

DOI: 10.26693/jmbs05.02.185

УДК 576.356.3

Новикова О. Ю., Бондаренко Т. П.

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ КРОЛИКА ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

oyunovikova@biolik.com.ua

В большинстве современных протоколов криоконсервирования клеток млекопитающих применяются криозащитные растворы на основе диметилсульфоксида. Несмотря на возможность физиологического вмешательства и цитотоксичности, диметилсульфоксид остается предпочтительным растворителем в биомедицинских исследованиях. В связи с этим, требует изучения влияние диметилсульфоксида на качество культур после взаимодействия с ним и криоконсервирования. Дermalная папилла вибриссы является источником плюрипотентных клеток – производных нервного гребня. В связи с плюрипотентностью, данный тип клеток представляет интерес для трансплантации, что связано с необходимостью их долгосрочного культивирования и хранения. В данной работе изучены патологические изменения в клетках диплоидной культуры дермальной папиллы вибриссы кролика, возникающие в интерфазе и сохраняющиеся в течение 2 пассажей после экспозиции с криозащитными средами на основе разных концентраций Диметилсульфоксида. Установлено, что инкубация в криозащитной среде, содержащей 5 и 7,5%, является безопасной с точки зрения индукции цитологических нарушений. Диметилсульфоксид в концентрациях, превышающих 10%, приводит к дозозависимому возрастанию патологий клеток. Среди патологий чаще всего возникали нарушения, связанные с дефектами мембран и цитоскелета – вакуолизация цитоплазмы, формирование микровезикул на мембране. А также нарушения, затрагивающие генетический и белоксинтезирующий аппарат: полиплоидные, многоядерные клетки, клетки с ядрами аномальной формы, с микроядрами, на различных терминальных стадиях апоптоза. На основе сравнения культур на 1 и 2 пассажах после воздействия диметилсульфоксида установлено, что обнаруженные нарушения не элиминируются в процессе культивирования, а сохраняются и накапливаются. Показано, что белково-пептидные добавки способны проявлять протекторное действие на фоне высоких концентраций диметилсульфоксида, что способствует

сохранению жизнеспособности клеток, однако ведет к накоплению аномалий в культуре в процессе дальнейшего культивирования.

Ключевые слова: дермальная папилла, митоз, патология деления, диметилсульфоксид, криоконсервирование.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Данная работа является фрагментом НИР «Структурно-функціональні властивості та проліферативний потенціал ендокринних тканин при культивуванні, криоконсервуванні та трансплантації», № государственной регистрации 0111U001196.

Введение. В большинстве современных протоколов криоконсервирования клеток млекопитающих применяются криозащитные растворы на основе эндоцеллюлярного криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). ДМСО является активным в биологическом отношении веществом, взаимодействующим с фосфолипидами, что делает его эффективным для облегчения перемещения молекул, особенно лекарств, через биологические мембраны. Криозащитное действие ДМСО также основано на высокой скорости проникновения через биологические мембраны и способности образовывать множественные водородные связи с молекулами жидкой фазы клетки. Это приводит к уменьшению вероятности образования внутриклеточных кристаллов льда, а также к снижению эффекта концентрирования внутриклеточных солей при отрицательных температурах, что уменьшает степень криоповреждения клетки.

Однако ДМСО является агентом, оказывающим влияние на состояние белков и нуклеиновых кислот в клетке, он способен индуцировать патологические изменения в аппарате деления. Воздействие ДМСО на клетку имеет несколько точек приложения – это изменение проницаемости мембран для макромолекул, изменение осмотического потенциала цитоплазмы, ремоделирование молекул биополимеров, в связи с чем он имеет широкое распространение в медицине и биологии,

