

Влияние высокомолекулярных соединений на жизнеспособность и функциональную активность клеток эмбриональной печени человека до и после криоконсервирования

Ю.А. ПЕТРЕНКО, Н.А. ГОРОХОВА, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В настоящее время для криоконсервирования клеток эмбриональной печени человека используется медленное 2-х или 3-х ступенчатое замораживание в среде, содержащей ДМСО в концентрациях 5-10% [1]. Использование ДМСО в составе криозащитной среды с одной стороны, позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность клеток, но с другой, ДМСО обладает выраженной токсичностью, что приводит к повреждению части клеток на этапе эквilibрации и требует его отмывки перед трансплантацией. Поэтому для усовершенствования метода криоконсервирования необходимо снизить концентрацию ДМСО.

Известно, что механизм криозащиты высокомолекулярных веществ отличается от механизма проникающих криопротекторов [2]. Следовательно, применение смеси проникающего и непроникающего криопротекторов даст возможность реализовать оба механизма защиты, уменьшить концентрации используемых криопротекторов и оказаться, таким образом, более эффективным для криоконсервирования биообъектов. Известные попытки применения комбинированных криопротекторов позволили достигнуть положительных результатов при криоконсервировании различных типов клеток [3].

В данной работе проведена сравнительная оценка влияния различных высокомолекулярных непроникающих соединений на сохранность, метаболическую и колониюобразующую активность КЭП человека. Выбор высокомолекулярных соединений был обусловлен имеющимися литературными данными об их позитивном влиянии на клетки в процессе криоконсервирования [4].

Материалы и методы

Выделение и криоконсервирование КЭП человека. Эмбриональную печень человека получали от абортусов 7-10 недель гестации после искусственного прерывания беременности и письменного согласия доноров. Суспензию клеток эмбриональной печени получали неферментативным методом, после чего к суспензии клеток по каплям добавля-

ли равные объемы различных криозащитных сред, приготовленных в двойной концентрации. Конечная концентрация клеток составляла 1×10^6 клеток/мл. В качестве криозащитных сред использовали ДМСО (2%, 5%, 10%) и высокомолекулярные соединения: декстран ($M_m=100000$), эмбриональная сыворотка теленка (ЭСТ), сахароза и ПЭО ($M_m=400, 1500, 3500, 8000$) в концентрациях 10%. Программное замора-живание производили в три этапа: до температуры -40°C со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, затем до -80°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$, после чего образцы погружали в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при температуре $\sim 40^\circ\text{C}$.

Деконсервированные суспензии КЭП отмывали от криозащитной среды центрифугированием при 200g 10 мин в среде Дюльбекко (Sigma, США) в присутствии 10% ЭСТ (Биолот, Москва).

Определение сохранности и выхода жизнеспособных КЭП человека. Сохранность КЭП до и после криоконсервирования определялась по окрашиванию витальным красителем трипановым синим согласно стандартному методу. Выход жизнеспособных клеток (ВЖК) определяли по формуле, описанной в работе [5].

Определение метаболической активности КЭП человека. Метаболическую активность КЭП человека определяли по восстановлению окислительно-восстановительного индикатора Alamar Blue (AB). Восстановление AB определялось согласно методике, подробно описанной ранее в работе [6]. Восстановленную форму AB определяли флуориметрически на спектрофлуориметре Tecan GENios (Австралия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Обработка данных проводилась с помощью программы XFLUOR4 v.4.50. Результаты представляли как разность между флуоресценцией опытной и холостой пробы (без клеток) и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ).

Колониеобразующая активность КЭП человека. Колониеобразующую активность кроветворных клеток-предшественников эмбриональной печени человека определяли при культивировании клеток в полутвердой метилцеллюлозной среде. Культивирование суспензии КЭП человека проводилось в среде MethoCult H4434 (Stem cell technologies, Канада), согласно указаниям производителя.

Адрес для корреспонденции: Петренко А.Ю., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 374-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Подсчёт количества и типа колоний (БОЕ-Э, КОЕ-Э, КОЕ-М, КОЕ-Г, КОЕ-ГМ и КОЕ-ГЭММ) проводился на 14-е сутки культивирования. Тип колоний определялся по внешнему виду.

Статистическая обработка данных. Для оценки достоверности различий между различными группами данных использовали t-критерий Стьюдента, считая достоверными различия с показателем значимости $p < 0,05$. Оценка проводилась с использованием программы Origin v. 6.1.

