

ВЛИЯНИЕ ДМСО И ФРАКЦИИ (ДО 5 КДА) КОРДОВОЙ КРОВИ НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРЫ МСК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

(г. Харьков)

Работа выполнена согласно плану НИР ИПКиК НАН Украины в отделе биохимии холодовой адаптации по теме №55 «Дослідження репаративної дії низькомолекулярної фракції з кордової крові на криоконсервовані клітини», № гос. регистрации 0010U000403.

Вступление. В современной медицине все более популярным становится такое направление как регенеративная медицина с применением аутологичных мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Для получения суспензии МСК, вводимой пациенту, необходима была разработка методов их выделения, накопления и длительного хранения без потери уникальных свойств. Наиболее удобным способом длительного хранения клеточных суспензий на сегодняшний день является криоконсервирование, а наиболее популярным криопротектором – диметилсульфоксид (ДМСО). Его преимуществом является быстрое проникновение внутрь клеток и формирование устойчивых водородных связей с жидкой фазой. Однако рядом авторов было показано, что ДМСО помимо эффективного криозащитного действия, обладает также выраженной цитотоксичностью [10, 17, 19]. Взаимодействуя с белками и липидами, он меняет структурные свойства клеточных мембран. После контакта с ДМСО, происходит изменение ростовых свойств клеточных культур [2, 9].

В наших предыдущих исследованиях было показано, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови КРС при добавлении в среды культивирования способна стимулировать рост как нативных [4], так и деконсервированных клеточных культур [6], а также различные функциональные показатели фагоцитов донорской крови [5, 14].

Целью данной работы было изучить влияние фракции (до 5 кДа) кордовой крови на ростовые свойства культуры МСК после ее эквilibрации в среде, содержащей ДМСО.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служили МСК, полученные из костного мозга [16] лабораторных крыс. Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів

експериментів на тваринах», утвержденных Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Использовали клетки на 3-4 пассажах после получения. Эквilibрацию суспензии клеток проводили при комнатной температуре (20-22°C) в криопробирках в течение 30 минут в среде, содержащей 95% фетальной бычьей сыворотки крови (FBS) и 5% ДМСО. Концентрация клеток составляла 10^6 кл/мл. После окончания эквilibрации клеточную суспензию отмывали от криопротектора средой DMEM и удаляли ДМСО с помощью центрифугирования. Культивирование МСК проводили в матрасах S 75см² в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% FBS. Посевная концентрация составляла 10^4 кл/см².

Фракцию с молекулярным весом компонентов ниже 5 кДа (ФКК) получали методом ультрафильтрации из цельной кордовой крови КРС, подвергнутой криодеструкции. Полученный объем ФКК лиофилизировали и перед применением разводили средой DMEM из расчета 40 мг/мл. ФКК добавляли в среду культивирования МСК в различных концентрациях: от 28 мкг/мл до 400 мкг/мл. Контролем служил рост культуры МСК без добавления ФКК.

Ростовые свойства культуры оценивали по показателям ИП (индекс пролиферации) и МИ (митотический индекс). ИП – отношение количества снятых на 3 сутки культивирования клеток к количеству посеянных, посчитанных стандартным лабораторным методом в счетной камере Горяева. МИ – количество делящихся клеток на 1000 посчитанных (%), которое проводили в фиксированных на 3 сутки роста и окрашенных гематоксилином Каррачи препаратах [1]. Параллельно с МИ определяли количество патологических митозов. Прижизненную оценку морфологии культуры проводили визуально под инвертированным микроскопом.

Статистический анализ экспериментальных данных проводили по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Уровень достоверности составлял 0,05.

Результаты исследований и обсуждение. При культивировании МСК после эквilibрации в среде, содержащей 5% ДМСО, было отмечено снижение ростовых свойств культуры. ИП на 3 сутки составил 70% от ростовых показателей до эквilibрации.

