

УДК: 57.085.23:615.361.018.5.013.8

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНУЮ ФРАКЦИЮ КОРДОВОЙ КРОВИ

А. К. Гулевский¹
А. В. Трифонова¹
Т. Ф. Петренко¹
А. А. Лаврик²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков
²Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов УААН, Киев

E-mail: trifonova_ann@rambler.ru

Изучено влияние низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции, полученной из кордовой крови крупного рогатого скота, и препарата сравнения Актовегин на адгезивные свойства диплоидной культуры эмбриональных фибробластов человека и перевиваемой линии ВНК-21 clone 13. Показано, что включение указанных препаратов в состав регенерационных сред повышает эффективность прикрепления криоконсервированной перевиваемой линии и не влияет на количество прикрепленных клеток криоконсервированной диплоидной культуры, а также увеличивает скорость распластывания и принятия характерной морфологии на подложке клеток изученных культур. Установлена более высокая эффективность по исследуемым показателям фракции кордовой крови в составе регенерационных сред по сравнению с Актовегином.

Ключевые слова: низкомолекулярная фракция кордовой крови, культуры клеток, криоконсервирование, регенерационные среды, адгезия.

Актуальной задачей биотехнологии клеточных культур является необходимость создания запасов полноценного экспериментального и клинического материала для научных исследований, медицины [1, 2] и ветеринарии [3]. В настоящее время криоконсервирование является методом, способным обеспечить длительное сохранение клеток животных, в то время как поддержание культур клеток их постоянным пассированием связано с опасностью потери ценных биологических свойств и контаминации посторонними агентами [4, 5].

Для обеспечения максимальной сохранности клеточных культур разработано большое количество протоколов криоконсервирования, учитывающих индивидуальные особенности различных видов и типов клеток [6, 7]. Однако даже при оптимальных условиях криоконсервирования в сохранившихся клетках обнаруживаются нелетальные повреждения, которые существенно снижают биологические свойства клеточных культур [4, 8]. Поэтому необходим поиск регенерационных сред, способных активировать восстановительные процессы в клетках после криоконсервирования.

Существующие на сегодняшний день подходы для восстановления повреждений, полученных клетками в результате криоконсервирования, включают в себя применение мембраностабилизирующих веществ [9], повышение энергетики клетки путем внесения дополнительных субстратов энергетического обмена [10], добавление различных ростостимулирующих факторов [11].

В наших предыдущих исследованиях была показана высокая биологическая активность низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота (КРС) как *in vivo* [12, 13], так и *in vitro* [14]. В связи с этим перспективным для клеток, подвергнутых процедуре криоконсервирования, является изучение действия фракции кордовой крови (ФКК) до 5 кДа при ее включении в состав регенерационных сред.

Материалы и методы

Исследования были выполнены на диплоидной культуре эмбриональных фибробластов человека (ФЧ) [15] на 4–6 пассажах и перевиваемой линии ВНК-21 clone 13. Клетки культивировали и криоконсервиро-

вали по общепринятым методикам [6]. Посевная концентрация: $8-10 \cdot 10^4$ кл./мл.

Выделение фракции с молекулярной массой компонентов до 5 кДа из кордовой крови КРС проводили методом ультрафильтрации [16]. На первом этапе собранную от нескольких животных кровь смешивали и подвергали процедуре медленного замораживания–оттаивания для достижения наиболее полного разрушения клеточных элементов. Затем обработанную таким образом кровь фильтровали с использованием мембранного модуля Vivaflow-200 фирмы Sartorius (Германия). Полученную фракцию лиофилизировали. Перед применением сухую фракцию разводили 0,9%-м раствором NaCl из расчета 40 мг/мл.

Препаратом сравнения служил Актовегин (Nuscamed, Австрия), изготовленный на основе фракции до 5 кДа крови молочных телят с содержанием сухого вещества 40 мг/мл [17]. ФКК и Актовегин добавляли в ростовую среду культур клеток во время их посева в культуральные флаконы в концентрации, которая, как было показано в наших предыдущих работах [14], оказывает максимальный стимулирующий эффект: для линии ВНК-21 clone 13 — 1,4 мкл/мл, для диплоидной культуры ФЧ — 5,6 мкл/мл.

