

Влияние ДМСО на жизнеспособность эмбриональных нервных клеток человека и их поведение в условиях культивирования *in vitro*

А.Н. СУКАЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В последнее время наблюдается всевозрастающий интерес исследователей к эмбриональным нервным клеткам (ЭНК) человека как объекту исследований направленных как на выяснение особенностей функционирования и развития нервной системы человека, так и имеющих целью их клиническое применение для лечения нейродегенеративных болезней человека. При этом актуальным является создание низкотемпературных банков ЭНК как постоянных и доступных источников клеток, прошедших тестирование на вирусное и бактериальное загрязнение. Как правило, для замораживания ядерных клеток применяют криопротектор (КП) ДМСО, который характеризуется высокой скоростью проникновения через клеточную мембрану. Несмотря на то, что влияние ДМСО на клетки изучено достаточно хорошо, данные о влиянии КП на ЭНК человека как в условиях гипотермической инкубации, так и в процессе культивирования *in vitro* отсутствуют. Поэтому целью работы явилось изучение влияния различных концентраций ДМСО, с одной стороны на степень прокрашивания ЭНК человека витальным красителем трипановым синим (ТС), а с другой – на поведение клеток при их культивировании в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Изоляция клеток. Нервные клетки и клетки печени выделяли из эмбрионов человека полученных в результате легальных аборт при соответствующей форме согласия женщин. Ткани мозга и печени механически дезагрегировались на единичные клетки в стерильном растворе, содержащем пенициллин, стрептомицин и гентамицин [1].

Жизнеспособность (ЖС) клеток оценивали по исключению 0,4% ТС (Sigma), для чего предварительно разведенную суспензию клеток смешивали с витальным красителем в соотношении 1:1. Подсчет количества клеток производили в камере Горяева.

Клеточная культура. Клетки высевали в ростовую среду, в концентрации 2×10^6 клеток/мл без предварительной отмычки и выращивали в 24-

хлуночных пластиковых планшетах (Corning) в среде DMEM/F12 (Sigma), как описано в работе [3]. Замена среды производилась каждые 3-4 дня.

Микроскопический анализ культур производился на световом микроскопе Olympus IX70 (Japan). Статистическая обработка результатов проводилась по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

ЭНК человека получали из ткани мозга эмбрионов человека 60-100 дней гестации, добавляли раствор ДМСО до конечной концентрации 0; 2; 3; 5; 7; 10 и 15%, инкубировали 20 минут при 4°C и подсчитывали ЖС ЭНК в камере Горяева.

Как видно из табл. 1, ДМСО оказывает влияние на ЖС ЭНК человека, измеренную по прокрашиванию клеток ТС. При этом степень прокрашивания клеток прямо пропорциональна концентрации ДМСО в клеточной суспензии, а характер падения ЖС ЭНК зависит от их исходного состояния. Клетки с высокой начальной ЖС в присутствии 2% ДМСО характеризуются более высокой степенью ее падения по сравнению с клетками, имеющими невысокую исходную ЖС. Добавка 2% ДМСО к клеткам с ЖС 64,2% приводила к ее снижению до 34%. Добавка такого же количества КП к клеткам с ЖС 30% приводила к снижению показателя до 28%. Таким образом, степень падения ЖС при этом составляла для клеток с высокой исходной ЖС – 15% на 1% ДМСО, а для клеток с низкой исходной ЖС – 1% на 1% ДМСО. Однако, начиная с концентрации ДМСО равной 3,5%, характер изменения ЖС клеток был одинаков у клеток как с высокой, так и низкой исходной ЖС (табл. 1). Полученные данные указывают на наличие в суспензии клеток популяции, характеризующейся повышенной чувствительностью к ТС в присутствии низких (2%) концентраций ДМСО, что может являться следствием различного биохимического состава клеточных мембран, который зависит от сроков гестации эмбрионов, обуславливающих степень комитированности и дифференциации клеток. Внесение в суспензию ЭНК ДМСО, изменяющего как физико-химические свойства плазматической мембраны [4], так и метаболическое состояние клеток [6], приводит к прокрашиванию всей популяции чувствительных к

Адрес для корреспонденции: Сукач А.Н., 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

