

Характер изменения структурно-функциональных характеристик клеток фетальной печени после криоконсервирования в зависимости от их сроков гестации

UDC 611.36.013:615.014.41

M.V. OSTANKOV*, N.A. BONDAROVICH, I.V. RASSOKHA, A.N. GOLTSEV

Character of Changes of Structural and Functional Parameters of Fetal Liver Cells After Cryopreservation Depending on Their Gestation Terms

Исследовали эффективность трех программ замораживания (двух-, трех-, четырехэтапная) на основании оценки морфофункционального состояния и терапевтического потенциала криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) 15 и 19 суток гестации. Исследования показали, что при замораживании КФП-15 наиболее эффективным был двухэтапный режим криоконсервирования под защитой 10% ДМСО, который обеспечивал более высокое содержание сохранных и стволовых гемопоэтических клеток (CD34⁺CD38⁻). С этой точки зрения наиболее подходящим для КФП-19 было использование 12,5% ДМСО при трехэтапной программе замораживания. У мышей линии СЗН, генетически детерминированных к развитию рака молочной железы, более выраженное снижение частоты развития опухоли и более высокая выживаемость наблюдались после применения КФП-15.

Ключевые слова: клетки фетальной печени, гемопоэтические стволовые клетки, мыши линии СЗН, рак молочной железы.

Досліджували ефективність трьох програм заморожування (двох-, трьох-, чотирьохетапна) на підставі оцінки морфофункціонального стану і терапевтичного потенціалу криоконсервованих клітин фетальної печінки (КФП) 15 і 19 доби гестації. Дослідження показали, що при заморожуванні КФП-15 найбільш ефективним був двоетапний режим криоконсервування під захистом 10% ДМСО, що забезпечував більш високий вміст збережених і стовбурових гемопоетичних клітин (CD34⁺CD38⁻). З цього погляду найбільш придатним для КФП-19 було використання 12,5% ДМСО при трьохетапній програмі заморожування. У мишей лінії СЗН, генетично детермінованих до розвитку раку молочної залози, більш виражене зниження частоти розвитку пухлини і більш високе виживання спостерігалися після застосування КФП-15.

Ключові слова: клітини фетальної печінки, гемопоетичні стовбурові клітини, миші лінії СЗН, рак молочної залози.

The efficiencies of three freezing programs (two, three- and four-stage) basing on the estimation of morphofunctional state and therapeutic potential of cryopreserved fetal liver cells (CFLCs) of 15 and 19 gestation days were studied. The investigations have shown that during freezing of FLC-15 the most effective was two-stage cryopreservation regimen under 10% DMSO protection, which provided higher content of survived and hemopoietic stem cells (CD34⁺CD38⁻). From this point of view the most suitable for cFLC-19 was the use of 12.5% DMSO at three-stage freezing program. In C3H mice genetically determined to the development of breast cancer the most manifested reduction of the frequency of tumor development and higher survival were observed after application of cFLC-15.

Key-words: fetal liver cells, hemopoietic stem cells, C3H mice, breast cancer.

Криобиологические технологии, направленные на модификацию структурно-функционального статуса биообъекта, в том числе клеток фетальной печени (КФП), являются важнейшим компонентом применения клеточной и тканевой терапии в клинической практике. Эффективность трансплантации КФП обусловлена присутствием в них широкого спектра клеточных популяций, среди которых ключевую роль играют стволовые кроветворные элементы [3]. Способность КФП коррегировать не только гемопоэтическую, но и иммуно-компетентную систему организма реципиента делает их привлекательными при лечении патологий аутоим-

мунного генеза, в том числе и онкопатологии. Следует отметить, что гемопоэтические предшественники КФП существенно меняют свой структурно-функциональный статус на различных этапах гестационного периода [8], вследствие чего они будут по-разному отвечать на условия криоконсервирования, что может влиять на их противоопухольевый эффект при превентивном использовании.

Цель исследования – изучить влияние условий криоконсервирования на структуру и функцию КФП 15 и 19 суток гестации (КФП-15 и КФП-19), а также оценивали проявляемый клетками лечебный эффект.

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. Перейславская, 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

Материалы и методы

Исследовали КФП эмбрионов мышей линии C57BL 15 и 19 суток гестации. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (2004 г., Киев). Клетки фетальной печени выделяли щадящей гомогенизацией с добавлением раствора криопротектора ДМСО в концентрации 7, 10, 12,5% и экспозиции с ним в течение 5 мин, затем их криоконсервировали на замораживателе УОП-06 по программам: I – 1°C/мин до –25°C; погружение в жидкий азот (двухэтапная) [2]; II – 1°C/мин до –40°C; 10°C/мин до –90°C; погружение в жидкий азот (трехэтапная) [4]; III – 1°C/мин до –25°C, выдержка 10 мин; 10°C/мин до –40°C; погружение в жидкий азот (четырёхэтапная) [1].