в том числе в качестве криопротектора. В многочисленных работах установлена зависимость характера воздействия ДМСО на клетку в зависимости от его концентрации [1-3]. При этом порог чувствительности к воздействию может быть различным для разных клеточных систем, в зависимости от их метаболических особенностей. Следовательно, изучения требуют изменения, вызванные ДМСО в культуре, поскольку он является наиболее распространенным криопротектором. Существует относительно мало данных о криоконсервировании клеток дермальной папиллы (ДП) волосяного фолликула (ВФ) [4-6]. Зачастую метод криоконсервирования применяется к культуре клеток с целью длительного хранения, а в связи с широким дифференцировочным потенциалом, всегда рассматривается возможность терапевтического клинического применения данного типа клеток. Для этого недостаточно контроля жизнеспособности и сохранения основных биохимических маркеров культуры, необходимо быть уверенным в отсутствии генетических и метаболических изменений. Морфологический анализ культуры, несущей повреждение клеток, может указывать на процессы, ведущие к накоплению патологий и гибели клеток. В данном исследовании мы изучили патологические изменения в клетках ДП, возникающие в интерфазе и сохраняющиеся в течение 2 пассажей после эквilibрации с криозащитными средами на основе разных концентраций ДМСО.

На сегодняшний день показана возможность получения плюрипотентных клеток ДП из криоконсервированных фолликулов, однако изменения, происходящие в культуре на клеточном уровне, не изучены.

Цель исследования – оценить влияние инкубации в средах, содержащих различные концентрации ДМСО и бычий сывороточный альбумин, на немитотические цитологические нарушения клеток дермальной папиллы кролика.

Материал 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 собственной методике. Для этого выделяли волосяные фолликулы из вибрисс новорожденных кролей. ДП изолировали и помещали в 6-луночные планшеты (РАА, Австрия), покрытые желатином (Генезис, Украина). Для культивирования использовали питательную среду ДМЕМ/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 конфлуентного 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 получения цитологических препаратов клетки пересевали на покровные стекла (MICROmed, Украина), помещенные в 6-луночные планшеты для культивирования клеток (SPL, Германия). Посевная концентрация составляла $4 \cdot 10^4$ клеток/см³. Культивирование производили в течение 48 часов, после чего культуры фиксировали и готовили цитологические препараты по стандартному методу.

Растворы ДМСО в концентрациях 5%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15% были приготовлены на основе питательной среды. Ряд растворов содержал 5%-й бычий сывороточный альбумин (БСА, BioWest, Франция) или белковый гидролизат (БГ) рыб с молекулярной массой пептидов до 5 кДа в качестве стабилизирующей добавки.

Инкубации в растворах с ДМСО подвергались клетки 1 пассажа. Для этого к осадку клеток, снятых с поверхности культивирования, добавляли растворы с двойной концентрацией ДМСО, БСА, БГ выдерживали в течение 25 минут при комнатной температуре, после чего производили центрифугирование (300g, 5 мин). После этого надосадок удаляли, а клетки отмывали путем центрифугирования в том же режиме. Таким образом, общее время контакта клеток с исследуемыми криозащитными средами составляло 30 минут. Далее клетки помещали в условия культивирования, как описано выше.

Контролем служили клетки, которые были подвергнуты инкубации в питательной среде без криопротектора и белково-пептидных добавок.

Патологии изучали на фиксированных препаратах культур клеток ДП 1 и 2 пассажей. В каждом препарате учитывали 1000 клеток. Результаты выражались в промилле (%).

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

Статистический анализ данных производился с помощью ПО Statistica и Excel. Статистическую

значимость оценивали, рассчитывая параметрический критерий Стьюдента. Отличия считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Анализировали количество клеток ДП с наличием следующих патологий: полиплоидные клетки, клетки с несколькими ядрами, с микроядрами (МЯ), с ядрами аномальной формы (рис. 1-е); на различных терминальных стадиях апоптоза: с конденсированным хроматином, пикнотическими ядрами, формирующие апоптотические тельца (рис. 1-в). Оценивалось формирование микровезикулярных частиц на поверхности клеток – т.н. блеббинг (рис. 1-г).