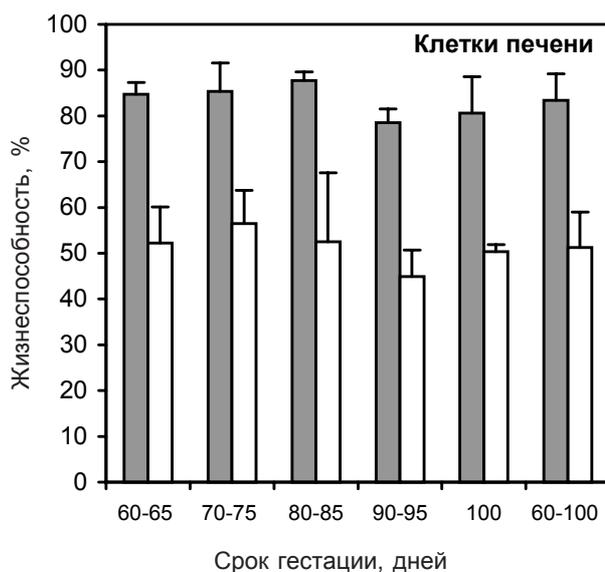
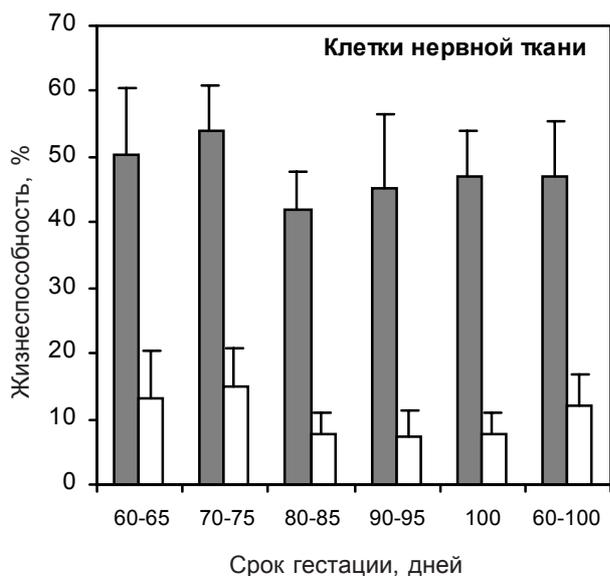
ТС клеток. При этом степень прокрашивания остальных клеток зависит практически прямо пропорционально от концентрации ДМСО в суспензии. Исходя из небольших отличий влияния 7 и 10% ДМСО на ЖС клеток (табл. 1), а также основываясь на том, что наиболее эффективная концентрация ДМСО, используемая для криоконсервации ядерных и, в частности, эмбриональных и прогениторных клеток, лежит в пределах 5-10% [5, 7], в дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию ДМСО равную 7%.

Эксперименты по изучению влияния сроков гестации эмбрионов на ЖС ЭНК действительно указывают на существование зависимости ЖС клеток в присутствии ДМСО от степени их дифференциации. Как видно из рис. 1, ЖС нервных клеток, полученных из эмбрионов 80-100 дней гестации меньше в 2 раза по сравнению с клетками, полученными из нервной ткани эмбрионов 60-75 дней гестации. Можно предположить, что увеличение сроков гестации, которое сопряжено с повышением степени дифференциации клеток, а также с возникновением сложных и более прочных межклеточных связей приводит к повышению чувствительности ЭНК к действию внешних факторов (ишемия и процедура выделения), что проявляется в снижении ЖС клеток в присутствии ДМСО. Косвенным доказательством этого предположения являются эксперименты по изучению влияния ДМСО на ЖС эмбриональных клеток печени. Внесение ДМСО в суспензию клеток, полученных из печени эмбрионов, также приводит к снижению их ЖС (рисунок). Однако ЖС клеток печени в присутствии 7% ДМСО снижается в 1,5 раза, а нервных клеток – в 3,5 раза. Также у

Таблица 1. ЖС ЭНК человека в присутствии ДМСО (20 минут инкубации при 4°C)

Концентрация ДМСО, %	Исходная ЖС, %		Среднее значение ЖС, % (n=22)
	Высокая (n=10)	Низкая (n=12)	
0	64,2±6,2	30,0±6,0	47,1±8,4
2	34,0±11,3	28,0±5,6	32,0±9,8
3,5	27,0±12,7	24,0±5,8	25,0±10,4
7	11,1±3,9	13,4±6,0	11,9±4,9
10	9,0±3,0	12,0±5,1	10,0±4,2
15	7,0±5,6	5,0±2,6	5,0±4,6

