

УДК 612.79.014.462.5

Л.Г. АБРАФИКОВА*, Т.Ф. ПЕТРЕНКО, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Влияние гипотермического хранения и криоконсервирования на сохранность кожи и фибробластов человека

UDC 612.79.014.462.5

L.G. ABRAFIKOVA*, T.F. PETRENKO, I.P. VYSEKANTSEV

Effect of Hypothermic Storage and Cryopreservation on Survival of Human Skin and Fibroblasts

Установлено, что у биоптатов кожи человека после гипотермического хранения в течение 14 суток (срок наблюдения) сохраняется способность к образованию фибробластов. После криоконсервирования под защитой ДМСО биоптаты теряли эту способность. Экспериментально показана возможность хранения фибробластов при 4°C в течение 2-х суток.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, кожный биоптат, фибробласты человека, криоконсервирование.

Встановлено, що біоптати шкіри людини після гіпотермічного зберігання протягом 14 діб (строк спостереження) зберігають здатність до формування фібробластів. Після криоконсервування під захистом ДМСО біоптати втрачали цю здатність. Експериментально показана можливість збереження фібробластів при 4°C на протязі 2-х діб.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, шкірний біоптат, фібробласти людини, криоконсервування.

It has been found that the bioplates of human skin after hypothermal storage for 14 days (observation term) preserve the ability of fibroblast formation. After cryopreservation with DMSO protection the bioplates lost this ability. In the experiments there was shown the possibility of fibroblast storage at 4°C for 48 hrs.

Key-words: hypothermal storage, skin bioplate, human fibroblasts, cryopreservation

В настоящее время в различных областях медицины широко используются аллогенные фибробласты [2, 4], терапевтическое действие которых основано на способности стимулировать процессы заживления ран, вырабатывать про- и противовоспалительные цитокины, продуцировать компоненты внеклеточного матрикса: коллагены I и II типов, нидоген, фибронектин, факторы роста, значительно ускоряющие регенеративные процессы в организме [1]. Фибробласты получают из различных тканей организма. Наиболее часто применяют фибробласты, полученные из биоптатов кожи человека.

В настоящее время технологии получения фибробластов находятся на стадии разработки [3]. Безальтернативным способом хранения кожных биоптатов и фибробластов в течение различных сроков является использование умеренно низких и низких температур.

Наиболее исследовано хранение фибробластов в криоконсервированном состоянии, однако единого подхода к процессу криоконсервирования фибробластов на сегодняшний день не существует.

Способы хранения фибробластов при умеренно низких температурах для использования в клинических целях изучены недостаточно. Условия консервирования и хранения биоптатов кожи человека исследовались, в основном, с точки зрения последующей трансплантации. Характеристики выхода фибробластов из кожи человека после криоконсервирования или гипотермического хранения мало изучались.

Цель работы – изучение влияния консервирования и гипотермического хранения на выселение фибробластов из кожи человека и сохранность фибробластов.

Материалы и методы

Объектами исследования были хирургические остатки кожи после проведения плановых операций. Биоптаты измельчали на кусочки размерами 0,1×0,1 см и хранили в соответствующих средах:

- 1) раствор Хенкса;
- 2) сыворотка крови донора;
- 3) среда 199 с 10% сыворотки крови донора.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* 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

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

* 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

Биоптаты через каждые 7 суток извлекали из сред хранения и помещали в чашку Петри, добавляли среду 199 с 10% эмбриональной сыворотки (фирма “Биолот”, Россия) и инкубировали в CO₂-инкубаторе.

Для криоконсервирования кожные биоптаты помещали в криопробирки (“Nunc”, США). В качестве сред консервирования применяли эмбриональную сыворотку, эмбриональную сыворотку с 10% ДМСО, среду 199. Образцы замораживали со скоростью охлаждения 1°C/мин до –70°C при последующем погружении в жидкий азот.

