

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

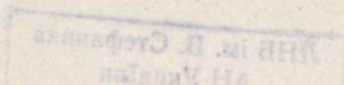
БЕЛОЧКІНА Ірина Владиславівна

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ
ПОКАЗНИКИ КУЛЬТИВОВАНИХ ПЕЧІНКОВИХ КЛІТИН
НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

03.00.22 - кріобіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Харків - 1994



Дисертація виконана в Інституті проблем кріобіології і
кріомедицини Національної Академії наук України

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор Б. П. Сандомирський

Офіційні опоненти:

Доктор медичних наук, професор Є. Я. Панков.

доктор медичних наук, професор А. А. Цуцаєва.

Ведуча установа: Харківський державний університет

Захист відбудеться "___" _____ 1994 року о ___ год.
на засіданні спеціалізованої ради Д 016.60.01 при Інституті
проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
(310015, Харків-15, вул. Переяславська, 23)

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Автореферат розісланий "___" _____ 1994 року

Вчений секретар спеціалізованої ради, доктор медичних наук,
професор А. М. Гольцев

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00777568 (1)

Актуальність. Паренхіматозні клітини печінки, що виконують більшість органоспецифічних функцій, на протязі багатьох років є моделлю для вивчення різних сторін метаболізму печінки, питань регенерації і канцерогенезу цього органу, для токсикологічних і фармакологічних досліджень. В останнє десятиліття широко досліджуються можливості застосування ізольованих гепатоцитів для тимчасового органозаміщення при захворюваннях печінки, уявляється перспективним використання їх при вроджених ензимопатіях.

Рішення названих експериментальних та клінічних задач є реальним при наявності значних запасів гепатоцитів з відомими якостями і високим функціональним потенціалом.

Низькотемпературне консервування є сьогодні майже безальтернативним засобом збереження значної кількості клітинного матеріалу без великих витрат і більш тривалий час, ніж це можливо за допомогою культивування або гіпотермічного зберігання клітин. Засоби оцінки цілості різних метаболічних функцій в суспензії гепатоцитів, що широко використовуються на протязі перших кількох годин після відігріву, не дають адекватного уявлення про можливості цих клітин до тривалого специфічного функціонування. Функціонування деконсервованих гепатоцитів після їх трансплантації в організм теоретично може вважатися найбільш переконливим показником життєздатності цих клітин, проте на практиці об'єктивна оцінка функціональних властивостей трансплантованих гепатоцитів не може бути одержана через вплив на них в цих умовах численних неконтрольованих факторів, в першу чергу, з боку імунної системи реципієнта, і неможливості реєстрації кількості життєздатних пересаджених клітин. На нинішній час абсолютним показником біологічної повноцінності ізольованих гепатоцитів може вважатися їх здатність до існування в умовах культивування з демонстрацією елементарних та специфічних функцій.

Засоби кріоконсервування розроблялися головним чином для гепатоцитів гризунів і, в меншій мірі, людини. Розширення спектру експериментальних об'єктів, що досліджуються в кріобіології, допоможе виявити видові та вікові особливості кріочутливості таких високо спеціалізованих клітин, якими є гепатоцити. Гепатоцити свині, що є твариною, структура і функції печінки якої подібні до людських, не привернули до цього часу належної уваги з боку кріобіологів; ще не вивчений вплив процесу низькотемпера-

турного консервування на ізольовані клітини печінки новонароджених поросят. Крім того, доцільність такого вивчення є очевидною як з теоретичного, так і з практичного боків, оскільки розмір порослячої печінки дозволяє вилучити значну кількість клітин.

Таким чином, метою дослідження було вивчення впливу умов низькотемпературного консервування на біологічну цілість гепатоцитів новонароджених поросят при культивуванні.

Для досягнення цієї мети мали бути вирішеними такі задачі:

- відробити умови виділення і культивування ізольованих гепатоцитів новонароджених поросят;
- оцінити адгезивні та проліферативні якості і здатність до синтезу сечовини свіжоізольованих гепатоцитів новонароджених поросят в культурі;
- вивчити вплив кріопротекторів (ДМСО, ПЕО-400, ПЕО-1500) на морфо-функціональний стан деконсервованих гепатоцитів;
- вивчити вплив швидкостей заморожування на біологічні якості деконсервованих гепатоцитів новонароджених поросят.

