

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Савельева Виктория Алексеевна

лаборант-исследователь
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Сихарулидзе Сергей Владимирович

пластический хирург
Многопрофильная больница «ВМ-клиник»

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-106721

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ХРАНЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА НА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Аннотация: в данном исследовании проведен анализ влияния различных периодов хранения суспензии клеток в низкотемпературных условиях при -80°C на жизнеспособность клеток после размораживания. Оценка размораживаемого материала оценивалась по динамике показателей общего количества клеток, количества живых клеток и процентного содержания жизнеспособных клеток в общей суспензии в трех исследуемых группах (2, 4 и 6 недель хранения).

Ключевые слова: культура клеток кожи, низкотемпературная консервация, фибробласты.

Простые, экономичные и надежные протоколы криоконсервации клеток имеют решающее значение для их эффективного применения в клеточной и тканевой инженерии. Основные направления фундаментальных исследований в этой области заключаются в подборе криопротекторов, техник криоконсервации и размораживания клеток. На сегодняшний день в зависимости от задач исследования и практического применения размораживаемых клеток для краткосрочного хранения биоматериала используются низкотемпературные холодильные камеры на -80°C , а для длительного хранения – сосуды Дьюара с поддержанием температуры на уровне -196°C . Однако если сохранность жизнеспособности клеток при -196°C доказана многочисленными исследованиями, то работы по изучению влияния длительности хранения при других низкотемпературных режимах является актуальным направлением в поиске оптимальных условий хранения биоматериала.

Существует большое количество работ по оптимизации протоколов криоконсервации и размораживания клеток, по подборе криопротекторов в различных соотношениях с основной питательной средой или сывороткой, виду замораживаемого материала (суспензия или монослой) и т.д. [4]. Кроме этого из-

вестно, что клетки различных дифферонов, а также клетки разного уровня дифференцировки одного дифферона проявляют различную реакцию на этапы криоконсервации. В связи с этим с целью повышения эффективности криоконсервации для различных клеточных линий крайне важно учитывать специфические морфофункциональные реактивные изменения клеток на воздействие низких температур.

Для сохранности клеток при криоконсервации используются различные криопротекторы. Одним из наиболее часто используемых является диметилсульфоксид (ДМСО), который применяется в протоколах криоконсервации как для краткосрочного, так и долгосрочного хранения биоматериала. ДМСО быстро проникает в клетки, минимизируя осмотический стресс, а концентрация в диапазоне 5–10% не является токсичной [2; 3; 6]. Длительность хранения клеточных линий определяется целями и задачами дальнейшего их применения. В связи с этим целью настоящей работы является оценка влияния длительности хранения на жизнеспособность криоконсервированных клеток кожи человека при -80°C с использованием 10% раствора ДМСО после выведения клеточных линий кожи человека из заморозки.

Материалы и методы. Культивирование клеток кожи: экспланты кожного лоскута размером не более 1,0 x 5,0 см, иссеченные из области груди (область ареола) после проведения пластической хирургии в Многопрофильной больнице «ВМ-клиник» города Ульяновска, погружались в транспортную среду (ТС), состоящую из RPMI-16840 (ПанЭко, Россия) и 0,01% гентамицин (ПанЭко, Россия) и доставлялись в лабораторию клеточных технологий Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова». Через 2 часа ткань извлекали из ТС и проводили стандартные этапы механической и ферментативной disaggregation. Все манипуляции с фрагментами кожи и клеточным материалом проводились в асептических условиях ламинарного бокса MSC Advantage (Thermo Scientific, США) и боксированном помещении класса чистоты В. Полученный материал помещали в раствор коллагеназы (ПанЭКО, Россия) при температуре 37°C

в инкубатор СВ-53 (Binder, Германия) с содержанием CO₂ 5%. В качестве полных питательных сред была использована RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ПанЭко, Россия). Культивирование осуществляли во флаконах объемом 25 см² (ТТР, Швейцария), подсчет количества клеток проводили с использованием счетчика клеток Bio-Rad TC20 (Bio-Rad, Сингапур) и красителя трипановый синий. Замена среды проводилась через каждые 2–5 сут. Формирование монослоя контролировали визуально на инвертированном микроскопе «Axio Vert. A1» (Zeiss, Германия).

Криоконсервацию клеточных линий кожи человека проводили с использованием раствора RPMI 1640 – ЭТС с содержанием 10% ДМСО (Sigma, США). Ресуспензированные клетки переносили в криовials (Nunc, США) и замораживали постепенным охлаждением с последующим хранением в низкотемпературном холодильнике при -80°C (Haier, Китай). В зависимости от срока хранения были выделены 3 группы клеточных линий: 1 группа – хранение в течение 2-х недель, 2 группа – 4-х недель, 3 группа – 6-ть недель.