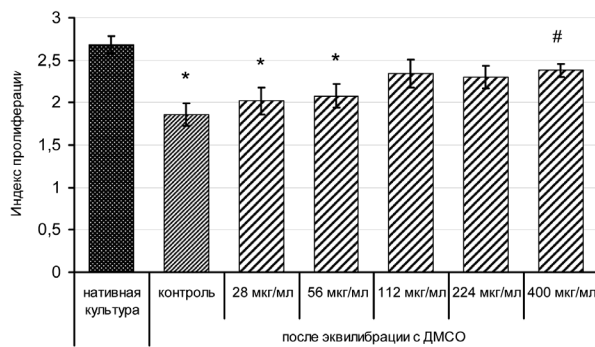


Рис. Прирост клеток на 3-и сутки при культивировании МСК в средах, содержащих различные концентрации ФКК, после эквипирации в среде с 5% ДМСО (n = 5).

Примечание: * – различия статистически достоверны по отношению к показателю нативной культуры ($p < 0,05$); # – различия статистически достоверны по отношению к контролю после эквипирации с ДМСО ($p < 0,05$).

Причины такого значительного снижения количества МСК в культуре в указанные сроки культивирования могут быть различными. Так, было показано, что значительное снижение жизнеспособности клеток фетальной печени происходит на этапе отмывки их от ДМСО [11]. Кроме того, вследствие изменений структуры плазматической мембраны под влиянием ДМСО вероятно происходит нарушение адгезии клеток к поверхности культурального пластика. Причем нарушение может касаться не столько количественных, сколько морфологических изменений клеток. Поскольку ДМСО меняет свойства белковых компонентов мембран это может приводить к изменению свойств рецепторов адгезии – интегринов, и снижать их способность к взаимодействию как с белками внеклеточного матрикса, так и с актиновыми филаментами цитоскелета. При значительных нарушениях процессов адгезии блокируется чувствительность клетки к действию митогенов [12] и, следовательно, не начинается ее митотическое деление. Более позднее начало деления клеток, взаимодействовавших с ДМСО, по сравнению с контролем может быть одной из причин отмеченного снижения ростовых показателей в данном варианте. Взаимодействие ДМСО с белками и липидами мембран может приводить также к нарушению окислительного фосфорилирования, и как следствие, снижению энергетического обеспечения клеток [8, 13, 18]

При добавлении ФКК в концентрациях 28 и 56 мкг/мл ростовой среды ИП культуры оставался

достоверно ниже, чем в нативной культуре (рис.). Его нормализация наблюдалась в диапазоне концентраций ФКК 112 – 400 мкг/мл. Однако достоверные отличия от контроля после эквипирации клеток с ДМСО были получены только в варианте с добавлением ФКК в концентрации 400 мкг/мл. Ранее, нами было показано снижение показателей роста культуры фибробластов человека и перевиваемой линии ВНК-21 slope 13 после полного цикла криоконсервирования до 50% и 40% относительно нативных показателей соответственно [6].

Как можно видеть, в результате взаимодействия клеток с ДМСО в ходе обязательной эквипирации перед началом снижения температуры, уже происходят значительные нарушения, вызывающие снижение ростовых показателей клеточных культур. Однако, в отличие от повреждений, вызванных действием низких температур, они являются обратимыми. Об этом свидетельствует тот факт, что добавление ФКК нормализует рост культуры МСК после действия ДМСО, в то время как после криоконсервирования добавление ФКК в ростовые среды улучшает ростовые показатели культур, однако они остаются ниже, чем в нативных культурах [13].

Изучение МИ, посчитанного на 3 сутки культивирования, не выявило достоверного изменения количества делящихся клеток после эквипирации их с ДМСО или культивирования в присутствии ФКК (табл.).

Доля клеток, имеющая различные патологии деления, в культуре МСК велика и может достигать 40%. В исследованные нами сроки достоверных отличий между долей патологических митозов в разных вариантах обнаружено не было. Однако визуальная оценка состояния культуры в первые часы после эквипирации с ДМСО, его удаления и посева в культуральные флаконы выявила морфологические отличия клеток данных вариантов от нативной культуры. Это выразилось в вакуолизации ядер и цитоплазмы, изменении цитоплазмально-ядерного отношения, формы ядер и клеток.