Наукова новизна. Клітини печінки новонароджених поросят є новим об'єктом для кріобіології. Вперше досліджено вплив різних режимів низькотемпературного консервування в використанні двох швидкостей заморожування і трьох кріопротекторів екстра- і ендодцелярною дії на структурну і функціональну цілість гепатоцитів новонароджених поросят; як тест на біологічну повноцінність клітин був використаний такий інтегральний показник, як їх здатність до існування в умовах культивування. Вперше виявлено специфічність впливу ДМСО, ПЕО-400 і ПЕО-1500 у середовищі заморожування на адгезивні якості гепатоцитів. Установлено можливість реалізації високого проліферативного потенціалу деконсервованих гепатоцитів новонароджених поросят в культурі при відсутності в середовищі гормонів і факторів росту.

Теоретичне і практичне значення.

Печінка новонароджених поросят дозволяє одержувати значну кількість клітин, які по функціональним якостям вельми подібні до людських, що становить їх цінність з точки зору клінічного застосування, оскільки в цьому випадку зменшується небезпека вірусних заражень і не постає певних етичних проблем, що існують при роботі з людським матеріалом. Розробка заходів низькотемпературного зберігання ізольованих гепатоцитів поросят дозволить задовольнити потреби експериментальної і клінічної медицини у

великій кількості цих клітин. Для кріоконсервування гепатоцитів новонароджених поросят є встановленою більш висока ефективність застосування ДМСО в концентрації 10% в порівнянні з ПЕО-400 та ПЕО-1500. Установлено оборотність зниження активності проліферації і синтезу сечовини в культурі деконсервованих гепатоцитів новонароджених поросят.

До захисту виносяться такі положення:

1. Гепатоцити поросят, нативні і після низькотемпературного консервування, здатні до активної проліферації в культурі без збагачення середовища, ростовими і гормональними факторами.

2. Існує різниця у впливі кріопротекторів ДМСО, ПЕО-400, ПЕО-1500 на адгезивні якості деконсервованих гепатоцитів новонароджених поросят. Здатність клітин до прикріплення та розпластування найбільш висока після заморожування їх з ДМСО; найменш ефективний - ПЕО-400.

3. Низькотемпературне консервування в присутності 10% ДМСО і 10% ПЕО-1500 викликає оборотне зниження активності проліферації та сечовиноутворення в культурі гепатоцитів новонароджених поросят. Потрібний певний латентний період (1-2 доби) для відновлення досліджуваних функцій до рівня контролю.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доклалися і обговорювалися на конференціях молодих вчених ІПКіК АН України (м. Харків, 1991 р., 1992 р., 1993 р.); на III Всесоюзній нараді по культивуванню клітин і тканин (м. Пушино, 1990 р.), на науково-практичній конференції "Структурно-функціональні одиниці та їх компоненти в органах вісцеральних систем в нормі і патології" (м. Харків, 1991 р.)

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 4 друковані роботи.

Обсяг і структура роботи. Дисертація викладена на 108 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, двох глав результатів власних досліджень та їх обговорення, заключення і висновків. Містить 3 таблиці і 19 малюнків. Список використаної літератури має 179 найменувань.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як об'єкт дослідження використовували печінку новонародже-

них поросят. Маса печінки складає 23 ± 4 г.

До основи методики одержання гепатоцитів покладено спосіб двохступінчастої перфузії печінки (Seglen, 1976) з використанням суміші препаратів бактеріальної (*Streptomyces* sp.) колагенази з різним ступенем очищення: 0,05% менш очищеної колагенази ГЗХ та 0,01% - Г10Х, більш очищеної (маркіровка виробника НВО "Фермент", м. Вільнюс).