Сохранность ККФП и содержание популяции CD34⁺CD38⁻ клеток определяли на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, США), используя пропидий йодид (PI) и МАТ к CD34- и CD38-структурам (БД, США) [5]. Все контрольные показатели были приняты за 100%.

Лечебный эффект оценивали по степени изменения частоты развития рака молочной железы и выживаемости мышей-самок линии СЗН в 13 и 16 месяцев, которым превентивно в 6 месяцев были введены внутривенно КФП-15 и КФП-19 в дозе 5×10⁶.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента с применением компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение

В процессе неонатального развития перераспределяется клеточная популяция фетальной печени. При сравнительном исследовании морфологического состава КФП-15 и КФП-19 в исходном материале наблюдали увеличение количества зрелых гепатоцитов и бластов на фоне снижения общего пула СКК (CD34⁺CD38⁻ клеток), что обусловило разную чувствительность клеток 15 и 19 суток гестации к условиям криоконсервирования.

При замораживании КФП-15 с 10% ДМСО по программе I сохранность клеток составила 87%, а относительное содержание CD34⁺CD38⁻ клеток повышалось до 116% в сравнении с контролем (рис. 1, а). Указанная концентрация криопротектора также обеспечивала сохранность клеток всех ростков кроветворения. Несколько уступали этим данным результаты, полученные после криоконсервирования КФП по программе II с 7,5% ДМСО (рис. 1, б). При изучении клеточного состава образцов, замороженных по данной программе, при всех концентрациях криопротектора наблюдали их обога-

щение недифференцированными формами бластных клеток, нормобластами. При снижении концен-

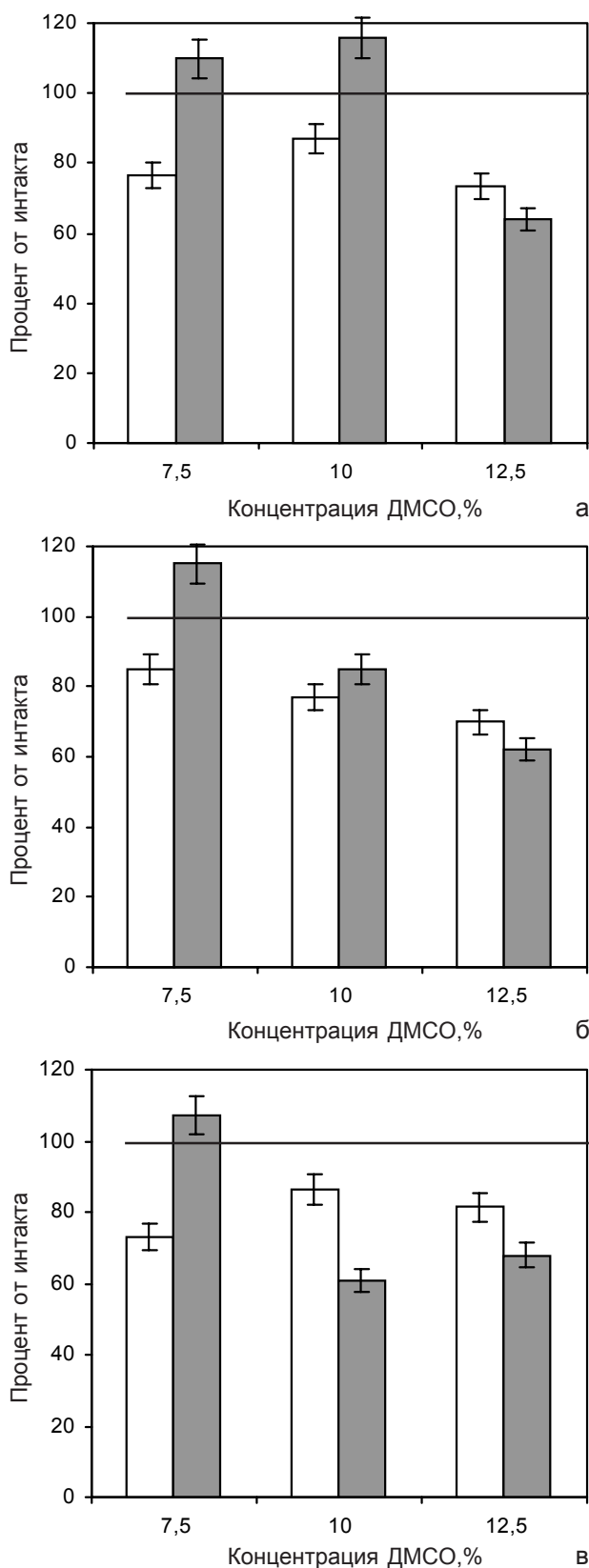


Рис. 1. Содержание сохранных и CD34⁺CD38⁻ КФП-15 после криоконсервирования по I (а), II (б) и III (в) программам. □ – сохранность клеток; ■ – содержание клеток CD34⁺CD38⁻. За 100% приняты значения интактных КФП.