Об адгезивных свойствах клеточных культур судили по двум показателям: эффективности прикрепления клеток и скорости их распластывания. Эффективность прикрепления определяли, подсчитывая неприкрепившиеся клетки через 24 ч после посева [18].

Скорость распластывания устанавливали по количеству клеток, находящихся в разной степени распластности. Клетки высевали во флаконы со стеклами, инкубировали в стандартных условиях. Через 1,5; 3, 5 и 24 ч клетки фиксировали раствором Буэна с последующей окраской гематоксилином и 0,1%-м раствором эозина. Готовили постоянные препараты. Степень распластности клеток оценивали визуально в световом микроскопе при увеличении $\sim 10 \times \text{об.}100$.

Прижизненную оценку морфологии клеток монослоя проводили с помощью инвертированного микроскопа фирмы Zeiss через 24 ч роста культуры.

Результаты и обсуждение

Известно, что начальным этапом роста монослойных клеточных культур является их адгезия на подложке [19]. Это — необходимое условие для дальнейшего роста куль-

туры, отражающее также функциональное состояние клеток. Показано, что клеточная адгезия — это активный многостадийный процесс, зависящий от ряда событий, таких как связывание рецепторов с их лигандами или субстратом, цитоскелетные перестройки и формирование фокальных контактов, которые необходимы для усиления прикрепления [20]. В условиях монослойного культивирования этот процесс представляет собой ряд последовательных событий, начинающихся с прикрепления клеток к подложке и завершающихся распластыванием с приобретением характерной морфологии клеток.

Полученные экспериментальные данные об эффективности прикрепления ФЧ к подложке позволили установить в выбранных нами условиях, что в нативной культуре этот показатель составлял $59 \pm 3\%$ от количества посеянных клеток. Добавление ФКК и Актовегина не вызывало достоверных отличий от контроля (табл. 1). Установлено также, что криоконсервирование по выбранной программе не приводит к достоверным изменениям в эффективности прикрепления ФЧ относительно нативной культуры. ФКК и Актовегин в культуре после криоконсервации не оказывали влияния на этот показатель относительно контроля.

Таблица 1. Эффективность прикрепления культуры ФЧ через 24 ч после начала культивирования ($n = 6$), %

Культура	Контроль	С добавлением ФКК	С добавлением Актовегина
Нативная	59 ± 3	$63 \pm 0,6$	$58 \pm 0,6$
После криоконсервации	61 ± 2	63 ± 2	59 ± 3

Эффективность прикрепления нативной культуры ВНК-21 clone 13 составляла $90,2 \pm 0,4\%$. После криоконсервирования этот показатель достоверно снижался до $83,6 \pm 2\%$. В нативной культуре ФКК и Актовегин не оказывали влияния на количество прикрепленных клеток. Вместе с тем было обнаружено, что добавление ФКК и Актовегина в среду культивирования изучаемой переживаемой линии после криоконсервирования способствовало сохранению эффективности прикрепления клеток на уровне нативной культуры (табл. 2).

Таблица 2. Эффективность прикрепления линии ВНК-21 clone 13 через 24 ч после начала культивирования (n = 8), %

Культура	Контроль	С добавлением ФКК	С добавлением Актотеина
Нативная	90,2 ± 0,5	89 ± 0,7	87,7 ± 1*
После криоконсервации	83,6 ± 2	90 ± 1,9*	90 ± 1,7*

Примечание. * — различия статистически достоверны по сравнению с контролем (p < 0,05).

Для оценки физиологического состояния клеток и дальнейшего роста культуры количественный учет прикрепившихся клеток целесообразно дополнить исследованием их морфофункциональных свойств.

Изучение морфологии клеток на подложке проводили в культуре ФЧ, где по окончании процесса распластывания клетки приобретают выраженную веретенообразную форму. Подсчет всех клеток, проявляющих признаки распластывания, но находящихся на различных стадиях — от начальных до конечных, показал, что в нативной культуре общее количество распластанных клеток уже через 1,5 ч составляло 96,6 ± 0,25% и в последующие 3, 5 и 24 ч существенно не изменялось. Добавление ФКК и Актотеина в среду культивирования не вызывало достоверных отличий этого показателя от контроля во все исследуемые сроки (рис. 1).