Нормализация морфологии МСК наблюдалась через 24 часа культивирования. Достоверного влияния ФКК на скорость нормализации морфологии клеток и долю патологических митозов в культуре обнаружено не было.

В наших предыдущих исследованиях мы делали вывод о важной роли ФКК в среде культивирования как ростостимулирующего фактора, способного увеличивать скорость роста клеточных культур за счет ускорения протекания всех процессов адгезии

Таблица

Митотический индекс культуры МСК на 3-и сутки роста в средах, содержащих различные концентрации ФКК, после эквипирации в среде с 5% ДМСО

Вариант	Нативная культура (n=5)	После эквипирации с ДМСО (n=4)					
		контроль	ФКК 28 мкг/мл	ФКК 56 мкг/мл	ФКК 112 мкг/мл	ФКК 224 мкг/мл	ФКК 400 мкг/мл
МИ (‰)	14,5 ± 1,04	11,0 ± 1,96	10,5 ± 1,08	11,0 ± 1,35	12,5 ± 1,55	14,5 ± 1,32	13,75 ± 1,89

клеток и активации митотического деления. Также в ряде работ мы показали прямое стимулирующее влияние ФКК на энергетический метаболизм клеток [3, 7, 15]. Очевидно, что оба эти механизма действия ФКК позволяют нормализовать нарушения в клетках, возникшие в результате взаимодействия с ДМСО на этапе эквilibрации, и восстанавливать рост культуры МСК.

Выводы. Таким образом, в ходе проведенных исследований было показано, что после контакта суспензии МСК с ДМСО в 5%-ной концентрации, происходит достоверное снижение ростовых показателей культуры и морфологические изменения клеток, которые наиболее выражены в первые 24 часа культивирования. Добавление низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови в

концентрации 400 мкг/мл в среду культивирования МСК позволяет нормализовать нарушенные вследствие действия ДМСО показатели роста культуры и не оказывает влияния на наблюдаемые морфологические изменения клеток.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшей работе будет изучено влияние криоконсервирования на ростовые свойства культуры МСК. Данные, представленные в этой статье, позволят оценить эффективность различных программ замораживания и их вклад в наблюдаемые изменения ростовых свойств культуры МСК после криоконсервирования, а также приблизиться к пониманию механизма восстанавливающего действия низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови.