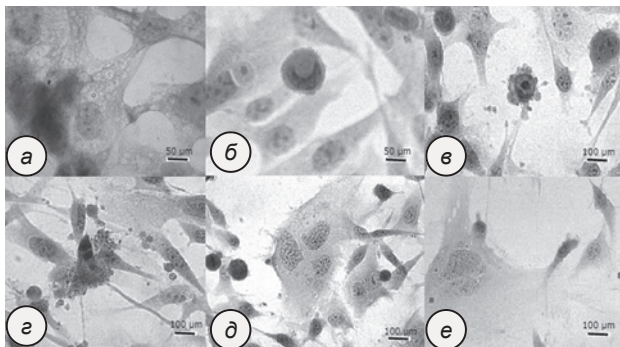


Рис. 1. Патологии в культуре клеток ДП на стадии интерфазы:

а) вакуолизация цитоплазмы; б) апоптоз – конденсация хроматина в виде «серпа»; в) апоптоз – формирование апоптотических телец; г) блеббинг; д) полиплоидная клетка с 3 ядрами; е) полиплоидная клетка с лопастным ядром. Увеличение: (а-в) – $\times 400$; (г-е) – $\times 900$

Цитоморфологический анализ показал, что в интактной культуре клеток ДП присутствует незначительная часть клеток с патологией, клетки монослоня имели нормальную морфологию: фибробластовидную форму, одно ядро, одинаковые размеры и равномерный рост. Немногочисленные отклонения (4,5%) представляли собой увеличенные клетки – предположительно, полиплоиды и клетки с 2 ядрами. На втором пассаже уровень и характер патологий в контрольном варианте значимо не изменились (7,2%).

Во всех вариантах сред, при увеличении концентрации ДМСО до 10%, не происходило значимого повышения уровня патологий во всех вариантах криозащитных сред (рис. 2-4).

В клетках, прошедших экспозицию с высокими концентрациями ДМСО (12,5 и 15%) и без добавления белковых компонентов, происходила массовая и обширная вакуолизация цитоплазмы (рис. 1-а). Наибольшую долю патологий занимали такие нарушения как полиплоидные клетки (с размерами, превышающими нормальный в 4-10 раз), клеток с микроядрами и с несколькими ядрами. Показано, что появление многоядерных клеток, к которым

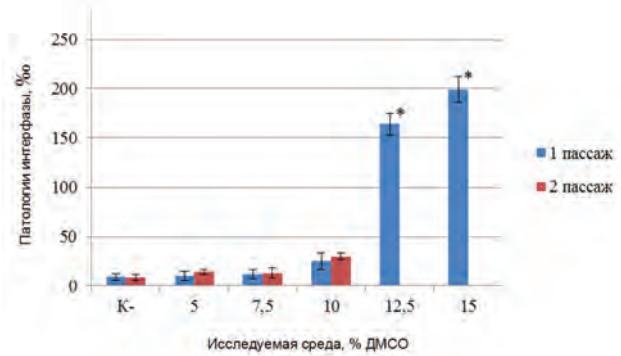


Рис. 2. Относительное число патологий деления в культуре клеток ДП, обработанных ДМСО, %.

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

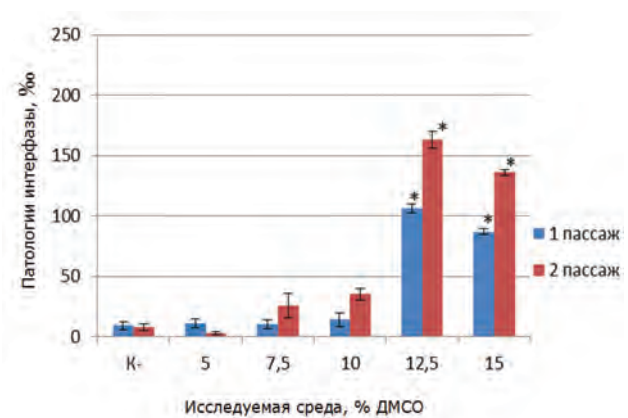


Рис. 3. Относительное число патологий деления в культуре клеток ДП, обработанных ДМСО в сочетании с белковым гидролизатом рыб (БГ), %