Результаты и обсуждение

Влияние высокомолекулярных соединений на сохранность и выход жизнеспособных КЭП человека. Скрининг различных высокомолекулярных соединений показал положительное влияние ЭСТ, сахарозы и полиэтиленоксидов различной молекулярной массы на сохранность и выход жизнеспособных клеток эмбриональной печени человека. В свою очередь, несмотря на наличие ряда работ, в которых описано позитивное влияние декстрана при криоконсервировании различных типов клеток, в данной работе применение декстранов с молекулярной массой 100000 не улучшило показатели ни сохранности, ни выхода жизнеспособных клеток эмбриональной печени человека после криоконсервирования с использованием любых концентраций ДМСО. В то же время полиэтиленоксиды с различными молекулярными массами сами по себе обладают криозащитными свойствами. Их использование позволило исключить эмбриональную сыворотку из среды криоконсервирования, а также значительно снизить концентрацию ДМСО. Было замечено улучшение показателей как сохранности, так и выхода жизнеспособных КЭП при увеличении молекулярной массы ПЭО. Так, эффективность криозащиты различных ПЭО можно схематически расположить следующим образом: ПЭО-400 < ПЭО-1500 < ПЭО-3500 < ПЭО-8000. Наиболее эффективным криопротектором из исследуемых полиолов оказался ПЭО-8000. Среди высокомолекулярных соединений, не относящихся к полимерам, наилучших показателей сохранности и ВЖК удалось добиться с использованием 10% сахарозы. Сохранность и выход жизнеспособных клеток, криоконсервированных с использованием комбинации сахарозы и 5% ДМСО ($61 \pm 4\%$ и $44 \pm 2\%$), достоверно не отличались от показателей с использованием 10% ДМСО без сахарозы ($65 \pm 1\%$ и $49 \pm 3\%$). Таким образом, для дальнейших исследований были выбраны среды, содержащие 2 или 5% ДМСО, дополненные ПЭО-8000 или сахарозой.

При исследовании влияния различных концентраций ПЭО-8000 на сохранность и выход

жизнеспособных КЭП человека после криоконсервирования наилучших показателей удалось добиться с использованием 6% ПЭО-8000. Даже при нулевой концентрации ДМСО показатели полученные с использованием ПЭО-8000, достоверно не отличались от 10% ДМСО без полимера. При повышении концентрации ДМСО до 2% показатели сохранности и ВЖК составляли $78 \pm 4\%$ и $63 \pm 11\%$ соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации ДМСО не приводило к улучшению показателей ни сохранности, ни ВЖК. Наиболее близкие показатели сохранности и ВЖК были получены с использованием комбинации 2 или 5% ДМСО и 6% ПЭО-8000.

В табл. 1 приведена оценка влияния различных концентраций сахарозы на сохранность и выход жизнеспособных КЭП человека после криоконсервирования. Как и ранее, показатели ВЖК были значительно ниже сохранности. Это обусловлено потерей клеток при криоконсервировании и отмывке криопротектора.

Из табл. 1 видно, что добавление различных концентраций сахарозы в криозащитные растворы, содержащие 2% ДМСО, приводило к увеличению показателей как сохранности, так и ВЖК. Максимальных показателей удалось добиться с использованием 0,3 М сахарозы. Увеличение концентрации ДМСО до 5% не приводило к достоверному улучшению сохранности клеток, однако способствовало лучшему выходу жизнеспособных клеток. При использовании комбинации 0,3 М сахарозы и 5% ДМСО, ВЖК увеличивался почти в 2 раза по сравнению с образцами без сахарозы.

Метаболическая активность КЭП человека после криоконсервирования в средах, содержащих ПЭО-8000 или сахарозу. Уровень восстановления АВ свежевыделенными клетками эмбриональной печени человека составлял

Таблица 1. Влияние различных концентраций сахарозы на сохранность и выход жизнеспособных КЭП человека после криоконсервирования

Концентрация сахарозы	Сохранность, %		ВЖК, %	
	Концентрация ДМСО, %		Концентрация ДМСО, %	
	2	5	2	5
Нет	33 ± 2	52 ± 3	9 ± 1	24 ± 3
0,05M	45 ± 7	59 ± 5	17 ± 4	35 ± 3
0,1M	48 ± 7	59 ± 4	25 ± 3	40 ± 5
0,2M	53 ± 5	60 ± 4	29 ± 3	40 ± 4
0,3 M	58 ± 3	61 ± 4	36 ± 3	44 ± 2

