2003. – Vol. 23, №6. – P. 1002–1006.
 36. Wang D., Kyliuk D.L., Murad K.L. et al. Polymer-mediated immunocamouflage of red blood cells: effects of polymer size on antigenic and immunogenic recognition of allogeneic donor blood cells // *Sci. China Life Sci.* – 2011. – Vol. 54, №7. – P. 589–598.
 37. Wollmann L.C., Laurindo C.A., Costa F.D. et al. Effects of cryopreservation and/or decellularization on extracellular matrix of porcine valves // *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* – 2011. – Vol. 26, №3. – P. 490–496.
 38. Zemlianskykh N. G. Effect of substances with cryoprotective properties on surface marker CD44 in human erythrocytes // *Cytology and Genetics*. – 2016. – Vol. 50, №3. – P. 203–213.
 30. Saeromi J., Yoon E.J., Lim H.G. et al. The effect of space fillers in the cross-linking processes of bioprosthesis. *Biores Open Access* 2013; 2(2): 98–106.
 31. Sandomirsky B.P., Repin N.V., Mikhailova I.P. et al. Application of cryoirradiation-modified xenopericardium for building bladder wall defect. *Int J Artif Organs* 2016; 39(3): 121–127.
 32. Schenke-Layland K., Madershahian N., Riemann I. et al. Impact of cryopreservation on extracellular matrix structures of heart valve leaflets. *Ann Thorac Surg* 2006; 81(3): 918–926.
 33. Siddiqui R.F., Abraham J.R., Butany J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure. *Histopathology* 2009; 55(2): 135–144.
 34. Simon P., Kasimir M.T., Seebacher G. et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23(6): 1002–1006.
 35. Wang D., Kyliuk D.L., Murad K.L. et al. Polymer-mediated immunocamouflage of red blood cells: effects of polymer size on antigenic and immunogenic recognition of allogeneic donor blood cells. *Sci China Life Sci* 2011; 54(7): 589–598.
 36. Wollmann L.C., Laurindo C.A., Costa F.D. et al. Effects of cryopreservation and/or decellularization on extracellular matrix of porcine valves. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2011; 26(3): 490–496.
 37. Zemlianskykh N. G., Babiychuk L.A. Cryopreservation in presence of PEG-1500 affects erythrocyte surface characteristics. *Probl Cryobiol Cryomed* 2015; 25(2): 104–113.
 38. Zemlianskykh N. G. Effect of substances with cryoprotective properties on surface marker CD44 in human erythrocytes. *Cytology and Genetics* 2016; 50(3): 203–213.