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

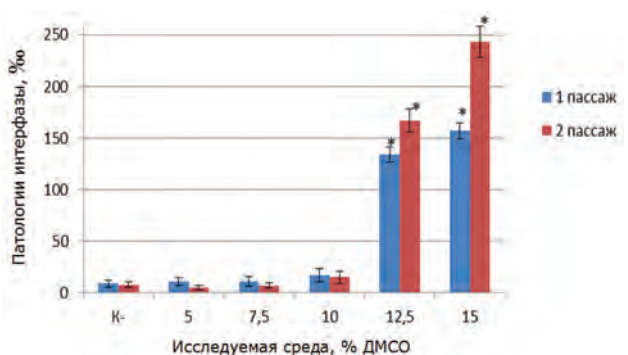


Рис. 4. Относительное число патологий деления в ККДП, ДМСО в сочетании с 5% БСА

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

относятся и клетки с микроядрами, является преждевременная конденсация хромосом, в клетках, в которых не завершился S-период [7].

Добавление белково-протеиновых добавок: 5% белкового гидролизата тканей рыб (молекулярная

масса ≤ 5000 Да) и БСА модулировало воздействие ДМСО. Наиболее значимым эффектом добавок было сохранение жизнеспособности культуры после воздействия высоких – 12,5 и 15% концентраций криопротектора. В то же время, данные культуры содержали значительный пул клеток, несущих патологии. Основными патологиями, встречающимися наиболее часто были клетки с микровезикулами мембраны, полиплоиды, многоядерные клетки и клетки с микроядрами.

При сравнении между собой групп, которым, наряду с ДМСО, вносился БГ и БСА, значимых отличий не выявлено – в обеих группах число патологий резко возрастает при внесении 12,5% и 15% ДМСО. Однако следует отметить тенденцию к более выраженному протекторному эффекту (снижение числа патологий) в группе с применением БГ по сравнению с БСА.

Обсуждение полученных результатов. Диметилсульфоксид (ДМСО, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) представляет собой высокополярное вещество, содержащее сульфинильную группу и две неполярные метильные группы. Такие характеристики обеспечивают амфипатические свойства молекулы. ДМСО способен растворять полярные и неполярные вещества и перестраивать гидрофобные барьеры, такие как плазматическая мембрана [10]. В связи с этим, растворы ДМСО являются гиперосмотическими и способны вызывать дегидратацию при погружении в них клеток. Вакуолизация цитоплазмы – явление, связанное с набуханием структур ЭПС, при массовом развитии патология может приводить к гибели клеток, что и было отмечено при культивировании на 1 пассаже после контакта с концентрациями ДМСО выше 10%. Осмотический стресс, вызванный высокими концентрациями ДМСО, может иметь подобные последствия. Если рассматривать процесс повреждения мембранных структур в более широком интервале времени – часы и сутки – повреждение также может быть вызвано окислительным фосфорилированием липидов мембран и снижением их общего содержания [11]. В ряде работ показано, что в противоположность низким дозам, ДМСО в высоких дозах играет роль про-оксиданта, он значительно усиливает окислительную способность комплексных соединений [12].

Хотя эффекты ДМСО на структуру мембраны и дегидратацию были тщательно изучены, сам механизм влияния ДМСО на липидные мембраны и непосредственная роль воды в этом процессе долго не были понятны. Путем непосредственного исследования трансляционной диффузии воды вблизи неограниченных поверхностей липидных везикул было обнаружено, что ДМСО ослабляет

поверхностную водную сеть вблизи липидной мембраны, снижает адгезию липидов к воде и минимизирует повреждения мембраны, вызванные фазовым переходом [12]. Однако при повышении концентрации обезвоживание усиливается, поскольку вода устремляется из клетки в образовавшееся пространство. В группах, где кроме ДМСО использовались белково-пептидные добавки, подобного явления не наблюдалось. Это объясняется ослаблением обезвоживания клеток (поскольку часть ДМСО взаимодействует с привнесенными пептидами), а также непрямыми защитными воздействиями добавок на мембраны, снижением окислительного фосфорилирования [13]. Более высокую эффективность БГ в снижении числа патологий по сравнению с БСА, можно объяснить тем, что состав гидролизата более гетерогенен и включает биологически активные пептиды [14].

