

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Казанцева Татьяна Николаевна

магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой,
ведущий научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

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-138740

ВЛИЯНИЕ DMSO-КРИОПРОТЕКТОРА НА БИОЛОГИЮ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Аннотация: в данном исследовании проведен анализ влияния различных периодов DMSO-криоконсервации на морфофункциональные характеристики дермальных фибробластов.

Ключевые слова: клеточные технологии, фибробласты, DMSO, криоконсервация, размораживание.

Криоконсервация клеток является важным инструментом в современной биологии и медицине, позволяющим сохранять клетки и ткани для последующего использования в фундаментальных исследованиях, клинической практике, а также в репродуктивных технологиях животных, включая сохранение генетического материала исчезающих видов. Криоконсервация биологического материала для научных исследований позволяет создать банк клеточных линий, обеспечивает поддержание исходного морфотипа клеточной линии с сохранными морфологическими и функциональными показателями таковых *in situ* [7]. С коммерческой точки зрения, доступность криоконсервации биологического материала обеспечивает длительную сохранность и возможность транспортировки биологического материала с контролируемым качеством и безопасностью.

Прогресс, достигнутый в оптимизации условий культивирования различных типов клеток, до сих пор несопоставим с уровнем исследований о влиянии процедур криоконсервации – хранения-размораживания на клетки. Различные криопротекторы и длительность консервации могут оказывать существенное влияние на биологию клеток в культуре [5]. Основные направления фундаментальных исследований в этой области заключаются в подборе криопротекторов и техники криоконсервации, включая этап выведения клеток из гипобиоза.

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 парами или жидким азотом с поддержанием температуры на уровне -196°C . В то же время если сохранность жизнеспо-

собности клеток при температуре -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. Известно, что хранение замороженной культуры клеток при -80°C является субоптимальным по сравнению с хранением в жидким азоте, так как период хранения ограничивается несколькими месяцами, в течение которых отмечается постепенное снижение жизнеспособности клеток [8]. В случае отсутствия необходимости длительного хранения, а также учитывая риск инфицирования биоматериала микоплазмой, актуальным является более глубокий анализ изучения биологии клеточной линии в условиях криоконсервации при температуре -80°C .

Одним из наиболее часто используемых криопротекторов является диметилсульфоксид (DMSO), который применяется в протоколах криоконсервации как для краткосрочного, так и долгосрочного хранения биоматериала. DMSO оказывает более щадящее действие на структуру и функции клеток, быстро проникает в клетки, минимизируя осмотический стресс, а его концентрация в диапазоне 5–10% не является токсичной [4]. В то же время влияние DMSO на биологию клеток, в частности фибробластов кожи человека, остается недостаточно изученным.

В связи с этим *целью* настоящей работы является проведение оценки влияния длительности хранения на жизнеспособность криоконсервированных дермальных фибробластов человека в DMSO-криопротекторе с терmostатированием температурного режима -80°C .

Материалы и методы. Материалом для исследования служили экспланты кожного лоскута (область ареолы) после проведения реконструктивной и пластической хирургии в «ВМ-клинике». Кожные лоскуты погружались в заранее приготовленную транспортировочную среду и доставлялись в лабораторию клеточных технологий НИЦ ФППБ ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова». Этапы выделения, протокол и условия культивирования описаны ранее [3].

Криоконсервацию и размораживание клеточных линий дермальных фибробластов проводили по протоколу, описанному ранее [3].

Хранение замороженных клеточных линий дермальных фибробластов проводилось с использованием морозильной камеры (Haier, Китай), настроенной на -80°C (Thermo Fisher Scientific, США). Криовиалы каждой группы размораживались в соответствии со сроком хранения.

Морфологический анализ и оцифровку полученных цитологических препаратов клеточной линии дермальных фибробластов в каждой исследуемой группе проводили через 7 суток после размораживания по протоколам, описанным ранее [3]. Для иллюстрации полученных результатов использовано программное обеспечение Prism9 (GraphPad, США).

Результаты и их обсуждение. В течение 7 дней после выведения из DMSO-криоконсервации клеточная линия дермальных фибробластов в группе *CulTh1* представлена 70% (Рис. 1А), в группе *CulTh2* – 65% (рис. 1Б), а в группе *CulTh3* – 55% (Рис. 1В) конфлюэнтным монослоем. Следует отметить увеличение погибших клеток в группе *CulTh2* и, особенно, в группе *CulTh3*, которые в световой микроскоп выглядят в виде темного скопления дебриса. Кроме этого, наблюдается увеличение разреженности клеток и снижение скорости заселения культурального флаакона по мере увеличения срока хранения криоконсервированных клеток.