трации криопротектора до 7,5% в пределах программы III отмечали низкую сохранность клеток при большом количестве клеток CD34⁺CD38⁻, превосходивших такое в интактной суспензии КФП (рис. 1, в), что можно рассматривать как частный случай особой способности менее коммитированных клеток избегать повреждения [7]. В клеточном составе наблюдали повышение содержания неидентифицируемых бластных клеток, эритробластов при 7,5 и 10% ДМСО и увеличение содержания нормобластов при 12,5% ДМСО. Разная криорезистентность популяций клеток при определенных концентрациях ДМСО может быть обусловлена различной пластичностью мембран, состоянием ферментных систем, способностью выдерживать деформационные напряжения.

При криоконсервировании КФП более поздних сроков гестации был выявлен иной характер реализации криозащитного действия концентрации ДМСО. Наибольшее количество сохраненных и CD34⁺CD38⁻ клеток среди ККФП-19 (рис. 2, а), близкое к значениям интактной суспензии соотношение клеток отмечали при программе II с 7,5% ДМСО, менее “эффективной” была программа III при 7,5% ДМСО, продемонстрировавшая высокие значения жизнеспособности и содержания CD34⁺CD38⁻ клеток (рис. 2, б), а также сохранности бластных форм клеток и нормобластов. Присутствие в криоконсервирующей среде 7,5 и 12,5% ДМСО при программе I обеспечивало относительно высокие соотношения значений сохранности и содержания клеток CD34⁺CD38⁻ (рис. 2, в). В клеточном составе при всех концентрациях ДМСО в пределах программы I отмечали обогащение популяции бластными формами клеток, сохранность гепатоцитов.

Таким образом, различия в чувствительности к криповреждениям КФП 15 и 19 суток гестации определяют результат их криоконсервирования. Следует отметить, что значения сохраненных ККФП-19 при каждом режиме были ниже ККФП-15, что согласуется с данными [6] и может быть связано с более выраженным адаптивным эффектом различных компенсаторных механизмов КФП-15.

Полученные результаты указывают на то, что в цикле замораживания-отогрева изменяется криопротекторное действие 3-х выбранных концентраций ДМСО от скорости замораживания и исходного состояния биообъекта, т.е. сроков гестации КФП.

Очевидно, реализация функции криоконсервированного материала в условиях *in vivo* является единственным показателем оценки состоятельности трансплантируемого биообъекта. В связи с этим в сравнительном аспекте был исследован терапевтический эффект КФП-15, замороженных по программе I под защитой 10% ДМСО, и КФП-19,

криоконсервированных по программе II при 12,5% ДМСО.