клеток печени отсутствует корреляция уровня их ЖС от сроков гестации эмбрионов в зависимости от присутствия ДМСО (рисунок). Как известно, с 5 по 15 неделю гестации эмбриональная печень характеризуется активной функцией кроветворения [2], и в этот период кроветворные клетки составляют до 60% всех клеток органа. Они, в отличие от большинства нервных клеток, не формируют между собой сложных и прочных связей. Возможно, это является причиной большей устойчивости клеток эмбриональной печени к повреждающему действию процедуры изоляции, что и отражается на их жизнеспособности, измеренной как в присутствии, так и при отсутствии ДМСО. А падение ЖС клеток печени в присутствии ДМСО, как и у ЭНК, может обуславливаться особенностями биохимического и структурного состава клеточных мембран, а также ишемическими



Зависимость жизнеспособности клеток печени и нервной ткани от сроков гестации эмбрионов и присутствия 7% ДМСО (20 минут инкубации при 4°C): ■ – без ДМСО; □ – с ДМСО.

повреждениями плазматической мембраны. Однако это предположение требует дополнительных исследований и доказательств.

Помимо биохимических и структурных особенностей, падение ЖС ЭНК в присутствии ДМСО может быть обусловлено также и его токсическим действием на клетки. Для выяснения этого вопроса были проведены эксперименты по культивированию ЭНК *in vitro* в присутствии эмбриональной сыворотки, которая, как предварительно было установлено, влияла на ЖС нервных клеток не оказывала. Эти эксперименты показали, что инкубация ЭНК в течение первых 2 суток характеризуется низкой степенью прикрепления и распластывания единичных клеток и образованием большого количества плавающих агрегатов клеток, которые, по нашему мнению, играют важную роль в процессах репарации повреждений клеток, полученных в результате процедуры выделения. При этом как интенсивность прикрепления и распластывания ЭНК, так структура и размеры образующихся агрегатов зависели от концентрации ДМСО в среде инкубации. Увеличение концентрации ДМСО с одной стороны характеризовалось уменьшением размеров агрегатов и снижением плотности упаковки в них клеток, а с другой - угнетением прикрепления и последующей дифференциации и миграции как единичных клеток, так и агрегатов. При этом присутствие в среде инкубации ДМСО в пределах 2-3% оказывало ярко выраженное угнетающее действие на процессы прикрепления, распластывания, миграции и пролиферации ЭНК. Удаление ДМСО из среды инкубации приводило к частичному устранению его угнетающего действия, что выражалось в увеличении времени культивирования для образования клеточного монослоя. Концентрация ДМСО в среде инкубации равная 3,5% и выше являлась

токсичной для ЭНК. Агрегаты образовывались мелкие и рыхлые, прикрепления и дифференциации ни единичных клеток, ни агрегатов не происходило. Инкубация клеток в присутствии 3,5% ДМСО на протяжении 3 суток приводила к повреждениям клеток, которые не восстанавливались даже после удаления КП из среды инкубации и клетки, в конечном счете, погибали. Инкубация ЭНК в присутствии 0,1-0,5% ДМСО оказывала стимулирующее влияние на процессы прикрепления, распластывания, миграции и пролиферации клеток и их агрегатов по сравнению с клетками, инкубируемыми при отсутствии ДМСО. ЭНК, преинкубированные с 1,25% ДМСО при дальнейшем культивировании в среде, не содержащей КП, характеризовались угнетением процесса дифференциации клеток. При этом результаты проведенных экспериментов показали, что 20 минутная гипотермическая инкубация ЭНК с 7% ДМСО не оказывает влияния на последующее культивирование клеток в случае отмычки КП перед посевом.

Полученные данные позволяют предположить, что образование агрегатов ЭНК в условиях их культивирования *in vitro* играет очень важную роль в репарации повреждений клеток, возникающих в процессе их изоляции. При этом размер и структура агрегатов отражают состояние клеток, из которых они сформированы, и существует предельный уровень ЖС ЭНК, определяемый по прокрашиванию ТС в присутствии ДМСО, когда полной репарации клеток не происходит. Несмотря на значительное повышение ЖС таких клеток в течение первых суток инкубации (табл. 2), дальнейшее их культивирование, как правило, приводит к деградации и гибели. Из наших экспериментов следует, что такая предельная ЖС, измеренная в присутствии ДМСО, равняется 6-7%.