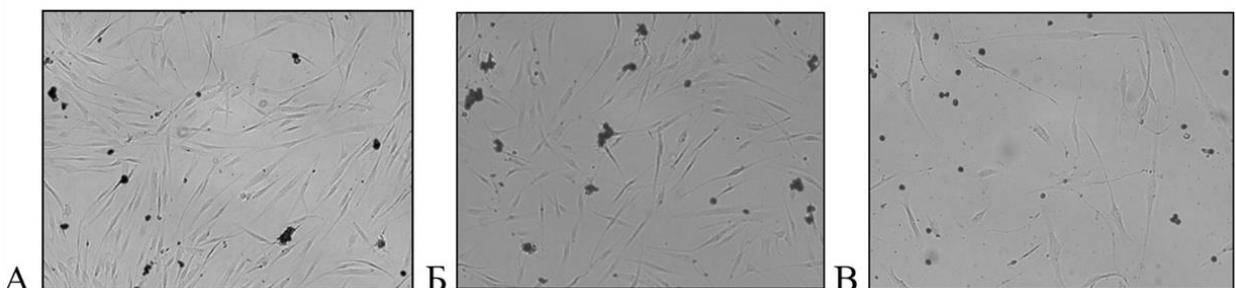


Рис. 1. Культура клеток фибробластов в группах *CulTh1* (А), *CulTh2* (Б) и *CulTh3* (В)

Увеличение: ок. 10; об. 20

Известно, что DMSO-криоконсервация влияет на все структурные компоненты клеток, в том числе ядра. По литературным данным известно, что при

криоконсервации в клетках происходит термодинамическая дестабилизация ядрышковых компонентов, денатурация ключевых ядрышковых белков (нуклеофозмин, фибрillin), нарушение жидкокфазной сепарации ядрышковых субкомпартментов [1; 6]. Нами выявлено, что после DMSO-криоконсервации в течение 2 и 4 недель снижается количество клеток с 6 ядрышками и увеличивается количество клеток с 2–4 ядрышками (Рис. 2А, Б). В группе с DMSO-криоконсервацией в течение 6 недель снижается не только количество клеток с 5 и 6, но и с 4 ядрышками, с одновременным увеличением количества клеток с 2 ядрышками (рис. 2В). Что свидетельствует о снижении синтетической активности клеток по мере увеличения времени DMSO-криоконсервации.

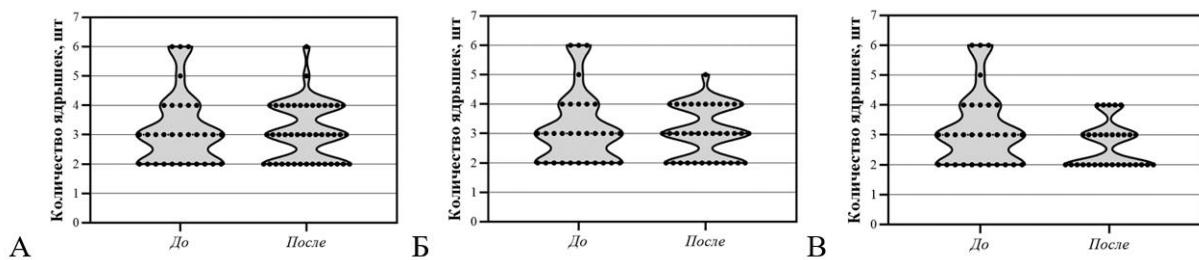


Рис. 2. Количество ядрышек в клетках до DMSO-криоконсервации (ДО) и после DMSO-криоконсервации (После) в группах *CulTh1* (А), *CulTh2* (Б) и *CulTh3* (В)

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о наличии выраженной корреляции между продолжительностью DMSO-криоконсервации и изменением морфофункциональных характеристик дермальных фибробластов. Наблюдаемые изменения носят временной характер и проявляются в изменении формы клеток (от веретенообразной к округлой), уменьшении количества ядрышек, снижения количества отростков, что в совокупности свидетельствует о снижении пролиферативной и синтетической активности, нарушении адгезивных свойств дермальных фибробластов.

Список литературы

- Гринчук Т.М. Влияние криоконсервации на стабильность кариотипа трансформированных фибробластов легкого китайского хомячка *in vitro* / Т.М.

Гринчук, М.А. Шилина // Цитология. – 2021. – Т. 63. №1. – С. 63–73. DOI 10.31857/S0041377121010053. EDN VYZZGU

2. Фибробласты дермы в фокусе современной косметологии: старение и ответ на косметологические процедуры / Л.В. Кирсанова, Е.Р. Аравийская, М.Г. Рыбакова [и др.] // Consilium Medicum. – 2024. – Т. 26. №8. – С. 541–549.

3. Влияние длительности хранения криоконсервированных культивированных клеток кожи человека на их жизнеспособность / Н.В. Фирсова, В.А. Савельева, Н.А. Ленгесова [и др.] // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / гл. ред. Е.И. Антонова. – Чебоксары: Среда, 2023. – С. 160–167. DOI 10.31483/r-106721. EDN BYMDDL

4. Ekpo M.D., Boafo G.F., Xie J. [et al.]. Strategies in developing dimethyl sulfoxide (DMSO)-free cryopreservation protocols for biotherapeutics // Front. Immunol. – 2022. – 13:1030965.

5. Gao D. [et al.]. Mitochondrial dysfunction in cryopreserved fibroblasts: Role of antioxidants // Free Radical Biology and Medicine. – 2022. – №180. – Р. 1–10.

6. Guan H., Jia C.Y., Chen B. [et al.]. Influence of different thawing temperature on the morphology and type I collagen metabolism of the human fibroblasts processed at – 10 degrees C in vitro // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. – 2005. – №5. – Р. 370–373.

7. Humphrey S., Brown S.M., Cross S.J. Defining skin quality: clinical relevance, terminology, and assessment // Dermatol Surg. – 2021. – Vol. 47. №7. – Р. 974–981. DOI 10.1097/dss.0000000000003079. EDN LXKGLG

8. Naing A.H., Kim C.K. A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering // Biotech. – 2019. – №9 (9) : 329.