Отдельный учет клеток, принявших веретенообразную форму, показал значительные отличия в скорости распластывания опытных и контрольных образцов. Так, в контроле количество веретенообразных клеток через 1,5 ч культивирования было 10,8 ± 0,73%. К 3 ч оно составило 23 ± 2,02%, к 5 ч — 35 ± 1,61% и к 24 ч достигло 75,6 ± 0,75%, что составило 77% относительно общего количества распластанных клеток. Добавление ФКК в среду культивирования достоверно повышало количество веретенообразных клеток относительно контроля начиная с 3 ч роста культуры — на 15,4%; через 5 ч — на 18% и через 24 ч — на 13,6%. Количество веретенообразных относительно общего количества распластанных клеток под влиянием ФКК составило 90%, и достоверно превышало этот показатель в контроле. Стимулирующее действие Актотеина на степень распластности ФЧ было менее выраженным. Достоверные отличия

от контроля по количеству веретенообразных клеток отмечены начиная с 5 ч роста культуры (рис. 1).

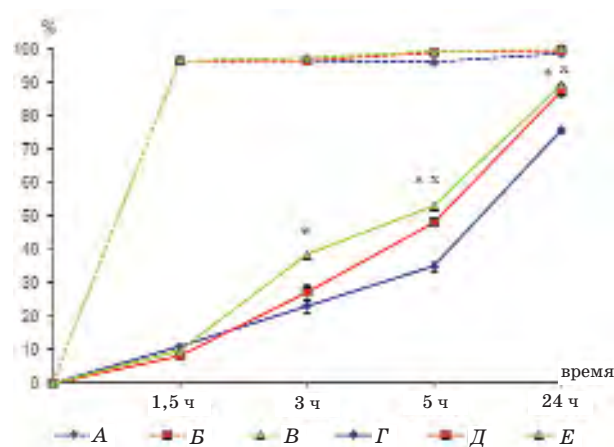


Рис. 1. Динамика распластывания нативной культуры ФЧ при добавлении ФКК и Актотеина в среду культивирования (n = 5).

Общее количество распластанных клеток: А — контроль; Б — при добавлении Актотеина; В — при добавлении ФКК.

Количество веретенообразных клеток: Г — контроль; Д — при добавлении Актотеина; Е — при добавлении ФКК.

* — различия статистически достоверны для варианта с добавлением ФКК по сравнению с контролем (p < 0,05).

X — различия статистически достоверны для варианта с добавлением Актотеина по сравнению с контролем (p < 0,05)

Таким образом, нами обнаружено стимулирующее действие ФКК на скорость распластывания нативной культуры ФЧ, которое достоверно проявляется через 3 ч после посева и сохраняется до 24 ч. Стимулирующее действие Актотеина проявляется в более поздние сроки и достигает уровня действия ФКК только к 24 ч роста культуры.

Известно, что в процессе криоконсервирования на всех этапах клеточная система испытывает негативное воздействие различных физико-химических факторов. При дальнейшем культивировании показано нарушение адгезивных свойств у различных клеточных культур [7].

Общее количество распластанных клеток диплоидной культуры ФЧ после криоконсервации через 1,5 и 3 ч роста культуры было значительно снижено и составляло 45,2 ± 1,77% и 70 ± 1,4% соответственно (рис. 2). К 24 ч роста культуры этот показатель достигал 92,4 ± 0,5%, однако оставался достоверно ниже, чем в эти же сроки в нативной культуре. Добавление ФКК в среду

культивирования ФЧ после криоконсервации стимулировало распластывание клеток на подложке. Через 1,5 и 3 ч роста культуры общее количество клеток под влиянием ФКК достоверно превышало контроль и составляло $54 \pm 1\%$ и $81 \pm 1,4\%$ соответственно. К 24 ч достоверных отличий от контроля обнаружено не было. Действие Актовегина на этот показатель было аналогичным.