На этапе выведения из криоконсервации криовиалу с клетками нагревали в инкубаторе до полного оттаивания, далее переносили в центрифужную пробирку, добавляли теплую ростовую среду и центрифугировали на центрифуге ЕВА 200 (Hettich, Германия) при 1300 об./мин. Отмытые от ДМСО клетки помещали в культуральные флаконы, по 5–12 культуральных чашек в каждой группе.

Статистическая обработка проводилась с использованием программного обеспечения Prism9 (GraphPad, США). Для проверки характера распределения данных использован критерий Колмогорова-Смирнова. Дальнейший анализ проводили с использованием непараметрических критериев: критерия Вилкоксона, критерия Манна-Уитни. Для анализа корреляционных связей использована ранговая корреляция Спирмена. Для сравнения медиан нескольких выборок использован критерий Краскела-Уоллиса. Данные считали значимыми при $p < 0,05$: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$.

Результаты и их обсуждение. Данные по общему количеству клеток (ОКК) и по количеству живых клеток (КЖК) в исследуемых группах представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели ОКК и КЖК в исследуемых группах (Медиана – Q25;75)

Группа			Количество клеток	p
1	ОКК	До заморозки	975000 (652000;1330000)	0,008**
		После разморозки	790000 (525000;1250000)	
	КЖК	До заморозки	876000 (564000; 1130000)	0,008**
		После заморозки	756000 (400000; 1000000)	
2	ОКК	До заморозки	1360000 (1250000; 1410000)	0,04*
		После разморозки	876000 (849000; 1000000)	
	КЖК	До заморозки	1310000 (1230000; 1380000)	0,04*
		После заморозки	717000 (560000; 980000)	
3	ОКК	До заморозки	1230000 (782500; 2255000)	0,002**
		После разморозки	506500 (386000; 974500)	
	КЖК	До заморозки	1023000 (662500; 2018000)	0,002**
		После заморозки	354500 (2465000; 728500)	

По результатам сравнения равенства медиан выборок с разным сроком хранения при -80°C отмечено статистически значимое различие количества жизнеспособных клеток во всех трех исследуемых группах после выведения из криоконсервации ($p < 0,0001****$).

По мере увеличения срока криоконсервации процентное содержание жизнеспособных клеток достоверно снижается с 95% в свежей суспензии клеток до 87% при хранении в течение 2-х недель ($p = 0,02*$), до 84% при хранении в течение 4-х недель ($p = 0,009**$), до 69% при хранении в течение 6-ти недель ($p < 0,0001****$) (рис. 1).

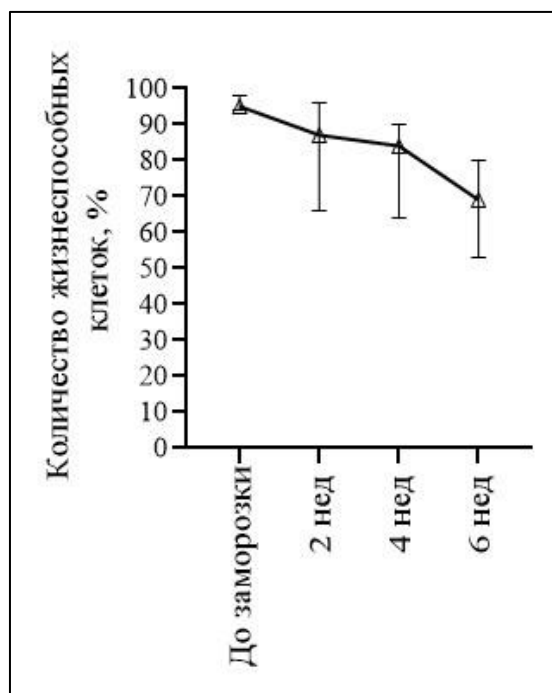


Рис. 1. Динамика содержания жизнеспособных клеток в суспензии клеток в зависимости от срока хранения криоконсервированного биоматериала

По литературным данным известно, что криоконсервация до -80°C с использованием ДМСО в качестве криопротектора позволяет сохранить жизнеспособность клеток выше 70%, однако нет исследований о влиянии длительности криоконсервации на показатели жизнеспособности клеточных линий [6]. В свою очередь полученные нами данные указывают на то, что оптимальный период хранения в ДМСО при температуре до -80°C без риска значительной потери жизнеспособности клеток клеточные линии – до 6-ти недель. Отличительной особенностью выведенных из заморозки клеточных линий, в сравнении с контрольной группой не вводимых в заморозку, является более поздний срок формирования монослоя. Более детальный морфофункциональный анализ поведения клеточных линий кожи человека после размораживания, а также анализ показателей клеточного гомеостаза, является задачей дальнейшего исследования.

