

## Влияние инкубации с криопротекторами на присутствие эпитопа Gal-alpha-1,3-Gal в клетках линии РК-15

К.И. Богуславский, А.В. Пахомов, Г.А. Божок

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Incubation of PK-15 Cells with Cryoprotectants on Presence of Gal-alpha-1,3-Gal Epitope

K.I. Bohuslavskiy, A.V. Pakhomov, G.A. Bozhok

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

Эпитоп Gal-alpha-1,3-Gal ( $\alpha$ -Gal) – это углеводная структура, которая экспрессируется в организме млекопитающих, кроме человека и некоторых видов обезьян. Для получения и хранения животного биоматериала, предназначенного для изготовления биопротезов, применяются технологии низкотемпературного хранения. Однако сведения о его влиянии на присутствие  $\alpha$ -Gal практически отсутствуют.

Цель данной работы – изучение влияния инкубации с криопротекторами диметилсульфоксидом (ДМСО) и оксиэтилированным глицерином (ОЭГ) как первого этапа криоконсервирования на присутствие  $\alpha$ -Gal в культуре клеточной линии свиного происхождения РК-15.

Линию клеток РК-15 поддерживали в стандартных условиях с использованием среды DMEM/F12, обогащенной антибиотиками и 10% фетальной телячьей сывороткой. Для эксперимента клеточный монослой открепляли от подложки с помощью смеси 0,5% трипсина и раствора Версена (1:1). После отмывки от фермента клетки ресуспендировали и инкубировали в растворах, содержащих ДМСО в концентрации 5, 7,5 и 10% или ОЭГ ( $n = 5$ ) в концентрации 5, 10 и 15%. После отмывания от криопротектора клетки окрашивали с помощью FITC-конъюгированного изолектина BSI-B4, который добавляли к пробам в разведениях 1:150, 1:250 и 1:500. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием программного обеспечения «CellQuestPro» (США) и «WinMDI 2.8» (США).

С помощью метода цитофлуориметрии в культуре РК-15 выявлены две субпопуляции клеток (R1 и R2), обладающие разными параметрами прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Установлено, что клетки R1 связывали изолектин BSI-B4 в меньшей степени, чем клетки R2. В связи с этим в дальнейших экспериментах клетки анализировали по двум отдельным регионам как имеющие низкую BSI-B4<sup>low</sup> (R1) и высокую BSI-B4<sup>high</sup> (R2) интенсивность флуоресценции.

После инкубации с ДМСО во всех концентрациях количество BSI-B4-позитивных клеток в обоих регионах значимо не отличалось от контроля. После инкубации с ОЭГ во всех концентрациях наблюдалось увеличение количества BSI-B4-позитивных клеток в R1, тогда как в клетках R2 не было обнаружено значимой разницы по сравнению с контрольными значениями.

Результаты работы свидетельствуют о возможности модификации клеточной поверхности в присутствии криопротекторов. Предположительно, это может происходить за счет нескольких факторов: структурных или конформационных изменений эпитопа  $\alpha$ -Gal, что влияет на связывание антител с ним; увеличения доступности эпитопов  $\alpha$ -Gal для связывания с антителами.

The Gal-alpha-1,3-Gal ( $\alpha$ -Gal) epitope is a carbohydrate structure, expressing in mammalian body, except human and some monkey species. Procurement and storage of animal biomaterial for bioprostheses manufacture involves low temperature storage technologies. However, the information about their effects on  $\alpha$ -Gal presence is poor.

This research aim was to study the effect of incubation with dimethyl sulfoxide (DMSO) and oxyethylated glycerol (OEG) cryoprotectants as the first stage of cryopreservation on  $\alpha$ -Gal presence in PK-15 cell line culture of porcine origin.

The PK-15 cell line was maintained under the standard conditions using DMEM/F12, supplemented with antibiotics and 10% fetal calf serum. Before the experiment the cell monolayer was detached from the substrate with a mixture of 0.5% trypsin and Versene solutions (1:1). After enzymes washing-out the cells were resuspended and incubated in the solutions containing either 5, 7.5 and 10% DMSO or 5, 10 and 15% OEG ( $n = 5$ ). After washing of cryoprotectants the cells were stained with FITC-conjugated isolectin BSI-B4, added to the samples at 1:150, 1:250 and 1:500 dilutions. Cells were analyzed with BD FACS Calibur flow cytometer (USA) using CellQuestPro (USA) and WinMDI 2.8 (USA) softwares.

Two cell subpopulations (R1 and R2) with different parameters of direct (FSC) and side (SSC) light scattering were revealed in PK-15 culture using flow cytometry. The R1 cells were established to bind isolectin BSI-B4 in a lower degree than R2 ones. Due to this fact in further experiments we analyzed the cells by two separate regions with low and high intensities of fluorescence BSI-B4<sup>low</sup> (R1) BSI-B4<sup>high</sup> (R2).

After incubation with DMSO in all the concentrations a number of BSI-B4-positive cells in both regions was not significantly different from the control. After incubation with OEG in all the concentrations we observed an increased number of BSI-B4-positive cells in R1, meanwhile in R2 cells no significant difference as compared to the control values were revealed.

Our findings testify to the possibility of modifying the cell surface in the presence of cryoprotectants. This can presumably occur due to either structural or conformational changes in  $\alpha$ -Gal epitope, affecting the binding of antibodies; or due to an increased  $\alpha$ -Gal epitope availability to antibodies.