Показано, что механизмом, защищающим клетку от осмотического стресса, является формирование микровезикул на клеточной мембране. Гиперосмотический стресс приводит к разрушению кортикального цитоскелета и отрыву клеточной мембраны от кортикального цитоскелета, вызывая образование клеточных пузырей. Множественные пузырьки снижают внутриклеточное гидростатическое давление, вызванное внеклеточным гиперосмотическим шоком, и ослабляют осмотическое повреждение клеток, что снижает уровень смертности клеток [13]. До определенных концентраций клеточные пузырьки могут эффективно защищать клетку. В данном эксперименте наблюдали начало формирования микровезикул при концентрациях ДМСО 10% - около 8% клеток несли данную патологию, при 12,5 и 15 % - уже 35 и 40% соответственно.

Формирование микровезикул также сопровождается процессом апоптоза – т.н. «вскипание мембраны», данный процесс также имел место в изучаемых культурах. Часть клеток, помимо формирования микровезикул, имели также другие признаки, свидетельствующие об апоптотическом процессе – аномально конденсированный хроматин, пикноз и фрагментация ядра. Таким образом, часть из клеток, имеющих признаки блеббинга, были апоптотическими, особенно это касается второго пассажа, когда осмотического воздействия на клетку уже не происходило. В литературе также имеются данные о способности ДМСО снижать пролиферацию и индуцировать апоптоз в культуре клеток за счет индукции синтеза про-апоптотических белков [10, 13]. На культуре клеток лимфоцитов показано, что 1,5% ДМСО может усилить ингибирование клеточного контакта и обратимо задержать клетки в начале G1 клеточного цикла, вызывая задержку

деления и скорости роста культуры. [114]. На культуре клеток гибридомы мышей показано, что ДМСО влияет на синтез белка р53, модулирует активность про-апоптических киназ и регулирует синтез циклинов [15]. В данной работе установлено, что в культуре ДП кролика происходит полная остановка деления на 2 пассаже, в случае инкубации с ДМСО в концентрациях 12,5-15%.

При концентрациях 10% и выше в сочетании с белково-пептидными добавками, обнаруживалось до 20% клеток, имеющих признаки апоптоза – аномальную конденсацию хроматина, пикноз ядер, формирование микровезикул, и фрагментация клеток.

ДМСО также влияет на цитоскелет на этапе формирования микротрубочек, путем уменьшения эффективной концентрации воды вокруг мономеров тубулина, что способствует образованию центров нуклеации [16]. Вследствие того, что полимеры белка имеют атипичную структуру, они образуют более короткие фибриллы [17]. В связи с этим, кроме описанных эффектов на цитоскелет, важной мишенью воздействия ДМСО на клетку являются центриоли. Изменения фибрилл микротрубочек могут приводить к формированию аномалий метафазной пластинки.

Вероятным последствием нарушений веретена является также формирование микроядер (МЯ), которые регистрировали в культуре. Следует проводить различие между разными типами МЯ, поскольку механизмы, ведущие к их формированию различны. МЯ формируются по двум основным механизмам – из отстающих ацентрических фрагментов, при разрыве хромосом – МЯ «стандартного» типа – значительно меньше по размеру чем основное. Наибольшее количество подобных ядер было зафиксировано в вариантах с введением концентраций 10% более ДМСО без белково-пептидных добавок. Второй вариант – МЯ «основного» типа, одинакового размера – следствие формирования многополюсного веретена деления, отставания групп хромосом или отсутствия цитокенеза. Наибольшее количество ядер этого типа встречалось в культурах, прошедших экспозицию с высокими дозами ДМСО в сочетании с 5% БГ.