Табл. 2. Влияние культивирования на ЖС и концентрацию ЭНК человека в зависимости от присутствия в суспензии ДМСО (определение ЖС и концентрацию клеток, полученных в результате дезагрегации всех агрегатов после 1 суток культивирования и не прикрепленных агрегатов после 3 суток культивирования)

Номер суспензии	Срок гестации, сут	ЖС, %		Концентрация, млн/мл		ЖС, %		Концентрация, млн/мл	
		- ДМСО	+ ДМСО	- ДМСО	+ ДМСО	- ДМСО	+ ДМСО	- ДМСО	+ ДМСО
		Нативные клетки				1 сутки инкубации			
1	70	26,7	15,5	2,0	2,0	91	91	2,6	2,4
2	65	19,6	5,6	2,0	2,0	74	86	1,3	2,5
		Нативные клетки				3 суток инкубации			
3	70	23	4,2	2,0	2,0	36,5	56	0,26	0,25
4	56	46	28	2,0	2,0	81	65	0,86	0,49

Проведенные эксперименты позволяют утверждать, что ДМСО как бы проявляет все микроповреждения и изменения клеточной мембраны, возникающие в процессе получения и доставки эмбрионов и процедуры выделения клеток. Это может приводить к существенным ошибкам при определении ЖС клеток сразу после их изоляции. При этом также следует иметь в виду, что в присутствии ДМСО ТС окрашиваются клетки как с летальными, так и с не летальными повреждениями и определить их соотношение в свежесодержимой суспензии, используя этот краситель, не представляется возможным.

Выводы

Таким образом, использование ТС для определения ЖС ЭНК человека может приводить к ошибочным результатам. При этом степень прокрашивания красителем в гипотермических условиях зависит от присутствия в суспензии свежесодержимых клеток ДМСО. Количество прокрашенных ЭНК зависит от сроков гестации эмбрионов, из которых они получены, и увеличивается с повышением концентрации ДМСО в клеточной суспензии. Причем суспензия ЭНК, полученная механическим способом, характеризуется наличием клеточной популяции, характеризующейся повышенной чувствительностью к ТС в присутствии низких концентраций ДМСО.

Действие ДМСО на ЭНК в гипотермических условиях является следствием не токсичности КП, а результатом его влияния на плазматические мембраны клеток, что приводит к проявлению микроповреждений, возникающих в процессе процедуры получения клеток, которые могут подвергаться репарации при изотермическом культивировании *in vitro*.

В условиях культивирования *in vitro* присутствие ДМСО в среде инкубации в зависимости от концентрации может обладать как стимулирующим, так и токсическим действием на ЭНК человека. Низкие концентрации ДМСО, лежащие в пределах 0,1-0,5%, стимулируют процессы прикрепления, распластывания, миграции и пролиферации ЭНК человека. Начиная с концентрации 1,25%, проявляется токсическое действие ДМСО, которое усиливается с повышением его концентрации. При этом токсическое действие ДМСО имеет обратимый характер в том случае, если его концентрация не превышает 3% и в значительной мере устраняется при его удалении. Концентрация ДМСО в среде инкубации равная 3,5% и выше оказывает необратимое повреждающее действие на ЭНК.

Литература

- Пам. №36518А МПК с 12 №5/00. Спосіб отримання клітин із ембріонів людини / В.І.Грищенко, О.Ю.Петренко, О.М.Сукач. Заявлено 28.12.99. Опубл. 16.04.01. Бюл. №3.– С.1.166.
- Мяделец О.Д. Основы частной гистологии.– М.; 2002.– 374 с.
- Сукач А.Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология.– 2005.– Т. 47, №3.– С. 207-213.
- Chang H.H., Dea P.K. The dynamics of DMSO in phosphatidylcholine bilayers // Biophys. Chem.– 2001– Vol. 94, N1-2.– P. 33-40.
- Jiun Zhao, Hsiao-Nan Hao, Thomas R. L., Lyman W. D. An efficient method for the cryopreservation of fetal human liver hematopoietic progenitor cells // Stem Cells.– 2001.– Vol. 19, №3.– P. 212-218.
- Yamamoto N. Effect of dimethyl sulfoxide on cytosolic ionized calcium concentration and cytoskeletal organization of hepatocytes in a primary culture // Cell Structure and Function.– 1989.– Vol. 14.– P. 75-85.
- Schwartz P. H., Palmer T. D., Flores L. M. et al. Harvest and cryopreservation of neural precursors from post-natal, post-mortem human brain // Neurology.– 2000.– Vol. 53, N6, Suppl. 2.– A41.