Одним из важных параметров в оценке сохранности клеток после «криоконсервации-хранения-оттаивания» является анализ динамики общего количества клеток (ОКК).

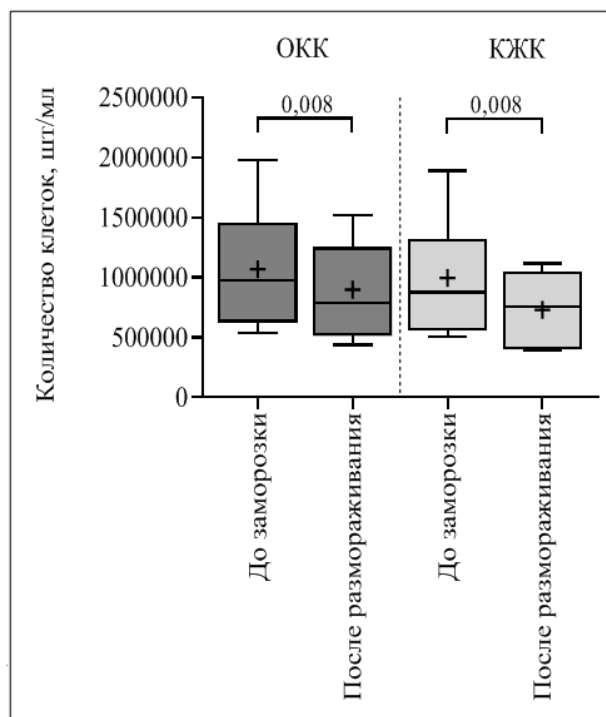


Рис. 2. Изменение общего количества клеток (ОКК) и количества живых клеток (КЖК) в группе нативных клеток до заморозки и после размораживания с хранением в течение 2 недель

Так, по результатам полученных нами данных, в сравнении с контрольной группой, выявлено, что при хранении клеточных линий кожи человека в течение 2-х недель показатель ОКК снижается на 19% ($p = 0,008$), показатель КЖК снижается на 14% ($p = 0,008$) (Рис. 2). Снижение данных показателей может быть связано с самим фактом введения клеточной линии в режим криоконсервации, отмывкой от ДМСО, формированием внеклеточных и внутриклеточных кристаллов льда, которые механически разрушают мембрану снижая показатели КЖК [1].

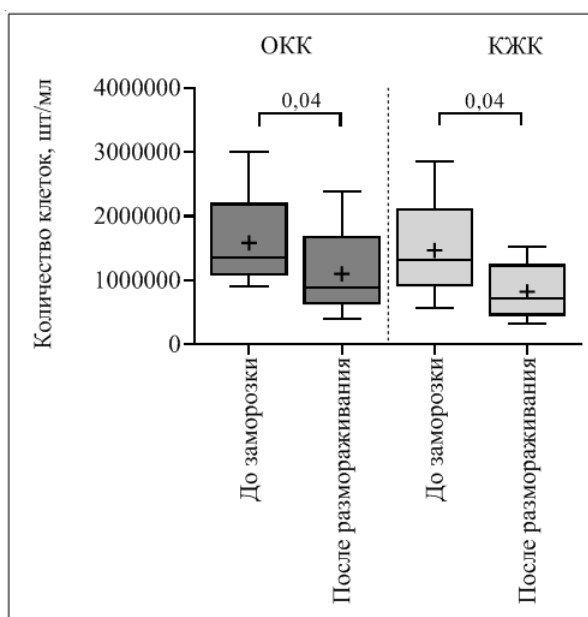


Рис. 3. Изменение общего количества клеток (ОКК) и количества живых клеток (КЖК) в группе нативных клеток до заморозки и после размораживания с хранением в течение 4 недель

При условии длительности хранения суспензии клеточный линий кожи человека в течение 4-х недель показатель ОКК снижается на 36% ($p = 0,04$), КЖК на 45% ($p = 0,04$) (рис. 3).