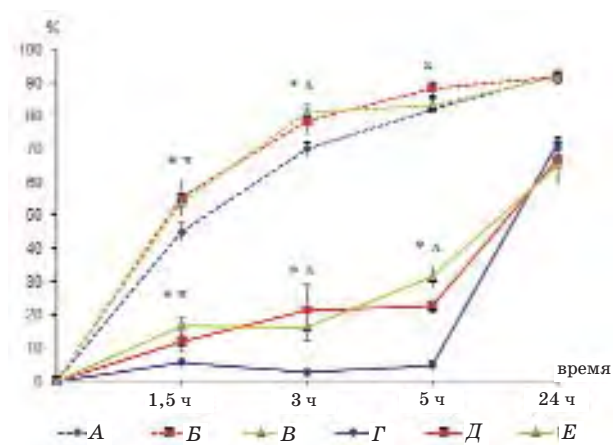


Рис. 2. Динамика распластывания культуры ФЧ после криоконсервирования при ее последующем культивировании в реабилитирующей среде с добавлением ФКК или Актовегина ($n = 5$).

Общее количество распластанных клеток: А — контроль; Б — при добавлении Актовегина; В — при добавлении ФКК.

Количество веретенообразных клеток: Г — контроль; Д — при добавлении Актовегина; Е — при добавлении ФКК.

* — различия статистически достоверны для варианта с добавлением ФКК по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Х — различия статистически достоверны для варианта с добавлением Актовегина по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Изучение степени распластности ФЧ после криоконсервации показало, что количество веретенообразных клеток в контроле на протяжении первых 5 ч после посева оставалось очень низким: 2,8–5,8% (рис. 2). К 24 ч роста культуры этот показатель достиг $71,2 \pm 1,46\%$ и составил 77% относительно общего количества распластанных клеток. При добавлении ФКК в среду культивирования ФЧ количество веретенообразных клеток через 1,5 ч роста культуры составляло $16,8 \pm 1,56\%$, что в 2,8 раза выше, чем в контроле. К 5 ч этот показатель при добавлении ФКК превышал контроль в 6,5 раза. Однако через 24 ч роста культуры ФЧ после криоконсервации количество веретенообразных клеток при добавлении ФКК

достоверно не отличалось от контроля. Относительно общего количества распластанных клеток этот показатель достигал 74%. Актовегин оказывал аналогичное, но менее выраженное действие на степень распластности ФЧ.

Таким образом, установлено, что при культивировании диплоидной культуры ФЧ после криоконсервирования ФКК оказывает стимулирующее действие на скорость распластывания клеток, выраженное на начальных этапах — в первые 5 ч роста культуры.

При визуальном наблюдении за процессом распластывания клеток линии ВНК-21 clone 13 были выявлены те же закономерности, что и в случае ФЧ. Как следует из рис. 3, через 24 ч роста в культуре после криоконсервации преобладают сферические клетки, проявляющие признаки распластывания. В небольшом количестве встречаются клетки округлой формы без признаков распластывания. При культивировании клеток этой линии после криоконсервации в среде с добавлением ФКК и Актовегина количество клеток, имеющих на подложке характерную для этой культуры морфологию, увеличивается, однако распластанных клеток сферической формы остается довольно много. Количество же прикрепленных нераспластанных клеток уменьшается (рис 3).

Вероятно, отсутствие характерных признаков распластывания клеток в течение первых суток после посева отражает наличие в них функциональных повреждений, которые не были выявлены методами прижизненного окрашивания и учета количества изначально прикрепившихся клеток.

В настоящее время установлено, что основным механизмом действия Актовегина на клетки является улучшение транспорта и утилизации глюкозы, а также поглощения кислорода, в результате чего повышается обмен высокоэнергетических фосфатов (АТФ). В целом это выражается в стимуляции всех обменных процессов в клетке [17, 21]. Ранее [12] было показано, что, как и Актовегин, ФКК способствует снижению уровня глюкозы в крови экспериментальных животных, т. е. переходу ее из кровотока в ткани. Поэтому можно предположить, что ФКК также реализует свое стимулирующее действие, повышая скорость утилизации глюкозы клетками и их энергетический статус.