Для постановки культури суспензії, що містила не менш, ніж 30% стійких до зажиттєвих барвників клітин, доводили до концентрації 150 тис клітин/мл і висівали в пластикові чашки Петрі ("Ленмедполімер") діаметром 35 мм, які були покриті плівкою колагену з сухожилля хвоста щурів, посівна доза - 450 тис клітин/чашку. Прикріплення гепатоцитів відбувалося в середовищі 199 при 37°C на протязі 1 год в умовах абсолютної вологості. Потім рідину з клітинами, що не прикріпилися, видаляли, до чашок приливали 3 мл середовища Лейбовича L-15 ("Serva") з глютаміном, доповненого 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС), пеніциліном и стрептоміцином з розрахунку 100 од/мл і 100 мг/мл відповідно. Культивування відбувалось на протязі 3-5 діб.

Кріоконсервування гепатоцитів здійснювали в сахарозному середовищі, яке додатково містило 20% ЕТС. Як кріопротектор використовували ДМСО, ПЕО-400 або ПЕО-1500. Кожний досліджуваний кріопротектор брали в концентраціях 5%, 10%, 20%. Зразки охолоджували лінійно з швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ і $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -70°C , потім переносили для збереження при -196°C в рідкий азот. Відігрівання проводили на водяній бані при $+37^{\circ}\text{C}$, після чого клітини ступенево відмивали від кріопротектора.

Життєздатність одержаної суспензії визначали через забарвлення їх вітальним барвником трипановим синім. Спостерігали також зажиттєву флуоресценцію клітин після подвійного забарвлення їх ФДА і бромідом етідія.

Ефективність посіву гепатоцитів визначали як відношення числа клітин, що прикріпились на протязі 1 години, до числа інокульованих життєздатних клітин, і виражали у відсотках. Активність прикріплення гепатоцитів оцінювали через відношення кількості клітин, що виявлялись на підложці за 1 добу культивування, до числа клітин, що прикріпилися за 1 годину після посіву. В добовій культурі нативних і деконсервованих гепатоцитів визначали частку розпластаних клітин щодо загальної кількості

прикріплених клітин.

Проліферативний потенціал культури гепатоцитів визначали за методом гістоавторадіографії по рівню включення міченого тритієм тимідину до ДНК гепатоцитів після імпульсного введення попередника.

Утворення сечовини гепатоцитами в культурі визначали за допомогою стандартного набору реактивів ("Lachema", Чехословаччина).

Локалізацію альфафетопротеїну в нативних гепатоцитах на 3-ю і 5-у добу культивування виявляли непрямим імунопероксидазним методом. Ця частина дослідження здійснювалась на базі Інституту канцерогенеза ВОНЦ РАН (м. Москва) в лабораторії імунохімії, де було люб'язно надано усі необхідні матеріали і методичну допомогу.

Одержані результати вивчення адгезивних якостей гепатоцитів і радіоавтографічного аналізу обробляли статистично за методом частотного аналізу на ЕОМ-4. Для обробки даних щодо рівня життєвдатності і активності синтезу сечовини застосовували метод Ст'юдента-Фішера. Різницю вважали достовірною, якщо рівень значущості складав 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