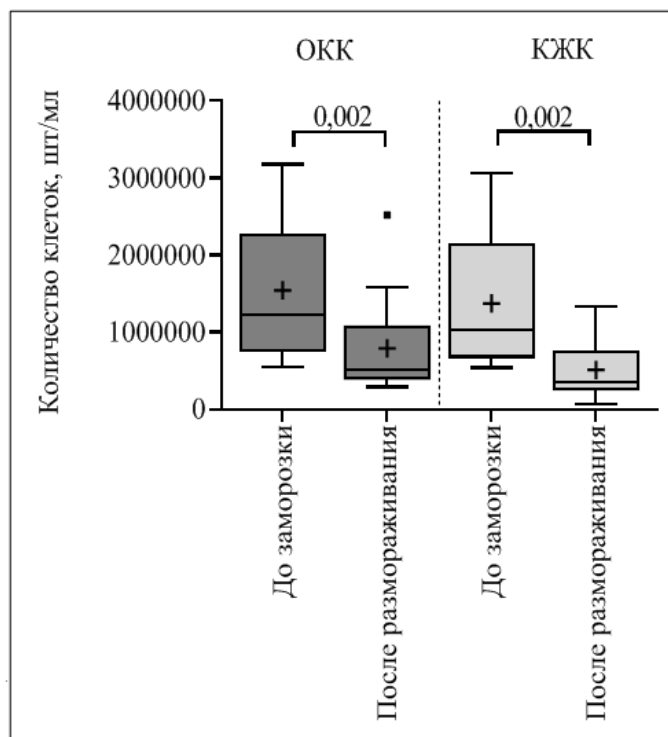


Рис. 4. Изменение общего количества клеток (ОКК) и количества живых клеток (КЖК) в группе нативных клеток до заморозки и после размораживания с хранением в течение 6-ти недель

При условии длительности хранения суспензии клеточный линий кожи человека в течение 6-ти недель показатель ОКК снижается на 59% ($p = 0,002$), КЖК на 66% ($p = 0,002$) (рис. 4).

Таким образом, отмечается четкая корреляция снижения показателей ОКК (на 59%) и КЖК (на 66%) в зависимости от длительности криоконсервации при температуре до -80°C , в большей мере снижается показатель КЖК.

В наших исследованиях выявлена прямая/положительная сильная корреляционная связь ОКК до криоконсервации клеточных линий кожи человека и после размораживания в группе 1 ($r = 0,98$, $p = 0,00$), средняя прямая/положительная связь в группе 3 ($r = 0,66$, $p = 0,012$) и в группе 2 ($r = 0,60$, $p = 0,18$).

Корреляционная сопряженность показателя КЖК до криоконсервации клеточных линий кожи человека и после размораживания прямая/положительная сильная в группе 1 ($r = 0,83$, $p = 0,00$), средняя прямая/положительная в группе 3 ($r = 0,62$, $p = 0,02$). В группе 2 (хранение в течение 4 недель) показатели статистически не значимы ($r = 0,70$, $p = 0,12$).

Полученные нами данные в целом согласуются с данными литературы о взаимосвязи количества замораживаемых клеток в криовиале с качеством суспензии клеточных линий после размораживания. Известно, что качество размороженного материала зависит от количества клеток в криовиале [5].

Таким образом, оптимальный период криоконсервации в ДМСО при температуре до -80°C клеточных линий кожи человека – до 6-ти недель. Длительность хранения более 6-ти недель значительно сказывается на исследуемых показателях и не рекомендуется для использования в практической деятельности.

Список литературы

1. Белоус А.М. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция / А.М. Белоус, Е.А. Гордиенко, Л.Ф. Розанов // Высшая школа. – М., 1987. – 80 с.

2. Gee A.P. Bone marrow processing and purging: a practical guide. – 1991. – P. 332–337.

3. Gurtovenko A.A. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide / A.A. Gurtovenko, J. Anwar // J. Phys. Chem. B. – 2007. – 111 (35). – P. 10453–10460. DOI 10.1021/jp073113e. EDN MHDXXV

4. Ike S. Cryopreserved allogenic fibroblast sheets: development of a promising treatment for refractory skin ulcers / S. Ike, K. Ueno, M. Yanagihara [et al.] // I. Am. J. Transl. Res. – 2022. – 14 (6). P. 3879–3892.

5. Liseth K. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft / K. Liseth, J.F. Abrahamson, S. Bjorsvik [et al.] // Cytotherapy. – 2005. – 7. – P. 328–333.

6. Naaldijk Y. Cryopreservation of dermal fibroblasts and keratinocytes in hydroxyethyl starch-based cryoprotectants / Y. Naaldijk, A.A. Johnson, A. Friedrich-Stöckigt [et al.] // BMC Biotechnol. – 2016. – 16 (85). [et al.] <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0315-4>. EDN CGXCWJ

7. Ueno K. Freezing of cell sheets using a 3D freezer produces high cell viability after thawing // K. Ueno, S. Ike, N. Yamamoto [et al.] // Biochem. Biophys. Rep. – 2021. – 28: 101169. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101169. eCollection 2021 Dec.