Наблюдаемое в наших экспериментах ускорение процессов адгезии при включении ФКК в состав регенерационной среды,

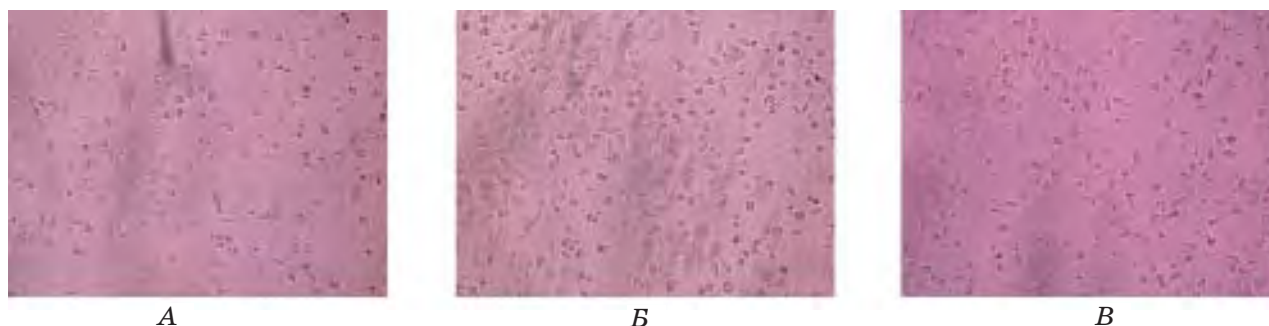


Рис. 3. Морфология клеток линии ВНК-21 clone 13 после криоконсервирования через 24 ч культивирования: А — контроль, Б — при добавлении Актовегина, В — при добавлении ФКК

показанное на различных культурах, по-видимому, связано с активацией клеточного метаболизма, нарушенного в результате криоконсервации.

Отсутствие влияния ФКК на адгезию клеток через 24 ч роста культуры может свидетельствовать о завершении процесса распластывания сохранившихся после криоконсервации клеток.

Таким образом, включение ФКК в состав регенерационной среды для культур клеток оказывает выраженное стимулирующее действие на их адгезивные свойства, что способствует сокращению сроков восстановления клеток после криоконсервирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колосов Н. Г., Повеценко О. В., Ефремов А. В. и др. Использование фетальных клеток и тканей в лечении поверхностных ран и трофических язв // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1998. — Т. 126 (Прил. 1). — С. 128–129.
2. Жилина Н. М., Иванова В. Б., Корень Н. Н. и др. Сравнительный анализ кожной автопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов // Вестн. нов. мед. техн. — 1997. — Т. IV, № 1. — С. 88.
3. Spier R. Continuous cell lines as substrates for biologicals: report of a joint meeting of WHO, IABS (cell Culture Committee Subsection), and ESACT. // Mol. Biother. — 1988. — V. 1, N 2. — P. 114–115.
4. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В. И. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия // Пробл. криобиол. — 2003. — № 2. — С. 62–83.
5. Стегній Б. Т. Біологічні властивості і проблеми стабілізації культур клітин, які використовуються в біотехнології: Автореф. дис. ... докт. вет. наук. : 16.00.03. / ІЕКВМ УААН, 1995. — 40 с.
6. Методы культивирования клеток: Сб. науч. тр. / Под ред. Г. П. Пинаева. — Л.: Наука, 1988. — 319 с.
7. Криоконсервирование клеточных суспензий: Сб. науч. тр. / Под общ. ред. А. А. Цуцаевой. — К.: Наук. думка, 1983. — 240 с.
8. Петренко А. Ю. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания-отогрева // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 24–29.
9. Виноградов В. Л., Суханов Ю. С. Стабилизация метаболизма и мембран эритроцитов в целях усовершенствования их криоконсервирования // Гематол. трансфузиол. — 1988. — № 6. — С. 44–51.
10. Kane O., George E. et al. Nine days post-thawing red cell conservation in a synthetic medium. Biochemical studies // Transfusion. — 1986. — V. 26, N 5. — P. 437–440.
11. Dairkee Sh. H., Gilbert M. W. Production of factors required for cell attachment and spreading is a constitutive property in mouse A9 cells // J. Cell. Physiol. — 1979. — V. 99, N 3. — P. 319–326.
12. Гулевский А. К., Грищенко В. И., Моисеева Н. Н. и др. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота // Доп. НАН Украины. — 2008. — № 2. — С. 157–160.
13. Гулевский А. К., Абакумова Е. С., Моисеева Н. Н. и др. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс // Укр. биохим. журн. — 2008. — Т. 80, № 2. — С. 92–99.
14. Гулевский А. К., Трифонова А. В., Петренко Т. Ф., Лаврик А. А. Воздействие фракции из кордовой крови крупного рогатого скота