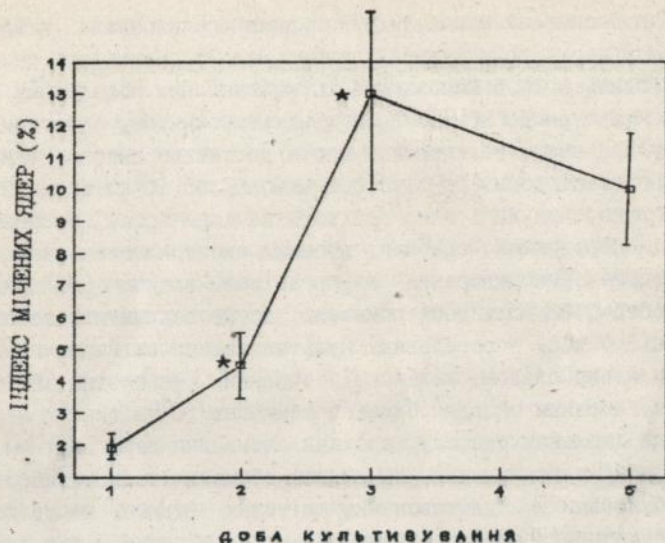
Нативні гепатоцити новонароджених поросят тримали на протязі 5 діб в традиційних умовах моношарної культури. Життєвдатність свіжоізольованих гепатоцитів складала 78+6%. Після їх посіву через 1 годину інкубації при 37°С на підложці виявлялось близько 68% гепатоцитів, уведених до культури. Мікроскопічне спостереження культури нативних гепатоцитів на протязі п'яти діб показало, що ця система динамічно розвивається і проходить стадії становлення або адаптації, тимчасової стабілізації і, нарешті, стадію регресивних змінювань. Фаза адаптації характеризується етапом прикріплення, розпластування клітин і формування моношарних ділянок в культурі. На протязі 1-3 доби клітини підтримують полігональну форму і мають морфологічну подібність до гепатоцитів в структурі тканини печінки. На 5-ту добу культивування моношар клітин морфологічно змінюється. Його окремі менш щільні ділянки набувають вид потоків, що складаються з трохи витянутих клітин, орієнтованих удовж осі потоку, хоч

значна частина клітин ще зберігає полігональну форму. В цей період в культурі виявляються клітини, що синтезують альфафетопро-
теїн. Модифікація моношару гепатоцитів на 5-ту добу може бути ознакою інволюційних змінювань в культурі, що підтверджується ще й експресією синтезу альфафетопро-
теїна. В нормі синтез альфафе-
топротеїна в клітинах свинячої печінки припиняється на етапі внутрішньоутробного розвитку. Отже, наявність в культурі клітин, що синтезують альфафетопро-
теїн, є ознакою ембріоналізації культу-
ри. Такий розвиток гепатоцитів неонатальних поросят в умовах традиційної культури є закономірним і узгоджується з результатами, що були одержані при культивуванні гепатоцитів інших видів тварин.

Печінкові клітини новонароджених поросят як експерименталь-
на модель привертають тим, що вони достатньо диференційовані для виконання специфічних печінкових функцій, наприклад, можуть активно акумулювати жовчні кислоти, до того ж триваліше, ніж гепа-
тоцити щурів чи людини, або метаболізувати ксенобіотики. Разом з тим гепатоцити новонароджених поросят виявляють високі резерви проліферації, які забезпечують нормальне протікання процесів постнатального розвитку органу в цілому.

Динаміку участі клітин в синтезі ДНК під час культивування гепатоцитів показано на мал. 1. Аналіз радіоавтографів клітинних культур показав, що нативні гепатоцити зберігають здатність до синтезу ДНК на протязі усього строку спостереження - 5 діб. Реалізація здатності клітин печінки поросят проліферувати в умовах культивування відбувається поступово. На протязі перших трьох діб культивування кількість клітин, що синтезують ДНК, збільшується більше, ніж у 6 разів, досягаючи на третю добу 13,0±1,5 %. На 5-у добу ³H-тимідин включало близько 10% ядер гепатоцитів. Особливо помітно появлення в 3-добовій культурі гепатоцитів неонатальних поросят клітин у стані мітотичного ділення, оскільки мітози в культурі гепатоцитів дорослих тварин зустрічаються дуже рідко.

Уявлення про ступінь проліферативної активності гепатоцитів новонароджених поросят дає порівняння, досить умовне, результа-
тів наших експериментів з даними радіоавтографічного аналізу активності включення ³H-тимідину в ДНК гепатоцитів щурів *in vivo* після дії на тканину печінки різних пошкоджуючих факторів, які є сильними стимуляторами регенерації печінки. Індекс мічення ядер



