

ОЦІНЮВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДИК КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ТА РОЗМОРОЖУВАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Палій І.Р.^{1,2}, Довгалюк А.І.², Дробик Н.М.¹

¹ Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка

² Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

E-mail: ilona.smola24@gmail.com

Сьогодні в клітинній терапії використовують стовбурові клітини як дорослого організму, так й отримані з постнатального матеріалу клітини, особливе місце серед яких посідають мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). Це пов'язано, насамперед, з їх порівняно низькою імунногенністю, здатністю диференціюватися в декілька типів клітин, можливістю отримання великої кількості клітин за короткий час, відносною простотою культивування [2].

Зважаючи на перспективи клінічного застосування МСК, постає питання щодо вибору оптимального методу тривалого зберігання (кріоконсервування) людських МСК, а також умов їх розморожування. Кріоконсервація дає можливість зберігати різноманітні клітини тривалий час без прогресуючої втрати здатності до виживання. Як правило, кріозберігання проводять у рідкому азоті (-196°C) у присутності кріопротекторів для забезпечення захисту від руйнування внутрішньоклітинних структур кристаликами льоду. За таких умов біологічний матеріал можна зберігати роками і навіть десятиліттями. Однак при розморожуванні частина клітин гине [3, 4].

Метою цього дослідження був підбір оптимальних умов кріоконсервування МСК, а також визначення оптимального способу розморожування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), за якого спостерігатиметься менша втрата клітинного матеріалу та їх вищий ступінь життєздатності.

Процедуру кріоконсервації здійснювали двома способами, які відрізнялися складом спеціального середовища для заморожування та концентрацією кріопротектора. Згідно першого способу, у кріопробірці об'ємом 2 мл було внесено по 60 % клітинної суспензії: (по 2 000 000 клітин, кількість яких підраховували за допомогою гемоцитометра) у поживному середовищі ДМЕМ. Далі, щоб зменшити токсичний вплив кріопротектора на клітини, додавали спеціальне середовище для заморожування №1 (10 % поживного середовища ДМЕМ (Gibco) без антибіотиків, 20 % ембріональної сироватки FBS (Gibco), 10 % ДМСО (Sigma)) у 3 етапи по 0,3 мл. За другим способом: у кріопробірці об'ємом 2 мл вносили по 50 % клітинної суспензії (по 2 000 000 клітин) у поживному середовищі ДМЕМ. Далі додавали спеціальне середовище для заморожування №2 (15 % поживного середовища ДМЕМ₀ (Gibco) без антибіотиків, 20 % ембріональної сироватки FBS (Gibco), 10 % кондиційного середовища ДМЕМ (Gibco), 5 % ДМСО (Sigma)) у 2 етапи по 0,5 мл. Клітинні лінії позначили відповідно №1 та №2. Подальше клітинний матеріал зберігали у рідкому азоті (-196° С).

Життєздатність лінії МСК людини перевіряли після 2-місячного зберігання в рідкому азоті. Клітинний матеріал розморожували і відсоток живих клітин визначали за допомогою інвертованого мікроскопа, гемоцитометра та вітального барвника трипанового синього. Відразу після відтанення клітинної суспензії концентрація живих МСК становила у випадку клітинної лінії №1 – 37 %, а у №2 – 76 %. Ймовірно, це пов'язано з вищою у 2 рази концентрацією кріопротектора ДМСО у середовищі для заморожування №1. Далі здійснювали розморожування цих варіантів також за двома різними способами. Для цього вміст кріопробірок розділили навпіл. Згідно першого способу розмороження клітинну

суспензію з кріопротектором розводили у 10 разів поживним середовищем ДМЕМ з 10 % FBS і висаджували у культуральні флакони. Згідно другого способу розморожену клітинну суспензію відцентрифугували 5 хв при 1700 об/хв, видаляли супернатант з кріопротектором, і лише після цього осад ресуспендували у поживному середовищі ДМЕМ для подальшого вирощування у культуральному посуді. Через 24 години культивування оцінювали життєздатність МСК за їхньою проліферативною активністю. Мікроскопічний аналіз культур обох варіантів виявив, що більшість клітин прикріпились та набули типової для МСК морфології, проте у випадку клітин лінії №1, розморожених першим способом, щільність клітинної популяції (конфлюент) складала 15 %, а лінії №2 – 25 %. За протоколом здійснили заміну середовища у цьому варіанті обох ліній, щоб повністю позбутись токсичної дії ДМСО на клітини. У другому варіанті конфлюент лінії №1 сягав лише 10 %, тоді як у лінії №2 – 15 %. На 5 добу після розморожування конфлюент у варіанті десятикратного розбавлення вмісту склав: лінія №1 – 40 %, лінія №2 – 60 %, а у варіанті із центрифугованими клітинами – лінія №1 – 30 %, лінія №2 – 45 %.

Таким чином, кріоконсервація МСК у присутності кріопротектора у концентрації 5 % є ефективнішою, ніж у варіанті з 10 %. Очевидно, висока концентрація ДМСО призводить до цитотоксичних ефектів у клітинах [1]. Спосіб розморожування клітинної суспензії методом 10-кратного розведення кріопротектора виявився ефективнішим за альтернативний спосіб негайного усунення диметилсульфоксиду за допомогою центрифугування. Отже, центрифугування МСК у присутності ДМСО є шкідливішим для клітин, ніж їх вирощування впродовж 24 годин у присутності сильно розведеного розчину кріопротектора.

Список літератури

1. Best B. P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions / B. P. Best // *Rejuvenat. Res.* – 2015. – V.18, №5. – P. 422–36.
2. Fagioli F, Ferrero I. Mesenchymal stem cell manufacturing for clinical use / F. Fagioli, I. Ferrero // *Progress in Stem Cell Transplantation*. In: Taner Demirer, ed. – 2015. – Т. 7 [\[CrossRef\]](#)
3. Hennes A., Gucciardo L., Zia S., Lesage F., Lefèvre N., Lewi L., Vorsselmans A., Cos T., Lories R., Deprest J., Toelen J. Safe and effective cryopreservation methods for long-term storage of human amniotic fluid derived stem cells // *Prenat. Diagn.* – 2015. – V.35, №5. – P. 456–462.
4. Маслова О. О., Дерябіна О. Г., Пічкур Л. Д., Вербовська С. А., Акінола С. Т. Сучасні підходи до кріоконсервування клітин мезенхімального походження / О. О. Маслова, О. Г. Дерябіна, Л. Д. Пічкур та ін. // *Український нейрохірургічний журнал.* – 2017. – №1. – С. 5–10.