Следствием нарушения веретена деления является формирование полиплоидных клеток, доля которых значительно возросла и достигала 20% при высоких концентрациях ДМСО. В случае дальнейшего деления полиплоидных клеток, при нормальном протекании процессов дупликации, происходит накопление полиплоидов в культуре и

многоядерных клеток, что и наблюдалось на втором пассаже. Многополюсность веретена приводит к нарушению сегрегации хромосом и возникают анеуплоидные клетки. Анеуплоидия может вести к отсутствию пунктов контроля пролиферации и нарушению механизмов гибели клеток. Клоны потомков таких клеток могут служить основой для трансформации клеток и роста опухолей [18, 19].

Таким образом, белково-пептидные добавки способны оказывать протекторное действие на фоне высоких концентраций ДМСО. Их компоненты, вероятно, снимают блок клеточного цикла в критических точках митоза и фазы G1, что способствует сохранению жизнеспособности клеток, однако ведет к накоплению аномалий.

Выводы

1. Инкубация в криозащитной среде, содержащей ДМСО в концентрациях, превышающих 10%, приводит к дозозависимому возрастанию патологий клеток в культуре клеток ДП кролика в процессе ее дальнейшего культивирования. Для оптимального сохранения жизнеспособности и минимизации токсических воздействий рекомендовано для криоконсервирования клеток ДП среды с содержанием ДМСО не выше 7,5%.
2. Патологии, вызываемые воздействием ДМСО на культуру клеток ДП, не элиминируются в процессе культивирования, а сохраняются на 2 пассаже после инкубации в криозащитной среде.
3. Среди патологий, вызванных воздействием ДМСО, возникали нарушения, связанные с дефектами мембран и цитоскелета - вакуолизация цитоплазмы, формирование микровезикул на мембране. А также нарушения, затрагивающие генетический и белок-синтезирующий аппарат: полиплоиды, многоядерные клетки, с ядрами аномальной формы, с микроядрами, клетки на различных терминальных стадиях апоптоза.
4. Белково-пептидные добавки способны проявлять протекторное действие на фоне высоких концентраций ДМСО, что способствует сохранению жизнеспособности клеток, однако ведет к накоплению аномалий в культуре в процессе дальнейшего культивирования.

Перспективы дальнейших исследований.

Результаты исследований указывают на возникновение структурных нарушений в культурах ДП, криоконсервированных по стандартным методам, исходя из чего следует необходимость коррекции протоколов криоконсервирования, особенно для применения в клинической практике. Следующим этапом исследования станет изучение патологий деления и интерфазы в культурах ДП с применением новых подходов к криоконсервированию.

References

1. Yuan C, Gao J, Guo Bai J, Marshall L, Cai Z, Wang L, et al. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. PLoS One. 2014; 9(9): e107447. PMID: 25238609. PMCID: PMC4169574. DOI: 10.1371/journal.pone.0107447