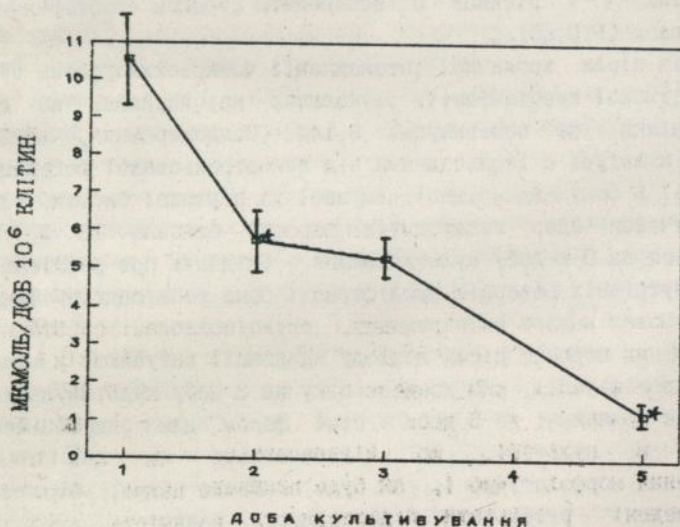
Мал. 1. Динаміка проліферації в культурі свіжоізольованих гепатоцитів. * - різниця з попереднім строком спостереження є достовірною ($P < 0,05$).

гепатоцитів після хронічної інтоксикації чотирьоххлористим вуглецем, часткової гепатектомії, локальних кровопливань на дві частки печінки не перевищував 8,14% (Сандомирський, 1992). Клітини в культурі є ізольованими від неконтрольованої регуляції регенерації з боку ендокринної, імунної та нервової систем, тому індекс мічення ядер гепатоцитів поросят близько 13 %, що реєструється на 3-ю добу культивування, свідчить про реалізацію високих внутрішніх резервів проліферації саме гепатоцитів. Таким чином, в умовах нашого експерименту, свіжоізольовані гепатоцити новонароджених поросят після періоду адаптації вступають у фазу активної проліферації, яка досягає піку на 3 добу культивування. Вона триває принаймні до 5 доби і стає фоном для інволюційних змінювань в культурі, що відзначаються на цей строк спостереження морфологічно і, як буде показано нижче, біохімічно. Наведені результати підтверджують наявність високого проліферативного потенціалу в гепатоцитах поросят, який може проявлятися в середовищі, яке не містить стимуляторів росту.

Оцінка специфічної для гепатоцитів функції сечовиноутворення, що є проявом знешкодливої функції печінки, показала, що

робота цикла синтезу сечовини в нативних гепатоцитах найбільше ефективна в першу добу культивування (мал.2). Кількість сечовини складала близько $10,5 \text{ мкмоль/доб } 10^6 \text{ клітин}$. При подальшому перебуванні культури до другої доби швидкість синтезу сечовини знижується у два рази, залишаючись проте достатньо високою і незмінною до третьої доби (близько $5,5 \text{ мкмоль/доб } 10^6 \text{ клітин}$). З урахуванням того, що на 1 г мокрої ваги печінки стає близько 10^8 клітин, і порівнюючи одержані в наших експериментах значення з активністю сечовиноутворення в організмі людини (близько 20 г/доб, тобто $0,33 \text{ моль/доб}$), показано, що це величини того самого роду. На 5-у добу в середовищі культивування нативних гепатоцитів знайдено слідові кількості сечовини. На протязі 5-ї доби утворення сечовини складає близько $1 \text{ мкмоль/}10^6 \text{ клітин}$.

Різне зниження синтезу сечовини нативними гепатоцитами під час 2-ї доби культивування, як видно, обумовлюється метаболічними перебудовами у культивованих клітинах. Відомо, що свіжоізовані гепатоцити на протязі перших кількох годин після виділення перебувають у стані негативного азотистого балансу (Лук'яно-



Мал.2. Динаміка швидкості синтезу сечовини в культурі свіжоізованих гепатоцитів. * - різниця з попереднім періодом спостереження є достовірною ($P < 0,05$).