20794±252 УЕФ/лунку. Криоконсервирование под защитой 5% ДМСО приводило к более чем двукратному снижению данного показателя и составляло 9151±989 УЕФ/лунку. Добавление ПЭО-8000 в концентрации 6% в среду криоконсервирования, содержащую 5% ДМСО, приводило к достоверному увеличению показателей восстановления АВ до 13381±1266 УЕФ/лунку. Кроме того, при использовании композиции, состоящей из 2% ДМСО и 6% ПЭО-8000 удалось добиться показателей флуоресценции, достоверно не отличающихся от 5% ДМСО без полимера (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что на фоне общего падения показателей восстановления АВ КЭП человека после криоконсервирования включение 0,3М сахарозы уже при 2% ДМСО приводило к достоверному повышению данных показателей на 35% по отношению к 5% ДМСО без сахарозы (13915±848 против 9151±989 УЕФ/лунку). Кроме того, данные показатели были достоверно выше, нежели с использованием 6% раствора ПЭО-8000. При увеличении концентрации ДМСО до 5% в среде, содержащей 0,3 М сахарозы, показатели восстановления АВ достоверно увеличивались еще на 15% (16590±205 УЕФ/лунку) по сравнению с 2% ДМСО. В то же время уровень восстановления АВ клетками, криоконсервированными в данных условиях, отличался от показателей восстановления АВ клетками до криоконсервирования всего на 20%.

Использование 10% эмбриональной сыворотки теленка в качестве добавки в среду криоконсервирования, содержащую 5% ДМСО, приводило к почти двукратному увеличению показателей восстановления АВ и составляло 15193 ± 1194 УЕФ/лунку. В то же время введение ЭТС в среды, содержащие как ПЭО-8000, так и сахарозу, не приводило к достоверным изменениям уровня восстановления АВ.

Таким образом, использование сред криоконсервирования, состоящих из 5% ДМСО, дополненных 6% ПЭО-8000 или 0,3М сахарозы, позволяет получить высокую сохранность, сопровождающуюся меньшей потерей клеток в процессе криоконсервирования. Кроме того, клетки, криоконсервированные с использованием данных комбинаций криопротекторов, в большей степени сохраняли свою метаболическую активность, нежели клетки, криоконсервированные под защитой ДМСО без добавок.

Колониеобразующая активность КЭП человека после криоконсервирования в средах, содержащих ПЭО-8000 или сахарозу. Для изучения влияния криоконсервирования в комбинированных криозащитных средах на функцио-

Таблица 2. Влияние ПЭО-8000 и сахарозы на восстановление Alamar Blue клетками эмбриональной печени человека после криоконсервирования

Раствор	УЕФ/лунку	
	2% ДМСО	5% ДМСО
Нет добавок	—	9151±989
6% ПЭО—8000	8835±1191	13381±1266
0,3М сахароза	13915±848	16590±205

нальную активность кроветворных клеток-предшественников эмбриональной печени человека, оценивалась их колониеобразующая активность. Для этого, клетки до и после криоконсервирования культивировались в полутвердых метилцеллюлозных средах в течение 14 суток.

По истечении 14 суток культивирования наблюдалось образование 6 типов колоний, различающихся по своей морфологии (табл. 3). Так, общее число колоний, образовавшихся при культивировании свежевыделенной суспензии КЭП человека, составляло 438±54. Из них около 70% составляли ранние колонии миелоидно-эритроидного типа – КОЕ-ГЭММ (115±13), эритроидные колонии – БОЕ-Э (114±23) и гранулоцитарно-макрофагальные колонии – КОЕ-ГМ (90 ± 16). Криоконсервирование под защитой 5% ДМСО приводило к падению общего количества образовавшихся колоний в 2 раза (230±60). Вместе с тем процентное соотношение типов колоний в культуре осталось схожим (табл. 3). При криоконсервировании КЭП человека в среде, содержащей 0,3М сахарозы, общее количество образовавшихся колоний составляло 284±36 колоний. Процентное соотношение типов колоний, образовавшийся в результате культивирования в полутвердых средах, достоверно не отличалось от свежевыделенных клеток. Можно предположить, что используемые протоколы криоконсервирования в равной степени влияют на различные популяции кроветворных клеток-предшественников эмбриональной печени человека, независимо от степени их коммитированности.

В течение 14 суток культивирования КЭП человека, криоконсервированных под защитой 5% ДМСО и 6% ПЭО-8000, образования миелоидных и/или эритроидных колоний не наблюдалось. На 16-е сутки культивирования наблюдались зачатки колоний – клоны, состоящие из нескольких клеток, не отличающиеся по своей морфологии друг от друга. Наличие данных клонов наблюдалось до 20 суток культивирования, после чего колонии деградировали. Это может быть обусловлено

Таблица 3. Влияние криоконсервирования в средах, содержащих ПЭО-8000 и сахарозу на колониеобразующую активность КЭП человека.