2. Wang H, Scott RE. Inhibition of distinct steps in the adipocyte differentiation pathway in 3T3 T mesenchymal stem cells by dimethyl sulphoxide (DMSO). *Cell Prolif.* 1993; 26: 55–66. PMID: 8439589. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1993.tb00006.x
3. Zemlianskykh NG. Effect of substances with cryoprotective properties on surface marker CD44 in human erythrocytes. *Tsitol Genet.* 2016; 50(3): 66–79. PMID: 30480411. DOI: 10.3103/S0095452716030117
4. Yazici I, Molski M, Siemionow MZ. Cryopreservation in Plastic Surgery. Our Experience and Review of the Literature. *Experimental Models and Research Designs.* London. Springer; 2015. p. 255-64. DOI: 10.1007/978-1-4471-6335-0_32
5. Kajiura S, Mii S, Aki R, Hamada Yu, 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. PMID: 25743086. PMCID: PMC4523096. DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0500
6. Cao W, Li L, Tran B, Kajiura S, Amoh Y, Liu F, et al. Extensive Hair Shaft Growth after Mouse Whisker Follicle Isolation, Cryopreservation and Transplantation in Nude Mice. *PLoS One.* 2015; 10(12): e0145997. PMID: 26716690. PMCID: PMC4696652. DOI: 10.1371/journal.pone.0145997
7. Kajiura S, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. Protocols for Cryopreservation of Intact Hair Follicle That Maintain Pluripotency of Nestin-Expressing Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2016; 1453: 173–8. PMID: 27431257. DOI: 10.1007/978-1-4939-3786-8_18
8. Hill RP, Gledhill K, Gardner A, Higgins CA, Crawford H, Lawrence C, et al. Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. *PLoS One.* 2012; 7(11): e50742. PMID: 23226372. PMCID: PMC3511366. DOI: 10.1371/journal.pone.0050742
9. Rajaraman R, Guernsey DL, Rajaraman MM, Rajaraman SR. Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer. *Cancer Cell Int.* 2006; 6: 21–5. PMID: 17092342. PMCID: PMC1664585. DOI.ORG/10.1186/1475-2867-6-25
10. Dlodla PV, Jack B, Viraragavan A, Pheiffer C, Johnson R, Louw J, et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocyte. *Toxicology Reports.* 2018; 5: 1014–20. PMID: 30364542. PMCID: PMC6197677. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.10.002
11. Song YM, Song SO, Jung YK, Kang ES, Cha BS, Lee HC, et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. *Autophagy.* 2012; 8: 1085–97. PMID: 22722716. PMCID: PMC3429545. DOI: 10.4161/auto.20260
12. Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J Am Chem Soc.* 2006; 128(43): 13982–3. PMID: 17061853. DOI: 10.1021/ja063363t
13. Cheng CY, Song J, Pas J, Meijer LH, Han S. DMSO induces dehydration near lipid membrane surfaces. *Biophys J.* 2015; 109(2): 330–9. PMID: 26200868. PMCID: PMC4621616. doi:10.1016/j.bpj.2015.06.011
14. Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides.* 2012; 33(1): 178-85. PMID: 22138166. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.11.013
15. Ruan R, Zou L, Sun S, Liu J, Wen L, Gao D, et al. Cell blebbing upon addition of cryoprotectants: a self-protection mechanism. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0125746. PMID: 25875076. PMCID: PMC4395349. DOI: 10.1371/journal.pone.0125746
16. De Abreu Costa L, Henrique Fernandes Ottoni M, Dos Santos MG, Meireles AB, Gomes de Almeida V, de Fátima Pereira W, et al. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules.* 2017; 22(1): E1789. PMID: 29125561. PMCID: PMC6150313. DOI: 10.3390/molecules22111789
17. Finkenstaedt-Quinn SA, Ge S, Haynes CL. Cytoskeleton dynamics in drug-treated platelets. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(10): 2803–9. PMID: 25701419. PMCID: PMC4370791. DOI: 10.1007/s00216-015-8523-7
18. Castedo M, Perfettini JL, Medema J P, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004; 23: 2825–37. PMID: 15077146. DOI: 10.1038/sj.onc.1207528
19. Na J, Baker D, Zhang J, Andrews PW, Barbaric I. Aneuploidy in pluripotent stem cells and implications for cancerous transformation. *Protein Cell.* 2014; 5: 569–79. PMID: 24899134. PMCID: PMC4130921. DOI: 10.1007/s13238-014-0073-9

УДК 576.356.3

**ЦИТОМОРФОЛОГІЧНІ ПОРУШЕННЯ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН
ДЕРМАЛЬНОЇ ПАПИЛИ КРОЛИКА ПІСЛЯ ІНКУБАЦІЇ
З ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ**

Новікова О. Ю., Бондаренко Т. П.