ва, 1985). Його породжено зрушенням рівноваги між швидкістю утилізації і утворення амінокислот до катаболічного напрямку білкового обміну. Посилення розпаду білка призводить до підвищення обсягу вільних амінокислот в цитозолі клітини і, відповідно, субстратів для утворення сечовини, чим, можливо, пояснюється висока активність синтезу сечовини в 1-у добу культивування гепатоцитів. Лімітуючим моментом в процесі утворення сечовини може бути нестача енергії в клітинах, оскільки енергетичні потреби синтезу достатньо великі і теоретично складають 4 моля АТФ/моль сечовини. Можна припустити, що зниження цієї функції в гепатоцитах новонароджених поросят на 2-у добу культивування спричинене нестачею в клітинах АТФ. Проте швидкість синтезу сечовини підтримується на постійному і високому фізіологічному рівні на протязі другої-третьої доби, що свідчить про достатній енергетичний потенціал системи. Модуляція активностей специфічних ферментів, що описана для культивованих гепатоцитів щурів, стосується і ферментів, що каталізують реакції циклу сечовиноутворення (Gauguin-Guillouzo C., Guillouzo A., 1983). Може бути, що низька швидкість утворення сечовини, яка реєструється у наших експериментах на 5-у добу культивування гепатоцитів поросят, обумовлена збитком активності специфічних ферментів цього процесу і є однією з ознак регресивних змін у культурі.

Процес низькотемпературного консервування індуктує низку структурно-метаболічних змін в ізольованих гепатоцитах, що позначається і на здатності цих клітин до перебування в умовах культивування. Результати оцінки життєздатності гепатоцитів за їх стійкістю до забарвлення трипановим синім після усіх варіантів заморожування показані в таблиці. Після відігрівання переважну кількість не забарвлених клітин, в середньому близько 68% від контролю, одержували у зразках, що заморожували в 10% ДМСО при швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Трохи нижче ($05 < P < 0,1$) була життєздатність гепатоцитів при використанні 10% і 20% ПЕО-1500 з двома швидкостями охолодження та 10% ДМСО при швидкості заморожування $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. У цих серіях експериментів кількість клітин, що були стійкими до забарвлення трипановим синім, складала близько 60%. Малоєфективним в наших дослідженнях виявився ПЕО-400: за усіма режимами заморожування він забезпечував близько 30% від контролю життєздатних гепатоцитів. Тривалість збереження на протязі від трьох діб до двох місяців не впливала на життєздатність

Таблиця.

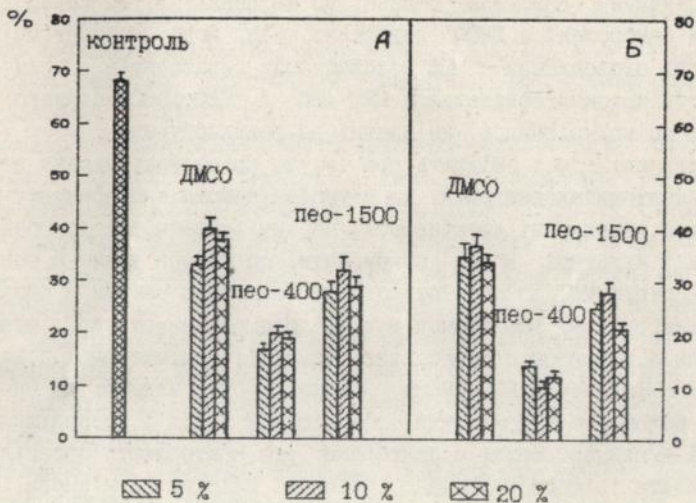
Життєздатність* (%) гепатоцитів після кріоконсервування

Кріопротектор (КП)	Концентрація КП (%)	Швидкість заморожування	
		1°С/хв	10°С/хв
ДМСО	5	58±4	52±4
	10	68±5	60±4
	20	54±4	45±3
ПЕО-400	5	25±4	28±5
	10	29±5	29±3
	20	31±3	24±3
ПЕО-1500	5	48±6	42±4
	10	61±4	60±3
	20	65±6	62±4

* - Життєздатність кріоконсервованих гепатоцитів визначали по відношенню частки живих клітин в суспензії після відігріву і відмивання від кріопротектора до частки живих клітин в суспензії після виділення (контролю).

розморожених гепатоцитів за всіх умов експерименту.