Культуры фибробластов получали из нативных образцов биоптатов по стандартным протоколам. Клетки культивировали на ростовой среде 199 с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Для криоконсервирования и гипотермического хранения фибробласты переводили в суспензионное состояние. Суспензию клеток в растворе Хенкса с концентрацией 1×10⁶ кл/мл хранили при 4°C или замораживали в сыворотке без криопротектора и в сыворотке с 10% ДМСО. Исходная концентрация клеток составляла 1×10⁶ кл/мл. Образцы охлаждали со скоростью 1°C/мин до –70°C и погружали в жидкий азот.

Опыт проводили в течение 72 ч, после каждых 24 ч гипотермического хранения клетки подсчитывали. Затем суспензию клеток помещали в ростовую среду и высевали в концентрации 20000 кл/см² в культуральные матрасы. Пролиферативную активность клеток оценивали визуально в инвертированном микроскопе, фиксируя момент формирования монослоя.

Результаты и их обсуждение

В работе установлено, что в контрольных образцах (время от забора до помещения биоптата в растительную среду составляло 3–5 ч) происходило выселение фибробластов по периферии эксплантантов через 7–11 суток (рис.1).

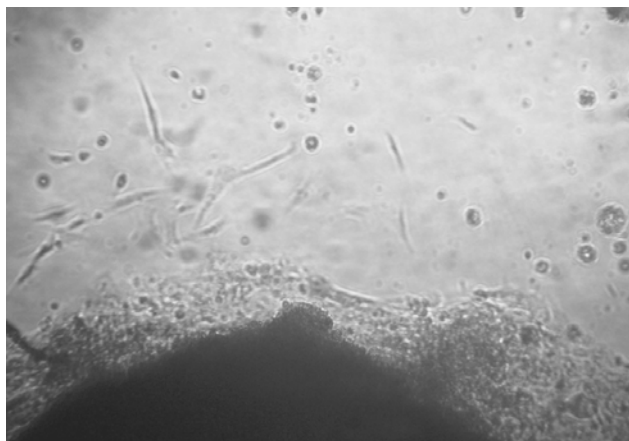


Рис. 1. Получение фибробластов из нативного биоптата на 7-е сутки культивирования.

Фибробласты формировали участки моно-слоистого роста в течение 5–7 суток культивирования. Биоптаты кожи в различных средах хранили 14 суток при 4°C. Способность этих образцов к выселению фибробластов определяли на 7 и 14 сутки хранения.

В условиях хранения биоптатов при 4°C способность к выселению фибробластов зависела от среды хранения. Биоптаты, находившиеся в сыворотке 7 суток, давали выход фибробластов на 7–11 сутки последующего культивирования. Из биоптата, хранящегося 14 суток, выселение фибробластов зарегистрировано на 16–18 сутки, а формирование участков монослоя – на 23–25 сутки культивирования.

При хранении кожного биоптата в растворе Хенкса в течение 7 суток выселение фибробластов начиналось на 9–12 сутки, а участки монослоя формировались на 14–15 сутки культивирования. После хранения биоптатов в растворе Хенкса в течение 14 суток фибробласты появлялись на 14–15 сутки, однако они обладали слабой адгезией и расплыванием, участки монослоя они не формировали.

При хранении биоптатов в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки в течение 14–15 суток выход фибробластов не наблюдали. В результате культивирования кожных биоптатов, предварительно замороженных в эмбриональной сыворотке, выселение фибробластов также не установлено.

