

## 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 отмычки 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  $1 \times 10^6$  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  $-40^\circ\text{C}$  со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ , затем до  $-80^\circ\text{C}$  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 freezing 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.