Вариант обработки	Тип колонии						
	КОЕ-Э	БОЕ-Э	КОЕ-ГМ	КОЕ-Г	КОЕ-М	КОЕ-ГЭММ	Всего
Свежевыделенные КЭП	30±7	114±23	90±16	46±14	46±7	115±13	438±54
5% ДМСО	10±9	63±14	52±12	36±11	17±5	52±16	230±60
5% ДМСО + 0,3М сахарозы	11±6	78±18	64±9	40±18	24±5	68±23	284±36

обеднением среды культивирования за счет разрушения ростовых факторов и цитокинов, входящих в состав среды и необходимых для полноценного развития колоний. Причиной тому, что клетки после криоконсервирования начинали образовывать колонии со значительной задержкой (более 14 суток), может служить специфическое действие высокомолекулярного ПЭО-8000 на липидный бислой клеток. Ранее было показано [1], что высокомолекулярные полиэтиленгликоли образуют гидрационную оболочку вокруг клеток, защищая тем самым бислой от внешних воздействий и увеличивая время циркуляции клеток в кровяном русле. Обработка эритроцитов высокомолекулярным ПЭО приводила к снижению аллореактивности клеток при трансплантации за счет маскировки поверхностных гликопротеинов на клеточных мембранах [2]. Кроме того, было показано временное блокирование клеточного цикла на G0/G1 фазе при обработке ПЭО не полностью дифференцированных клеточных линий аденокарциномы [3]. Таким образом, можно предположить, что использование ПЭО-8000 для криоконсервирования КЭП человека может, с одной стороны, позволить получить высокое количество жизнеспособных клеток, а с другой, увеличить время циркуляции клеток в кровяном русле после аллотрансплантации, не вызывая реактивности иммунокомпетентных клеток реципиента. Однако данное предположение требует дальнейшего изучения на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Выводы

1. Введение 0,3М сахарозы в среду криоконсервирования, содержащую 5% ДМСО, позитивно влияет на сохранность и выход жизнеспособных КЭП человека при криоконсервировании. Кроме того, наличие сахарозы в среде, содержащей 5% ДМСО, приводит к улучшению

метаболической и колониеобразующей активности клеток после криоконсервирования по сравнению с образцами, криоконсервированными при ее отсутствии.

2. Использование высокомолекулярного ПЭО (Mn=8000) позволяет получить высокие показатели сохранности, ВЖК и метаболической активности КЭП человека после криоконсервирования, достоверно отличающиеся от клеток, криоконсервированных под защитой 5% ДМСО без добавок.

3. При культивировании КЭП человека, криоконсервированных в присутствии ПЭО-8000 в полутвердых метилцеллюлозных средах, наблюдается значительная задержка в формировании колоний, что может свидетельствовать о перспективности использования ПЭО для регуляции пролиферации стволовых кроветворных клеток.

Литература

1. *Anderson E.M., Jones D.R.E., Liu D.T.Y., Evans A.A.* Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // *Fetal Diagn. & Ther.*– 1996.– Vol. 11.– P. 427-432.
2. *Takahashi T., Hirsch A., Erbe E., Williams R.J.* Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes // *Biophys. J.*– 1988.– Vol. 54, N3.– P. 509-518.
3. *Limaye L.S., Kale V.P.* Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bio-antioxidants as additives in the conventional freeezing medium // *J. Hematother. Stem Cell Res.*– 2001.– Vol. 10.– P. 709-718.
4. *Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al.* In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 35, N2.– P. 173-186.
5. *Petrenko Yu.A.* Cryopreservation of human embryonic liver cells using DMSO and high molecular weight polymers // *Problems of Cryobiology.*– 2003.– N3.– P. 80-87.
6. *O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // *Eur. J. Biochem.*– 2000.– Vol. 267.– P. 5421-5426.

7. *Harris J. M., Martin N.E., Modi M.* Pegylation. A novel process for modifying pharmacokinetics // *Clin. Pharmacokinet.*—2001.—Vol.40, N7.— P. 539-551.
8. *Blackall D.P., Armstrong J.K., Meiselman H.J., Fisher T.C.* Polyethylene glycol-coated red blood cells fail to bind glycophorin A-specific antibodies and are impervious to invasion by the falciparum malaria parasite // *Blood.*— 2001.— Vol.97, N2.— P. 551-556.
9. *Parnaud G., Corpet D.E., Gamet-Payraastre L.* Cytostatic effect of polyethylene glycol on human colonic adenocarcinoma cells // *Int. J. Cancer.*— 2001.— Vol. 92, N1.— P. 63-69.