При культивировании кожных биоптатов, предварительно замороженных в эмбриональной сыворотке с добавлением 10% ДМСО, выселение фибробластов происходило на 9–13 сутки. Однако морфология этих клеток отличалась от нативных образцов: преобладание округлых клеток, слабо адгезированных к субстрату (у 20–30 % отмечена тенденция к расплыванию). Клетки после расплывания имели веретенообразную форму,

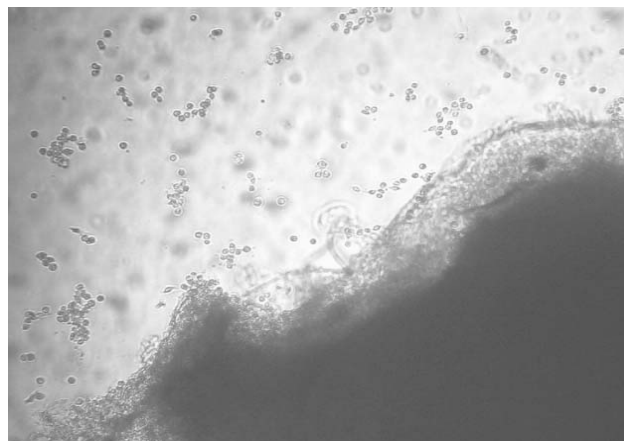


Рис. 2. Фибробласты после криоконсервирования биоптатов кожи на 14-е сутки культивирования.

меньший размер и характеризовались отсутствием вытянутых ламеллоподий. Культивирование в течение последующих 7 суток показало, что количество прикрепленных и распластанных клеток не увеличилось. На 14 сутки культивирования вся популяция клеток приобретала шаровидную форму (рис. 2.).

В экспериментах с суспензиями клеток фибробластов установлено, что после гипотермического хранения суспензии фибробластов в первые 24 ч сохранными оставались 87,4% клеток, через 48 ч – около 73,4%, а 72 ч – 30,1%. Клетки после гипотермического хранения в течение 24–48 ч сохраняли пролиферативную активность, но при дальнейшем культивировании монослой формировался в более поздние сроки по сравнению с нативными клетками. При культивировании клеток, хранившихся в условиях гипотермии, монослой не формировался. В результате криоконсервирования клеток фибробластов, суспензированных в эмбриональной сыворотке и эмбриональной сыворотке с добавлением 10% ДМСО, сохранность клеток составила 66,4 и 84,7% соответственно. При последующем культивировании клетки сохраняли пролиферативные свойства, но монослой формировался на 2–3 суток позже по сравнению с контролем.

Выводы

1. Впервые показана способность биоптатов кожи человека к формированию зоны роста фибробластов после гипотермического хранения в течение 7–14 суток. Способность к образованию фибробластов после гипотермического хранения зависела от среды хранения. Эмбриональная сыворотка и раствор Хенкса обеспечивали сохранность биоптатов к выселению фибробластов. После хранения в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки фибробласты не выселялись.

2. Хранение кожных биоптатов в условиях гипотермии сохраняло их способность к пролиферации фибробластов, однако выселение фибробластов и образование ими монослоя происходило в более поздние сроки по сравнению с нативными биоптатами.

3. После криоконсервирования образцов кожи в условиях эксперимента рост фибробластов отмечен не был.

4. Показана возможность хранения при 4°C суспензии фибробластов в растворе Хенкса в течение 2-х суток.

5. Сохранность фибробластов в процессе криоконсервирования зависит от состава среды консервирования. Наличие в среде криопротектора ДМСО повысило количество сохранных клеток. Пролиферативная способность фибробластов после криоконсервирования достоверно снижалась.

Литература

1. Жилина Н.М., Иванов В.Б., Корень Н.Н. и др. Сравнительный анализ кожной аутопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов // Вест. новых мед. технологий.– 1997.– Т. 4, №1.– С. 88.
2. Саркисов В.В., Алексеев А.А., Туманов В.П. и др. Лечение ожогов с использованием культивированных клеток кожи человека // Хирургия.– 1993.– № 3.– С. 22–26.
3. Терехов С.М. Усовершенствованный метод клонирования диплоидных фибробластов человека // Цитология.– 1981.– Т. 23, №6.– С. 717–718.
4. Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Алексеев и др. Пластическое восстановление кожных покровов с использованием культивированных фибробластов // Анналы хирургии.– 1996.– №4.– С. 16–19.

Поступила 7.07.2008