Тестування клітин по трипановому синьому дозволяє виявити тяжкі пошкодження бар'єрних властивостей мембрани і часто дає завищені показники біологічної цілості клітин. Абсолютним лабораторним показником біологічної цілості може вважатись здатність клітин до існування в культурі. При одержанні первинної культури печінкових клітин важливим є етап прикріплення, що обумовлюється як збереженням адгезивних якостей власне гепатоцитів, тобто їх здатністю до активного контакту з суміжними клітинами і різноманітними субстратами біологічного і небіологічного походження, так і наявністю необхідних компонентів системи культивування. Гепатоцити, що перенесли усі опробувані умови заморожування-відігріву, по ефективності посіву значно поступаються свіжоізольованим клітинам (мал. 3). Із суспензії нативних гепатоцитів, що вносяться до культури, на протязі години після посіву



Мал. 3. Ефективність посіву нативних і деконсервованих гепатоцитів поросят. Швидкість заморожування: А - 1°С/хв; В - 10°С/хв.

осідає і прикріплюється до підложки близько 68% клітин. В дослідних групах здатність до прикріплення краще зберігають гепатоцити після заморожування в середовищі з ДМСО без залежності від його концентрації і швидкості охолодження суспензії, хоч ефективність посіву знижується майже до 40%. Клітини, що були заморожені за усіма режимами з ПЕО-1500, виявляють ефективність посіву на рівні близько 30%. Використання ПЕО-400 забезпечує прикріплення менш ніж 20% експлантованих клітин. Привертає увагу факт зниження на 10-15% ефективності посіву гепатоцитів, що були заморожені під захистом 10% і 20% ПЕО-1500, щодо клітин, при заморожуванні яких використовували ДМСО в концентрації 10%. Слід позначити, що показники життєздатності по трипановому синьому цих експериментальних груп ідентичні (табл.), але прямої кореляції між ефективністю посіву та стійкістю клітинної мембрани до життєвого барвника не виявлено.

В оптимальних умовах для повноцінних гепатоцитів на протягті наступних кількох годин після посіву властиве розпластування на колагеновій матриці, що є істотним для багатьох внутріклітинних процесів (синтез ДНК, РНК, проліферація та ін.). По здатності до

розпластування найбільш близькі до нативних клітин гепатоцити, що були заморожені в ДМСО незалежно від його концентрації і швидкості охолодження - 80% розпластаних гепатоцитів. Після всіх варіантів кріоконсервування з ПЕО-400 і ПЕО-1500 близько 40% клітин, що прикріпились, не здатні до розпластування.

Одержані дані свідчать про те, що кріоконсервування викликає в гепатоцитах ряд змін, що в умовах нашого експерименту проявляється у зниженні ефективності посіву і здатності до розпластування в культурі. Можна припустити, що це пов'язане з пошкодженням структур, що опосередковують взаємодію клітин з позаклітинним матриксом, або такими модифікаціями плазматичної мембрани, коли неможливою є перебудова геометрії контактуючої поверхні клітини (Blanguet P.R., 1983). З іншого боку, відомо, що енергетика і редокс-статус клітини, локалізація іонів і розподіл метаболітів в компартментах є факторами, що контролюють організацію цитоскелета і, опосередковано, поверхні клітини (Лук'янова, 1985).

Найбільш примітною є знайдена специфічність впливу виду використаного кріпротектора на збереження адгезивних якостей розморожених гепатоцитів. За тим в межах кожної серії експериментів, де використовували один з трьох випробуваних кріпротекторів, не відзначено впливу концентрації кріпротектора і швидкості заморожування на ефективність посіву гепатоцитів та їх здатність до розпластування. Найменш пошкоджуючим для реалізації адгезивних якостей гепатоцитів в культурі є кріоконсервування їх в присутності ДМСО. Застосування при заморожуванні гепатоцитів поросят ПЕО-400 і ПЕО-1500 веде до більш драматичних наслідків.

