

Криочувствительность гемопоэтических и стромальных предшественников в первичной суспензии клеток эмбриональной печени человека

Н.Г. СКОРОБОГАТОВА, Н.А. ВОЛКОВА, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Криоконсервирование клеточных суспензий как технология, позволяющая сохранять клетки продолжительное время без утраты их функциональных свойств, необходимый этап в любых исследованиях как в системе *in vitro*, так и *in vivo*. Однако различные клеточные типы обладают индивидуальной чувствительностью к повреждающему действию факторов низкотемпературного консервирования и требуют в каждом случае разработки специальных подходов. Особую трудность представляет работа с гетерогенными первичными суспензиями недифференцированных клеток, полученными из эмбриональных тканей. Изучение криочувствительности клеток-предшественников ранних стадий онтогенетического развития необходимо для оптимизации протокола криоконсервирования и создания низкотемпературного банка данных клеток.

В настоящей работе исследовано влияние отдельных стадий процесса криоконсервирования на сохранность и функциональную активность гемопоэтических и стромальных предшественников в первичной суспензии клеток эмбриональной печени человека (КЭПЧ). Составы сред и режимы криоконсервирования КЭПЧ, описанные в работах [1, 15], постоянно совершенствуются для достижения высокой степени сохранности данных клеток. В качестве криопротектора для стволовых кроветворных клеток и клеток-предшественников стромального ряда традиционно используется диметилсульфоксид (ДМСО) [1, 7, 11, 14, 15]. Однако вопрос о токсичности ДМСО в концентрациях (5-10%), обеспечивающих криозащитный эффект, изучен недостаточно. В связи с этим задачей данной работы было исследование влияния контакта клеток с ДМСО и удаления криопротектора из размороженной суспензии на жизнеспособность и функциональную активность гемопоэтических и стромальных предшественников эмбриональной печени человека.

Эмбриональную печень получали после искусственного прерывания беременности и согласия пациентов. Биологический материал транспортировали в стерильных флаконах на льду.

Адрес для корреспонденции: Скоробогатова Н.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Первичную суспензию получали неферментативным методом [3]. В эксперименте исследовали свежевыделенные КЭПЧ, клетки после экспозиции с 5%-м раствором ДМСО и деконсервированные КЭПЧ. Время контакта свежевыделенных КЭПЧ с раствором ДМСО составляло 30 мин при температуре 4°C. Замораживание клеточных суспензий проводили в криопробирках «Nunc» по 3-х этапной программе, разработанной для гемопоэтических КЭПЧ [5]: первый этап – скорость 1°C/мин до температуры –40°C, второй этап – скорость 10°C/мин до –80°C и третий этап – быстрое погружение в жидкий азот с последующим хранением замороженных образцов не менее месяца. Отогрев осуществляли на водяной бане при 37°C. Криопротектор удаляли путем медленного капельного добавления среды отмывания (СО) в течение 10-15 мин через инъекционную иглу диаметром 0,8 мм при постоянном перемешивании в объемном соотношении 1:5. После центрифугирования (200 g в течение 5 мин) осадок ресуспендировали в 1 мл СО. Длительность процедуры отмывания от криопротектора составляла в среднем 20 мин. В качестве СО использовали сахарозо-солевой раствор (ССР), разработанный для гипотермического хранения и криоконсервирования гепатоцитов [12].

Общее количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по прижизненному окрашиванию трипановым синим [13] и бромистым этидием [8].

Анализ полученных результатов проводили по формулам [6]:

$$СК = (a/b) \times 100\%$$

$$ВЖК = (c/b) \times 100\%$$

$$ЖС = (c/a) \times 100\%$$

где СК – сохранность клеток; ВЖК – выход жизнеспособных клеток, ЖС – жизнеспособность (а – общее количество клеток после воздействия; б – общее количество клеток до воздействия; с – количество живых клеток после воздействия).

Адгезивность КЭПЧ оценивали по их прикреплению к культуральному пластику в течение 1 и 18 ч при эксплантации 1×10^5 клеток/см² в среде аМЕМ, дополненной 5%-й эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, 100%-я влажность).