- (до 5 кДа) на пролиферативну активність кліток *in vitro* после криоконсервації // Міжвідомч. тематичн. наук. зб. «Ветеринарна медицина». — 2008. — № 1. — С. 147–153.
15. Пат. 6521 UA, 7 МПК А61К35/54. Препарат «Культура диплоїдних клітин людини» для клітинної терапії / О. І. Гончарук, Т. П. Петренко, Н. О. Волкова, В. І. Грищенко. — Заявл. 20.09.2004; Опубл. 16.05.2005, Бюл. №5.
 16. Брок Т. Мембранная фильтрация. — М.: Мир, 1987. — 464 с.
 17. Нордвик Б. Механизм действия и клиническое применение препарата Актовегин // Сб. «Актовегин. Новые аспекты клинического применения». — М., 2002. — С. 18–24.
 18. *Basic Cell Culture. Practical approach. Second edition* / Ed. by J. M. Davis. — Oxford: University Press, 2001. — 381 p.
 19. Горохова Н. А. Криоконсервация культивированных фибробластоподобных клеток шлехом повільного заморожування і вітрифікації: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. : 03.00.19. / ИПКиК НАНУ, 2008. — 20 с.
 20. Pavalko F. M., Otey C. A. Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1994. — V. 205, N 4. — P. 282–293.
 21. Румянцева С. А. Фармакологическая характеристика и механизм действия Актовегина // Сб. «Актовегин. Новые аспекты клинического применения». — М. — 2002. — С. 3–9.

ВІДНОВЛЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН У РЕГЕНЕРАЦІЙНИХ СЕРЕДОВИЩАХ, ЩО МІСТЯТЬ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНУ ФРАКЦІЮ КОРДОВОЇ КРОВІ

О. К. Гулевський¹, Г. В. Трифонова¹,
Т. Ф. Петренко¹, О. А. Лаврик²

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів УААН, Київ

E-mail: trifonova_ann@rambler.ru

Вивчено дію низькомолекулярної (до 5 кДа) фракції, що отримана з кордової крові великої рогатої худоби, та препарату порівняння Актовегін на адгезивні властивості диплоїдної культури ембріональних фібробластів людини та перещеплюваної лінії ВНК-21 clone 13. Показано, що додавання зазначених препаратів до складу регенераційних середовищ підвищує ефективність прикріплення кріоконсервованої перещеплюваної лінії і не впливає на кількість прикріплених клітин кріоконсервованої диплоїдної культури, а також збільшує швидкість розшарування та прийняття характерної морфології клітин на підложці вивчених культур. Встановлено більшу ефективність за досліджуваними показниками фракції з кордової крові у складі регенераційних середовищ порівняно з Актовегіном.

Ключові слова: низькомолекулярна фракція кордової крові, культури клітин, кріоконсервування, регенераційні середовища, адгезія.

RECOVERY OF CRYOPRESERVED CELL CULTURES IN REGENERATIVE MEDIA CONTAINING LOW-MOLECULAR FRACTION FROM CORD BLOOD

O. K. Gulevsky¹, H. V. Trifonova¹,
T. F. Petrenko¹, O. A. Lavrik²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

²State Research Control Institute of Biotechnology and Microorganisms Strains, Kyiv

E-mail: trifonova_ann@rambler.ru

The influence of the low-polymeric fraction below 5 kD extracted from cattle cord blood and Actovegin upon adhesive properties of diploid culture of human embryonic fibroblasts and continuous cell line ВНК-21 clone 13 was studied. It was shown that adding of the above-mentioned preparations to regenerative medium compositions increased efficiency of attachment of cryopreserved continuous line and did not affect the number of attached cells of cryopreserved diploid culture. It also enhanced the rate of cell spreading on substrate and assuming the typical morphology by cell of the cultures investigated on a substrate. A higher efficiency of cord blood fraction compared to Actovegin in regenerative media was demonstrated by indices assessed.

Key words: low-molecular fraction from cord blood, cell cultures, cryopreservation, regenerative media, adhesion.