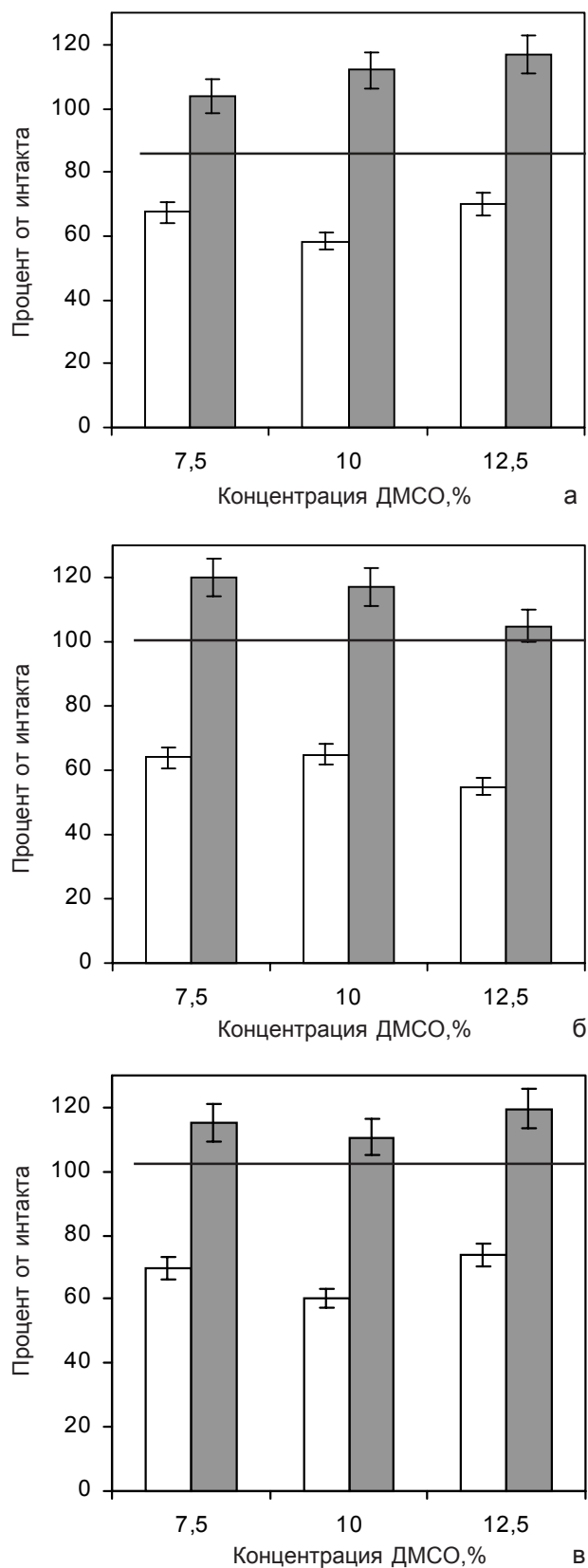


Рис. 2. Содержание сохраненных и CD34⁺CD38⁻ КФП-19 после криоконсервирования по II (а), III (б) и I (в) программам. □ – сохранность клеток; ■ – содержание клеток CD34⁺CD38⁻. За 100% приняты значения интактных КФП.

Манифестация опухолевого процесса у самок линии СЗН начинается с 13-месячного возраста и наблюдается у 78,6% животных, к 16 месяцам этот показатель возрастает до 90%, при этом более 70% животных погибает. Превентивная терапия ККФП снижала частоту возникновения опухолей, повышая выживаемость животных в 16 месяцев. При этом эффект проведенной терапии зависел от сроков гестации ККФП. После применения ККФП-15 частота развития рака молочной железы в 13 месяцев снизилась до 44,2%, а до 16 месяцев доживало 55,8%, что в 4 раза превышает этот показатель в группе животных, которых не лечили. При введении ККФП-19 частота развития была выше (57,3%), что приводило к снижению количества выживших животных (до 42,7%) в 16 месяцев. У выживших животных, вне зависимости от сроков гестации вводимого материала, развития рака молочной железы не было отмечено.

Полученные результаты свидетельствуют о преимуществах использования в онкологической практике ККФП, находящихся на более ранних сроках гестации.

Выводы

Показано, что для КФП-15 наиболее эффективной является программа замораживания I под защитой 10% ДМСО, а для КФП-19 – программа II при 12,5% ДМСО. Это свидетельствует о необходимости оценки исходного морфофункционального состояния КФП, определяемого сроками гестации для поиска оптимального режима их криоконсервирования. При этом отмечено наличие особенностей модифицирующего влияния холода на разные популяции клеток.

Выявлено, что превентивный лечебный эффект при детерминированном раке молочной железы в большей степени реализуют ККФП-15, что выразилось в большей выживаемости животных и меньшей частоте развития рака молочной железы по сравнению с введением ККФП-19.

Литература

1. *Вотякова И.А.* Влияние факторов низкотемпературного криоконсервирования на биологическую полноценность гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1987.– 35 с.
2. *Гольцев А.Н.* Изучение патофизиологических механизмов проявления иммунореактивности гемопоэтической ткани // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 1–2.– С. 37–41.
3. *Грищенко В.И., Гольцев А.Н.* Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 54–84
4. *Шерешков С.И., Буачидзе Л.Н., Баранов А.Е. и др.* Трансплантация клеток фетальной печени от многих эмбрионов больным гемобластомами, кондиционированным общим облучением и химиопрепаратами // Гематология и трансфузиология.– 1984.– Т. 29, №4.– С. 9–15.
5. *Шторх В., Эмпрех И.* Определение клеточных маркеров методом мембранной иммуофлюоресценции. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля.– М.: Медицина, 1987.– С. 254–268.
6. *Anderson E.M., Jones D.R., Liu D.T., Evans A.A.* Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal hematopoietic progenitor cell preparations // Fetal Diagn. Ther.– 1996.– Vol. 11, N6.– P. 427–432.
7. *Humpe A., Beck C., Schoch R. et al.* Establishment and optimization of a flow cytometric method for evaluation of viability of CD34⁺ cells after cryopreservation and comparison with trypan blue exclusion staining // Transfusion.– 2005.– Vol. 45, N7.– P. 1208–1213.
8. *Morrison S.J., Hemmati H.D., Wandycz A.M., Weissman I.L.* The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– Vol. 92, N22.– P. 10302–10306.

Поступила 21.07.2008