Литература

1. Блюмкин В. Н. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клетки / В. Н. Блюмкин, В. М. Жданов. – М.: Медицина, 1973. – 267 с.
2. Глушко Т. А. Особенности пролиферации клеточных культур после контакта с криопротекторами : автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 «Криобиология» / Т. А. Глушко – Харьков, 1983. – 22 с.
3. Гулевский А. К. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота / А. К. Гулевский, В. И. Грищенко, Н. Н. Моисеева [и др.] // Доповіді НАН України. – 2008. – №2. – С. 157–160.
4. Гулевский А. К. Стимулирующее действие фракции до 5 кДа кордовой крови и «Актовегина» на рост перевиваемых культур клеток / А. К. Гулевский, А. В. Трифонова, А. А. Лаврик // Цитология. – 2011. – Т. 53, №2. – С. 135–141.
5. Гулевский А. К. Реабилитирующая среда для мононуклеарных фагоцитов после криоконсервирования / А. К. Гулевский, Н. Н. Моисеева, О. Л. Горина, Л. А. Бабийчук // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2012. – №2. – С. 13-18.
6. Гулевский А. К. Стимуляция восстановления криоконсервированных клеточных культур фракцией (до 5 кДа) кордовой крови крупного скота или препаратом актовегин / А. К. Гулевский, А. В. Трифонова, А. А. Лаврик // Цитология. – 2013. – Т. 55, №9. – С. 619-625.
7. Гулевский А. К. Исследование механизма действия низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа) / А. К. Гулевский, Ю. С. Ахатова // Биология – XXI века: 17 Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых (21-26 апреля 2013 г.) – Пущино, 2013. – С. 258
8. Петренко А. Ю. Особенности ионного транспорта и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс после замораживания-отогрева : автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 03. 00. 22 «Криобиология» / А. Ю. Петренко. – Харьков, 1984. – 23 с.
9. Петренко Т. Ф. Влияние криоконсервирования на морфо-функциональные свойства клеток перевиваемых культур : автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 «Криобиология» / Т. Ф. Петренко – Харьков, 1986. – 16 с.
10. Пушкарь Н. С. Криопротекторы / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус, Ю. В. Калугин. – Харьков, 1978. – 202 с.
11. Скоробогатова Н. Г. Криоконсервирование фибробластоподобных клеток-предшественников эмбриональной печени человека : автореф. дис. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 03.00.22 «Криобиология» / Н. Г. Скоробогатова – Харьков, 2007. – 20 с.
12. Folkman J. Role of cell shape in growth control / J. Folkman, A. Moscona // Nature. – 1978. – Vol. 273, № 5661. – P. 345-349.
13. Fuller B. J. The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation / B. J. Fuller, A. Rubinacci, K. Geboes, W. De Loecker // Cryobiology. – 1989. – Vol. 26, №4. – P. 333-340.
14. Gulevsky A. K. Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils / A. K. Gulevsky, N. N. Moiseyeva, O. L. Gorina // CryoLetters. – 2011. – Vol. 32, №2. – P. 131-140.
15. Gulevskyy O. K. Influence of Lyophilized Low-Molecular (below 5 kDa) Fraction from Cord Blood Cryohemolysate on ATP Content in Native and Cryopreserved Leukocytes / O. K. Gulevskyy, Yu. S. Akhatova, A. A. Sysoev [et al.] // The International Conference of the Society for Low Temperature Biology (October 6 to 9, 2013). – Hannover, Germany. – 2013. – P. 70.
16. Owen M. Marrow stromal stem cells / M. Owen // J. Cell Science Suppl. – 1988. – № 10. – С. 63-76.
17. Rowley S. D. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade / S. D. Rowley, Z. Feng, D. Yadock [et al.] // Cytotherapy. – 1999. – Vol. 1, №6. – P. 439-446.
18. Sakurada M. Mitochondrial energy synthesis during cold preservation and after reperfusion in liver transplantation / M. Sakurada, N. Okochi, H. Kato [et al.] // Nihon Geka Gakkai Zasshi. – 1992. – Vol. 93, №7. – P. 709-715.
19. Sperling S, Larsen IG. Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium in vitro / S. Sperling, I. G. Larsen // Acta. Ophthalmology (Copenh). – 1979. – Vol. 57, №5. – P. 891-898.

УДК 611.018.21.6:547.569.2:612.649.011.87

ВПЛИВ ДМСО ТА ФРАКЦІЇ (ДО 5 КДА) КОРДОВОЇ КРОВІ НА РОСТОВІ ВЛАСТИВОСТІ КУЛЬТУРИ МСК
Гулевський О. К., Лаврик О. А., Трифонова Г. В.

Резюме. Метою роботи було вивчити вплив фракції (до 5 кДа) кордової крові на ростові властивості культури МСК після її еквілібрації у середовищі, що містить ДМСО. Показано, що після контакту суспензії МСК із ДМСО у 5%-ої концентрації, відбувається вірогідне зниження ростових показників культури та морфологічні зміни клітин, які найбільш виражені у перші 24 години культивування. Додавання фракції (до 5 кДа) кордової крові у концентрації 400 мкг/мл у середовище культивування МСК дозволяє нормалізувати порушені унаслідок дії ДМСО показники росту культури та не впливає на морфологічні зміни клітин.

Ключові слова: еквілібрація, культивування, ДМСО, фракція (до 5 кДа) кордової крові, МСК.

УДК 611.018.21.6:547.569.2:612.649.011.87

ВЛИЯНИЕ ДМСО И ФРАКЦИИ (ДО 5 КДА) КОРДОВОЙ КРОВИ НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРЫ МСК
Гулевский А. К., Лаврик А. А., Трифонова А. В.