Эффективность прикрепления (ЭП) клеток определяли по формуле [9]:

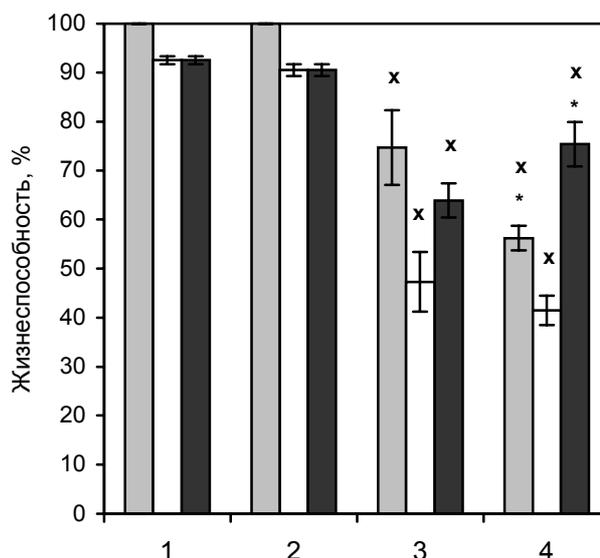
$$\text{ЭП} = [(e-v)/e] \times 100\%,$$

где e – количество эксплантированных клеток, v – количество неприкрепившихся клеток.

Культивирование стромальных клеток-предшественников в условиях монослоя проводили по методу [10]. Прижизненное наблюдение за культивируемыми клетками осуществляли ежедневно с помощью инвертированного микроскопа. На 15-е сутки культуры фиксировали этанолом и окрашивали гематоксилином Эрлиха. Эффективность колониеобразования (ЭКО) оценивали по количеству колоний на 10^5 посеянных живых клеток и выражали в процентах [9]. Для статистического анализа результатов использовали непараметрический метод – критерий Уилкоксона для однородных пар. Результаты представлены как $M \pm m$.

Свежеизолированные КЭПЧ ($n=6$) имели жизнеспособность $92,5 \pm 0,8\%$. Кратковременный контакт КЭПЧ на холоде с 5%-м раствором ДМСО, приготовленном на основе ССР, не приводил к потере общего количества клеток и изменению устойчивости их мембран к прижизненному окрашиванию трипановым синим или бромистым этидием. Для оценки влияния замораживания-отогрева и процесса удаления криопротектора ДМСО из размороженной суспензии на сохранность и жизнеспособность исследуемых клеток аликвоты суспензий от тех же образцов эмбриональной печени были заморожены по указанной программе. После отогрева суспензий КЭПЧ, криоконсервированных под защитой 5%-го ДМСО в ССР, установлено, что жизнеспособность клеток составила $63,9 \pm 3,5\%$, общее количество клеток снизилось в среднем на 25%, а также определено достоверное снижение выхода жизнеспособных клеток. После удаления криопротектора отмечена потеря общего количества клеток, преимущественно за счет клеток с поврежденными плазматическими мембранами, выявленная по увеличению ЖС на фоне сохранения уровня ВЖК (рисунок). Необходимо отметить, при экспресс-оценке жизнеспособности КЭПЧ по указанным методам были получены схожие результаты (данные не приведены).

Известно, что методы прижизненного окрашивания позволяют оценить состояние плазматической мембраны клеток, но не их функцию. Специфическим интегральным показателем функциональной активности гемопоэтических клеток-предшественников является колониеобразование *in vitro*. В связи с этим ранее исследовали колониеобразующую активность



Влияние отдельных стадий процесса криоконсервирования на сохранность СК (□), ВЖК (▒) и ЖС КЭПЧ (■): 1 – натив (контроль); 2 – клетки после контакта с криопротектором ДМСО (5%); 3 – клетки после замораживания-отогрева; 4 – размороженные клетки после отмывания от криопротектора; x – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими контрольными значениями; * – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой

свежевыделенных, а также криоконсервированных КЭПЧ до и после удаления ДМСО [4]. Было установлено, что в условиях культивирования в полутвердой агаровой среде с нижним фидерным слоем, содержащим лейкоциты из периферической крови здоровых взрослых доноров, суммарное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на 10^5 посаженных жизнеспособных клеток составило 231 ± 27 – у свежевыделенных КЭПЧ, 315 ± 93 – у размороженных клеток до отмывания от криопротектора и 275 ± 45 – у размороженных, отмываемых клеток. Достоверных различий между исследуемыми группами клеток выявлено не было ($p > 0,05$). Полученные результаты свидетельствовали о том, что колониеобразующая активность криоконсервированных гемопоэтических КЭПЧ достоверно не снижалась после отогрева и удаления криопротектора по сравнению с нативным контролем и опытной группой без отмывания от ДМСО.

В данной работе установлено достоверное снижение всех показателей (СК, ВЖК и ЖС) исследуемых клеток непосредственно после отогрева, то есть до начала отмывания деконсервированных клеток. Следовательно, гибель клеток происходит, в основном, на низкотемпературных этапах криоконсервирования и при отогреве. Сравнительный анализ показателей сохранности и результатов культивирования КЭПЧ показал, что на фоне снижения выхода жизнеспособных клеток

после замораживания-отогрева общее количество кроветворных КОЕ не изменяется. Потеря жизнеспособных клеток в процессе криоконсервирования по выбранной программе, по видимому, происходит за счет клеток, не входящих в пул гемопоэтических КОЕ эмбриональной печени человека. Это могут быть более зрелые потомки гемопоэтических клеток, не способные к колониеобразованию, а также клетки негемопоэтического ряда, в частности, стромальные клетки-предшественники. Последние играют важную роль в формировании кроветворного микроокружения и поддержании гемопоэза. Несмотря на успехи клеточной биологии в исследовании потенциала эмбриональных клеток-предшественников стромы, их чувствительность к криоконсервированию малоизучена.

С целью изучения криочувствительности стромальных клеток-предшественников эмбриональной печени человека мы, прежде всего, исследовали сохранность фибробластоподобных клеток, способных к колониеобразованию в условиях монослойного культивирования. Ранее нами была определена концентрация колониеобразующих единиц фибробластов в свежеизолированной первичной суспензии КЭПЧ, которая составила 2-3 на 10^5 эксплантированных жизнеспособных клеток [2]. При таком низком содержании данного типа клеток стромы эмбриональной печени крайне сложно исследовать их криочувствительность. Поскольку стромальные клетки адгезируют к культуральному пластику, то целесообразно оценить состояние адгезирующего пула первичной суспензии КЭПЧ на различных этапах процесса криоконсервирования. Согласно малочисленным литературным данным по замораживанию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга взрослых пациентов, медленное замораживание с начальной скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ осуществляют в криозащитном растворе, приготовленном на основе культуральной среды (КС) и содержащем 10% ДМСО [7]. Поэтому в нашем эксперименте, помимо 5%-го, использовали 10%-ый раствор ДМСО, приготовленные на основе КС. В опытах по адгезии ($n=4$) было установлено, что $46,5 \pm 2,2\%$ клеток свежеизолированной суспензии прикреплялось к культуральному пластику в течение 1 часа после посева. При дальнейшем культивировании КЭПЧ (до 18 ч) достоверного увеличения числа адгезировавших клеток выявлено не было.

Исследование влияния 30-минутного контакта на холоде КЭПЧ с растворами ДМСО на их адгезивные свойства исследовали в нескольких вариантах. Обязательным было отмывание клеток от агента перед эксплантацией в культуру.

Экспозиция КЭПЧ как с 5%, так и с 10%-м растворами ДМСО не приводила к изменению общего количества клеток и результатов прижизненного окрашивания первичных суспензий. Однако было отмечено некоторое изменение адгезивности данных клеток после контакта с 10%-м ДМСО в культуральной среде – тенденция к повышению эффективности прикрепления КЭПЧ к культуральному пластику, которая выявлена после 18 ч адгезии. При контакте данных клеток с исследуемым криопротектором в 5%-ой концентрации, а также с ДМСО в комбинации с ССР и непосредственно с ССР количество прикрепляющихся клеток не изменялось и оставалось на уровне нативного контроля. При последующем культивировании в монослое адгезировавших КЭПЧ, контактировавших с 5 и 10%-ми растворами ДМСО, при малых посевных дозах ($2-4 \times 10^4/\text{см}^2$) не выявлено различий в поведении первичной культуры по сравнению с нативным контролем. На 2-3 сутки культивирования среди адгезировавших клеточных элементов обнаруживаются фибробластоподобные клетки (ФК) – удлинённые, веретеновидные или треугольные с большим количеством цитоплазмы и овальным ядром. В этот период среди одиночных адгезировавших клеток выявляются кластеры, состоящие из плотно прилегающих друг к другу 4-10 клеточных элементов. По мере культивирования число клеток в составе этих очагов быстро возрастает, что свидетельствует об активных процессах пролиферации адгезивного пула эмбриональной печени человека. Кластеры характеризуются различным клеточным составом: состоящие из бластных клеток кроветворного ряда; содержащие макрофаги и ФК, а также единичные очаги из мелких эпителиоидных клеток. На 7 сутки культивирования четко выявлялись адгезивные колонии правильной округлой формы, состоящие из 100 и более ФК. В этот срок можно различить 2 основных типа колоний фибробластоподобных КЭПЧ: первый – крупные колонии с плотным многослойным центром, сформированным округлыми клетками, и ФК, образующими сеть на периферии колонии; второй – с разреженным расположением ФК по всей площади колонии. В составе обоих типов колоний встречались единичные нефибробластоподобные клетки, расположенные ближе к периферии, которые характеризовались крупным размером, округлой формой и большим количеством вакуолизированной цитоплазмы. Изменений в морфологии КЭПЧ и колониеобразующей активности фибробластоподобных стромальных клеток-предшественников после контакта с криопротектором выявлено не было.

После криоконсервирования первичной суспензии КЭПЧ по программе для гемопоэтических клеток под защитой 5 и 10%-го ДМСО и последующего отмывания от криопротектора (как культуральной средой с 10% ой ЭТС, так и ССР) при медленном капельном добавлении СО, изменений эффективности прикрепления данных клеток к пластику выявлено не было. Однако отмечены изменения в адгезивном поведении деконсервированных клеток эмбриональной печени человека – задержка их распластывания и начала пролиферации, а также отсутствие колониеобразования стромальными клетками-предшественниками в условиях монослойного культивирования.

Мы полагаем, что криоконсервирование по общепринятому протоколу, разработанному для кроветворных клеток, позволяет сохранять преимущественно гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека, в то время как клетки адгезивного пула, включающего стромальные предшественники, претерпевают необратимые изменения в состоянии плазматических мембран. По-видимому, адгезирующая фракция КЭПЧ является высокочувствительной к повреждающему действию низкотемпературного консервирования. ДМСО в рассмотренных концентрациях можно использовать для защиты стромальных предшественников первичной суспензии КЭПЧ при условии целенаправленного усовершенствования программы замораживания для исследуемого клеточного пула.

Литература

1. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование).– Киев: Наук. думка, 1988.– 192 с.
2. Грищенко В.И., Петренко А.Ю., Волкова Н.А., Скоробогатова Н.Г. Колониеобразующая активность фибробластоподобных клеток-предшественников из эмбриональной печени человека в условиях *in vitro* // Доповіді Національної академії наук України.– 2005.– №2.– С. 138-141.
3. Петренко А. Ю., Сукач А. Н., Росляков А. Д., Мазур С. П. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия.– 1991.– Т. 56, №9.– С. 1647-1651.
4. Скоробогатова Н. Г., Грищук В. П., Петренко А.Ю. Влияние условий удаления криопротектора ДМСО на жизнеспособность и колониеобразующую активность криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека // Пробл. криобиологии.– 2002.– № 4.– С. 16-23.
5. Пат. 67587 (Україна), МПК Ф01N1/02. Спосіб криоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини / В.І. Грищенко, О.Ю. Петренко, Н.Г. Скоробогатова, С.П. Мазур, В.П. Грищук, Н.О. Волкова, №2003109776; Заявлено 31.10.03; опубл. 15.06.2004, Бюл. №6.– С. 4.7.
6. Armitage W. J., Mazur P. Osmotic tolerance of human granulocytes // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol. 247.– P. 373-381.

7. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation // J. Cell Biochem.– 1997.– Vol.64, N2.– P. 278-294.
8. Dankberg F., Persidsky M.D. A test of granulocyte integrity and phagocytic function // Cryobiology.– 1976.– Vol.13.– P. 430-432.
9. Davis J.M. Basic Cell Culture. Practical approach. Second edition.– Oxford: University Press.– 2001.– 381 p.
10. Fredenstein A.J., Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet.– 1970.– Vol.3.– P. 393-403.
11. Galmes A., Besalduch J., Bargay J. et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at –80 degrees C without rate-controlled freezing // Transfusion.– 1996.– Vol.9.– P. 794-797.
12. Petrenko A. Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D. et al. Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in Percoll density gradient // Cryo-Letters.– 1992.– Vol. 13.– P. 87-98.
13. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell. Biol.– 1976.– Vol. 13.– P. 29-83.
14. Yang H., Acker J.P., Hannon J. et al. Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation // Cytotherapy.– 2001.– Vol. 3, N5.– P. 377-386.
15. Zhao J., Hao H. N., Thomas R. L. et al. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells // Stem Cells.– 2001.– Vol.19, N3.– P. 212-218.