

Влияние криоконсервирования на структурно-функциональные характеристики клеток фетальной печени поздних сроков гестации

А.Ю. ДИМИТРОВ, Н.А. БОНДАРОВИЧ, О.В. САФРАНЧУК, О.В. ЧЕЛОМБИТЬКО, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation Effect on Structural and Functional Characteristics of Fetal Liver Cells of Late Gestation Terms

A.YU. DIMITROV, N.A. BONDAROVICH, O.V. SAFRANCHUK, O.V. CHELOMBITKO, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Эффективность криоконсервирования определяется исходным структурно-функциональным статусом биологического объекта. Получено много данных о влиянии фактора криоконсервирования на клетки фетальной печени (КФП) ранних сроков гестации, но сведений о поздних сроках еще недостаточно.

Цель работы – изучить характер влияния различных режимов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики КФП поздних сроков гестации.

Суспензию клеток получали методом гомогенизации в среде 199 фетальной печени плодов мышей линии C57BL 19 суток гестации (КФП-19). Криоконсервировали КФП-19 под защитой ДМСО (в концентрации 7,5, 10 и 12,5%) со скоростью охлаждения 1°C/мин до -25°C и с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Клетки отогревали на водяной бане при 37°C. Сохранность КФП-19 оценивали по окрашиванию пропидий йодидом. Клеточный состав определяли на мазках, окрашенных азур-2 – эозином, при помощи светового микроскопа ЛОМО. Субпопуляционный состав КФП исследовали методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, США) с использованием моноклональных антител к молекулам CD34, CD38, CD44, CD73 (BD Pharmingen, США). Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Сохранность КФП-19 после диссоциации составляла $74,8 \pm 2,1\%$. Проведенный морфологический анализ КФП-19 показал, что среди клеток этого срока гестации преобладали клетки эритроидного ряда, недифференцированные бластные и зрелые клетки печени, клетки гранулоцитарного и лимфоидного пула. Незначительно были представлены мезенхимальные стволовые клетки (МСК) ($CD73^+CD44^+$) и стволовые кроветворные клетки (СКК $CD34^+CD38^-$). Морфологический состав КФП-19 после криоконсервирования по выбранному режиму изменялся в зависимости от концентрации ДМСО. При 7,5%-й концентрации криопротектора сохранялись в большей степени бласты, незрелые формы гранулоцитов и гепатоцитов; 10%-й – преимущественно эритроидные и лимфоцитоподобные клетки; 12,5%-й – бластные формы. Максимальную сохранность субпопуляций СКК и МСК обеспечивала 10%-я концентрация ДМСО. Эти результаты существенно отличаются от полученных на материале другого срока гестации (Гольцев А.Н., 2009).

Таким образом, варьирование концентрации криопротектора при одной и той же скорости охлаждения позволяет селективно обеспечить сохранность (элиминацию) разных субпопуляций КФП при криоконсервировании данного биологического объекта.

Cryopreservation efficiency is determined by initial structural and functional status of biological object. There are numerous data on the effect of cryopreservation on fetal liver cells (FLCs) of early gestation terms, but the findings on later terms are not quite well reported.

The research aim is to study the character of the effect of different cryopreservation regimens on morphofunctional characteristics of FLCs of late gestation terms.

Cell suspension was obtained by homogenization in medium 199 of fetal liver of 19 gestation day C57BL mice fetuses. FLCs were cryopreserved under DMSO protection (under concentration of 7.5%, 10% and 12.5%) with cooling rate of 1°C/min down to -25°C and with following plunging into liquid nitrogen by means of programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit, IPC&C). Thawing was done on water bath at 37°C. The survival rate of FLCs was assessed on staining with propidium iodide. Cell composition was examined in smears stained with azur-2 – eosin in light microscope LOMO (Russia). Subpopulational composition of FLCs was studied with the method of flow cytometry (FACS Calibur, USA) using monoantibodies to CD34, CD38, CD44, CD 73 (BD Pharmingen, USA). Statistical processing was performed on the method of Student-Fisher.

FLCs survival rate after dissociation made $74.8 \pm 2.1\%$. The performed morphological analysis of FLC-19 has shown that among the cells of this gestation term the cells of erythroid line, non-differentiated blasts and mature liver cells, cells of granulocyte and lymphoid pool predominated. There was an insignificant amount of mesenchymal stem cells (MSCs) ($CD73^+CD44^+$) and hemopoietic stem cells (HSCs) ($CD34^+CD38^-$). Morphological composition of FLC-19 after cryopreservation according the chosen protocol changed depending on DMSO concentration. At 7.5% concentration of cryoprotectant the blasts and immature forms of granulocytes and hepatocytes were preserved better; at 10% concentration these were predominantly erythroid and lymphocyte-like cells; and blast forms at 12.5%. Maximum integrity of subpopulations of HSCs and MSCs provided 10% DMSO concentration. These results significantly differ from those obtained in the material of other gestation term (Goltsev A.N., 2009).

Thus, the varying of cryoprotectant concentration at the same cooling rate enables selectively provide the integrity (elimination) of different subpopulations of FLCs during cryopreservation of this bioobject.