Резюме. Целью работы было изучить влияние фракции (до 5 кДа) кордовой крови на ростовые свойства культуры МСК после ее эквilibрации в среде, содержащей ДМСО. Показано, что после контакта суспензии МСК с ДМСО в 5%-ной концентрации, происходит достоверное снижение ростовых показателей культуры и морфологические изменения клеток, которые наиболее выражены в первые 24 часа культивирования. Добавление фракции (до 5 кДа) кордовой крови в концентрации 400 мкг/мл в среду культивирования МСК позволяет нормализовать нарушенные вследствие действия ДМСО показатели роста культуры и не оказывает влияния на наблюдаемые морфологические изменения клеток.

Ключевые слова: эквilibрация, культивирование, ДМСО, фракция (до 5 кДа) кордовой крови, МСК.

UDC 611.018.21.6:547.569.2:612.649.011.87

The Influence of DMSO and a Fraction (below 5 Kda) from Cord Blood on MSC Culture Growth
Gulevsky A. K., Lavrik A. A., Trifonova A. V.

Abstract. The study aim was to estimate the influence of a fraction (below 5 kDa) from cord blood on MSC culture growth after equilibration with dimethyl sulfoxide (DMSO).

Materials and Methods. MSC were obtained from rat bone marrow and used at the 3rd – 4th passages. Equilibration of cell suspension was carried out at 20-22°C for 30 minutes in medium with 95% FBS (fetal bovine serum) and 5% DMSO. Cell concentration was 10⁶ cells/mL. DMSO was removed by centrifugation. MSC were cultivated in growth medium DMEM/F12 (1:1) with 10% FBS. Seeding concentration was 10⁴ cells/cm². The fraction (below 5 kDa) was extracted from cattle whole cord blood by ultrafiltration (CBF). It was added to MSC growth medium in the concentrations of 28 µg/mL to 400 µg/mL. Growth properties were estimated in terms of PI (Proliferation Index) and MI (Mitotic Index). The number of pathological divisions and cell morphologic characteristics were also estimated.

Results and Discussion. The growth properties of MSC culture deteriorated after equilibration with 5% DMSO. PI was 70% of the pre-equilibration value. Possibly, it was associated with cytoplasmic membrane alterations, which damaged cell adhesion. This resulted in a later start of cell divisions as compared with the control. Therefore, it may be a cause of growth property deterioration of MSC culture after contact with DMSO. Interactions of DMSO with membrane proteins and lipids impaired oxidative phosphorylation and, as a consequence, cell energy.

If CBF was added in the concentration of 28 µg/mL or 56 µg/mL, the PI was significantly lower as compared with native culture. The addition of CBF in the concentration range from 112 µg/mL to 400 µg/mL resulted in normalization of MSC culture growth. However, a significant difference from the native PI was found for the variant with 400 µg/mL CBF. As one can see, the cell damage after equilibration with DMSO was reversible, and cells may recover.

At the 3rd day MI in the variant after equilibration with DMSO didn't differ from native or CBF variants. The percentage of pathological divisions of native MSC culture was about 40%. No significant difference in the number of pathological divisions between all variants was found. Morphological differences were found in the variants with DMSO and CBF as compared with the control. They were manifested as cytoplasmic and nuclear vacuolations, changes of cell and nucleus shapes and nucleus-cytoplasm ratio. The cell morphology normalized after 24-h cultivation. CBF didn't influence recovery rate of cell morphological abnormalities and the number of pathological divisions.

Previously, it was shown that CBF affected cell cultures as a growth-stimulating factor. It increased cell culture growth via accelerating cell adhesion and activating mitosis. We also showed a direct stimulating effect of CBF on cell energy metabolism. So, both of the mechanisms could ameliorate cell damage after DMSO contact and contribute to recovery of cell culture growth.

Conclusions. MSC culture growth indices significantly decreased after contact with 5% DMSO. Cell morphological abnormalities caused by DMSO were the most manifested within the first 24 h of cultivation. The fraction (below 5 kDa) from cord blood at the concentration of 400 µg/mL normalized the MSC culture growth indices affected by contact with DMSO and did not influence cell morphological abnormalities.

Keywords: equilibration, cultivation, DMSO, fraction (below 5 kDa) from cord blood, MSC.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.

Стаття надійшла 4. 06. 2014 р.