Резюме. У більшості сучасних протоколів кріоконсервування клітин ссавців застосовуються кріозахи-
сні розчини на основі диметилсульфоксида. У зв'язку з цим потребує вивчення вплив диметилсульфокси-
да на якість культур після взаємодії з ним і кріоконсервування. Дермальна папіла вібрис є джерелом плю-
рипотентних клітин - похідних нервового гребеня. У зв'язку з плюрипотентністю, даний тип клітин пред-
ставляє цікавість для трансплантації, що пов'язано з необхідністю їх довгострокового культивування та

зберігання. У даній роботі вивчені патологічні зміни в клітинах диплоїдної культури дермальної папіли вібриси кролика, які виникають в інтерфазі і зберігаються протягом 2 пасажів після експозиції з кріозахисними середовищами на основі різних концентрацій диметилсульфоксиду. Встановлено, що інкубація в кріозахисному середовищі, що містить 5 і 7,5% кріопротектора, є безпечною з точки зору індукції цитологічних порушень. Диметилсульфоксид в концентраціях, що перевищують 10%, призводить до дозозалежного зростання патологій клітин. Серед патологій найчастіше виникали порушення, пов'язані з дефектами мембран і цитоскелету – вакуолізація цитоплазми, формування мікровезикул на мембрані. А також порушення, що зачіпають генетичний і білок-синтезуючий апарат: поліплоїдні, багатоядерні клітини, клітини з ядрами аномальної форми, з мікроядрами, на різних термінальних стадіях апоптозу. На основі порівняння культур 1 і 2-го пасажів після впливу диметилсульфоксиду встановлено, що виявлені порушення не елімінуються в процесі культивування, а зберігаються і накопичуються. Показано, що білково-пептидні добавки здатні чинити протекторну дію на тлі високих концентрацій диметилсульфоксиду, що сприяє збереженню життєздатності клітин, однак веде до накопичення аномалій в культурі при подальшому культивуванні.

Ключові слова: дермальна папіла, мітоз, патологія поділу, диметилсульфоксид, кріоконсервування.

UDC 576.356.3

Cytomorphological Disorders in the Cell Culture of Rabbit Dermal Papilla after Incubation with Dimethylsulphoxide

Novikova O. Yu., Bondarenko T. P.

Abstract. Most of modern mammalian cell cryopreservation protocols use dimethyl sulfoxide solutions as cryoprotectant. That is why we studied the effect of dimethyl sulfoxide on cell culture quality after interaction and cryopreservation. Dermal papilla vibrissa is a source of pluripotent cells neural crest derivatives. Because of pluripotency this type of cell is of interest for transplantation, which is associated with the need for their long-term cultivation and storage. In this work, we studied the pathological changes in the cells of the diploid culture of the dermal papilla of the rabbit vibrissa that occur at the interphase and persist for 2 passages after exposure with cryoprotective media based on different concentrations of dimethyl sulfoxide.

Material and methods. The cell culture of dermal papilla was obtained by the method of explants from hair follicles of vibrissa of newborn rabbits. Passaging of received adhesive cultures was performed every 7-10 days. Contact with dimethyl sulfoxide was performed for 20 minutes, after which the cells were placed in standard culture medium for further growth. The calculation of interphase pathologies was carried out on fixed cytological preparations stained with hematoxylin-eosin.

Results and discussion. The incubation in a cryoprotective medium containing 5 and 7.5% was safe from the point of view of inducing cytological disorders. Dimethyl sulfoxide in concentrations exceeding 10% led to a dose-dependent increase in cell pathologies. Among the pathologies, violations most often occurred in the association with defects in membranes and the cytoskeleton such as vacuolization of the cytoplasm, the formation of microvesicles on the membrane. There were also disorders affecting the genetic and protein-synthesizing apparatus: polyploid, multinucleated cells, cells with abnormal nuclei, with micronuclei, at various terminal stages of apoptosis. Based on a comparison of cultures at passages 1 and 2 after exposure to dimethyl sulfoxide, it was found that the detected violations were not eliminated during cultivation, but were stored and accumulated.

Conclusion. The study showed that protein-peptide additives were capable of exerting a protective effect on the background of high concentrations of dimethyl sulfoxide, which contributed to the preservation of cell viability, but led to the accumulation of anomalies in the culture during further cultivation.

Keywords: dermal papilla, mitosis, pathology of division, dimethyl sulfoxide, cryopreservation.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 17.10.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування