

УДК 615.361.36.013.014.41:537.622.4

А.Н. СУКАЧ*, В.П. ГРИШУК, В.И. ГРИШЕНКО

Перспективы использования наночастиц ферромагнетиков для криоконсервирования клеток

UDC 615.361.36.013.014.41:537.622.4

A.N. SUKACH*, V.P. GRISCHUK, V.I. GRISCHENKO

Prospects of Using Ferromagnetic Nanoparticles for Cell Cryopreservation

Проведен анализ потенциальных возможностей использования наночастиц ферромагнетиков (ФМ) для криоконсервирования клеточных суспензий. Были изучены влияние наночастиц на процесс низкотемпературной кристаллизации сред различного состава, а также процесс взаимодействия наночастиц с клетками. Определено, что присутствие частиц ФМ в солевой и сахарозосодержащей средах приводит к повышению температуры кристаллизации растворов. Также было выяснено, что частицы ФМ, с одной стороны, связываются с плазматической мембраной клеток, а с другой – проникают в клетку, связываясь с внутриклеточными структурами, что потенциально может служить основанием для разработки новых протоколов замораживания и отогрева клеточных суспензий.

Ключевые слова: наночастицы, ферромагнетик, кристаллизация, клетка.

Проведено аналіз потенційних можливостей використання наночастинок ферромагнетиків (ФМ) для криоконсервування клітинних суспензій. Було вивчено вплив наночастинок на процес низькотемпературної кристалізації середовищ різного складу, а також процес взаємодії наночастинок з клітинами. Визначено, що присутність частин ФМ в сольовому та сахарозовмісному середовищах приводить до збільшення температури кристалізації розчинів. Також було з'ясовано, що частини ФМ, з одного боку, зв'язуються з плазматичною мембраною клітин, а з другого – проникають в клітину і зв'язуються з внутрішньоклітинними структурами, що потенційно може бути основою для розробки нових протоколів заморожування та відігрівання клітинних суспензій.

Ключові слова: наночастинок, ферромагнетик, кристалізація, клітина.

Potential possibilities of using ferromagnetic nanoparticles for cryopreservation of cell suspensions have been analyzed. The effect of nanoparticles on low-temperature crystallization of the media of various compositions, as well as the interaction of nanoparticles with cells has been studied. The presence of ferromagnetic (FM) particles in saline and sucrose-containing media has been established to result in the rise of crystallization temperature of the solutions. In addition, the FM particles have been revealed, from one hand, to be bound with cell plasma membrane and, from another, they penetrate into a cell being bound with intracellular structures that potentially may serve as the base for developing novel freezing and thawing protocols for cell suspensions.

Key-words: nanoparticles, ferromagnetic, crystallization, cell.

Использование наночастиц, которые получили широкое распространение в электронике [5], также перспективно в области тканевой и клеточной биологии. Размер наночастиц (<100 нм) сравним с размерами многих биологических компонентов, благодаря чему они легко связываются с биологическими молекулами [7]. Кроме того, наночастицами можно управлять с помощью внешних полей: оптического, электрического [2] и магнитного [4]. Высокое отношение площади поверхности наночастиц к их объему обеспечивает благоприятные участки для химических реакций, а оптические свойства позволяют проводить *in situ*

мониторинг молекулярных и клеточных структур, а также биохимических процессов [3]. Наночастицы, благодаря своим уникальным свойствам, могут быть инструментом, который позволит активно управлять процессами замораживания и отогрева клеточных суспензий, что открывает новые перспективы в криобиологии, позволяющие надеяться на разработку эффективных протоколов хранения клеток.

Материалы и методы

В работе использовали реактивы фирмы Sigma (USA).

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Растворы замораживали на программном замораживателе ЗП-10 (производства СКТБ с ОП ИПКиК НАНУ), соединенном с компьютером. Процесс замораживания регистрировали при помощи программы FGraf. Исследуемую среду вносили в криопробирку в объеме 1 мл, помещали в программный замораживатель и охлаждали со скоростью 2°C/мин.

В работе использовали солевую среду DMEM/F12 и 250 мМ сахарозную среды. Среда обогащалась 1% БСА.

В качестве ферромагнетика (ФМ) использовали Fe₃O₄ с размером частиц 50–100 нм. Конечная концентрация ФМ в средах составляла 0,01%, концентрация криопротектора ДМСО – 10%.

Взаимодействие частиц ФМ с клеточными компонентами изучали на культуре клеток, выделенных из печени эмбрионов крыс 15–16 дней гестации. Культивирование клеток проводили в 24-луночных пластиковых планшетах (Corning) в обогащенной среде DMEM/F12 в концентрации 1–2 млн/мл [1]. Среда культивирования заменяли через 3–4 суток. Частицы ФМ добавляли после прикрепления и распластывания клеток.

Микроскопический анализ осуществляли на световом микроскопе Jenaval (ГДР).

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, температура кристаллизации (ТК) среды DMEM/F12 и сахарозного раствора составляет –10,1 и –8,5°C соответственно. Внесение в сахарозную среду 10% ДМСО снижало ТК до –10,8°C. Внесение частиц ФМ в изучаемые среды приводило к повышению ТК сре-

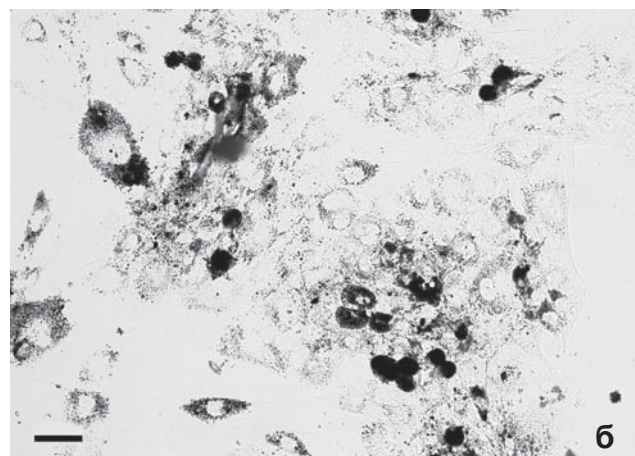
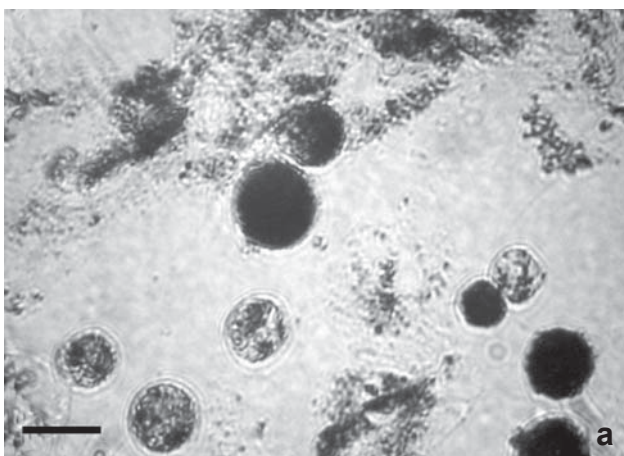
Влияние наночастиц ФМ (0,01%) на ТК сахарозного раствора и среды DMEM/F12 (M±s.e.)

Показатели	Среда					
	DMEM/F12		Сахарозная		Сахарозная + ДМСО	
ФМ	–	+	–	+	–	+
Количество экспериментов	4	5	17	13	12	5
ТК, °C	–10,1±0,6	–7,1±1,1	–8,5±0,3	–6,9±0,4	–10,8±0,4	–9,0±0,3
Достоверность	P<0,1		P<0,005		P<0,05	

ды DMEM/F12 на 2,3°C, сахарозной среды – на 1,6°C. Присутствие частиц ФМ в сахарозной среде, содержащей 10% ДМСО, повышало ТК на 1,7°C в сравнении со средой, не содержащей частиц ФМ.

Исследования, проведенные на культивируемых эмбриональных клетках печени крыс, показали, что частицы ФМ обладают высоким сродством к биологическому материалу. Они хорошо связываются с клетками и их обломками и не связываются с поверхностью пластика планшетов. Процесс связывания ФМ с клеткой зависит от времени, визуально связывание его частиц можно наблюдать через 60 мин культивирования. При добавлении к распластанным клеткам ФМ вначале связывается с плазматической мембраной (рисунок, а), в процессе дальнейшего культивирования проникает в клетку, где находится в цитоплазме (рисунок, б), возможно связываясь с внутриклеточными структурами (эндоплазматическим ретикулумом или цитоскелетом).

Как известно, при охлаждении лед неизбежно зарождается вне клеток в окружающем их растворе. Температура, при которой это происходит,



Прикрепленные (а) и распластанные (б) клетки эмбриональной печени крысы, культивируемые на протяжении суток в присутствии наночастиц Fe₃O₄. Масштаб равен 50 мкм.

определяется составом растворов и самим процессом образования зародышей кристаллов. Образование зародышей, вероятнее всего, ускоряется присутствующими в растворе маленькими частицами, которые принимают участие в упорядочении молекул воды (гетерогенной нуклеации).

Исходя из положений двухфакторной теории повреждения клеток при криоконсервировании [6], в случае медленного охлаждения, клетки находятся длительное время в гипертонической среде с концентрацией солей в 30 раз выше, чем в изотонической, что может вызвать необратимое повреждение структур мембраны и дестабилизировать белки. При быстром охлаждении может образоваться внутриклеточный лед, что обычно вызывает смерть клеток.

Таким образом, клетки млекопитающих не могут выживать ни при быстром, ни при медленном охлаждении без добавления защитных или замещающих растворенных веществ (криопротекторов). Однако криопротекторы, используемые в достаточно высоких концентрациях, обладают осмотической и химической токсичностью. Поэтому подбор состава среды замораживания и управление условиями охлаждения являются важной частью успешного консервирования клеток.

Повышение ТК сред (таблица) в присутствии наночастиц ФМ, скорее всего, указывает на то, что они участвуют в кристаллообразовании (являются центрами нуклеации), вследствие чего снижается степень переохлаждения растворов.

Связывание наночастиц ФМ с клеточной мембраной и внутриклеточными структурами (рисунок) модифицирует клетку. Она приобретает новые свойства: становится чувствительной к действию магнитных и электрических полей. При этом, вероятно, изменяются процессы кристаллообразования в клетке. Возможно, наночастицы ФМ будут инициировать внутриклеточное кристаллообразование, способствовать образованию мелких кристаллов, увеличивать скорость кристаллообразования, снижать количество свободной воды, что будет повышать жизнеспособность клеток в процессе криоконсервирования.

Следует также отметить важность контроля скорости отогрева криоконсервированных клеток, так как при этом они проходят в обратном порядке

через те же процессы, что и при замораживании. Для большинства клеток, консервированных как при больших, так и малых скоростях замораживания, выживаемость увеличивается при быстром отогреве. Однако такие факторы, как геометрия и объем образца клеток, теплопроводные свойства используемых контейнеров, ограничивают абсолютную скорость отогрева. Вследствие способности нагреваться под влиянием электромагнитного излучения присутствие наночастиц ФМ в клеточных суспензиях открывает перспективу разработки методов контролируемого быстрого их отогрева после замораживания.

Выводы

Использование комбинации криопротекторов и наночастиц ФМ может служить основой для разработки новых протоколов криоконсервирования клеточных суспензий.

Авторы выражают благодарность академику НАН Украины Чехуну В.Ф. за предоставленный ферромагнетик.

Литература

1. Сукач А.Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология.– 2005.– Т.47, №3.– С. 207–213.
2. Alivisatos A.P. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals // J. Phys. Chem.– 1996.– Vol. 100, N 13.– P. 13226–13239.
3. Gao X., Yang L., Petros J. A. et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots // Curr. Opin. Biotechnol.– 2005.– Vol. 16, N1.– P. 63–72.
4. Gupta A. K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications// Biomaterials.– 2005.– Vol. 26, N18.– P. 3995–4021.
5. Huang Y., Lieber C. M. Integrated nanoscale electronics and optoelectronics: Exploring nanoscale science and technology through semiconductor nanowires // Pure Appl. Chem.– 2004.– Vol. 12, N12.– P. 2051–2068.
6. Leibo S.P., Farrant J., Mazur P. et al. Effect of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol // Cryobiology.– 1970.– Vol. 2, N4.– P. 315–332.
7. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing // Nat. Mater.– 2005.– Vol. 4, N6.– P. 435–446.

Поступила 08.07.2008