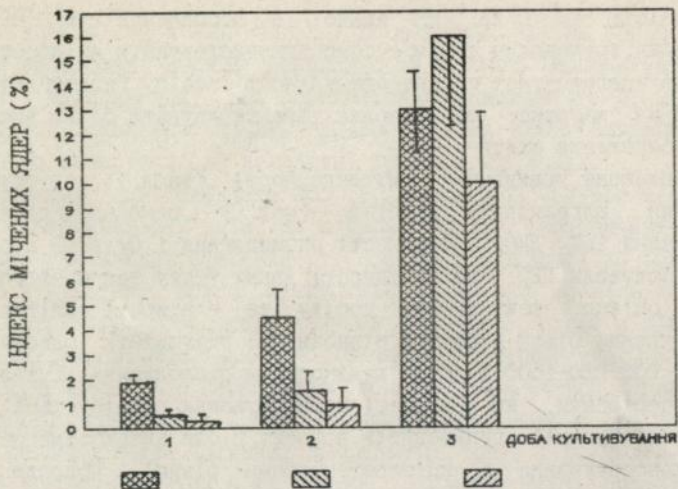
Оцінка адгезивних якостей гепатоцитів після кріоконсервування дає інтегральне уявлення про збереження клітин, бо відбиває стан комплексу внутріклітинних подій, які необхідні для реалізації таких первинних реакцій клітини, як прикріплення і розпластування на субстраті. При цьому немає абсолютної кореляції між життєздатністю печінкових клітин, що визначається за трипановим синім, і їх здатністю до прояву адгезивних якостей *in vitro*: стійкість плазматичної мембрани до барвника не гарантує збереження здатності до прикріплення і розпластування. Більш того, клітини демонструють рівний ступінь збереження адгезивних якостей при однаковій життєздатності суспензії гепатоцитів, що в наших експериментах спостерігали після заморожування клітин з 10% і 20% ПЕО-1500 за двома режимами охолодження та з 10% ДМСО -

із швидкістю $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Як видно, в доповнення до методу забарвлення трипановим синім є сенс використовувати як простий і доступний експрес-тест оцінку ефективності посіву гепатоцитів на колагеновий матрикс, що дозволяє характеризувати більш високий рівень збереження клітин.

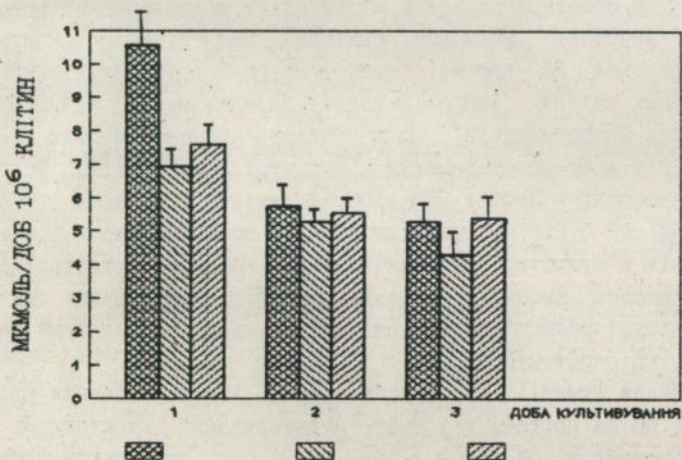
Комплексне урахування життєздатності (табл.) і ступеня збереження адгезивних якостей (мал. 3) показало перевагу використання 10% ДМСО і швидкості охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. В серіях, де застосовували ПЕО, по сукупності даних тесту трипанового синього і оцінки ефективності посіву та здатності клітин до розпластування більш високі і рівнозначні результати одержували з 10% і 20% ПЕО-1500 і двома швидкостями охолодження. Виявилось цікавим порівняти, як в процесі культивування реалізуються біосинтетичні функції гепатоцитів поросят після низькотемпературного консервування з кріопротекторами різної природи. Для спостереження на протязі трьох діб культивування взяли клітини після заморожування із швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ в присутності 10% ДМСО або 10% ПЕО-1500.

В цілому динаміка включення міченого тимідину до ДНК гепатоцитів, що були кріоконсервовані з ДМСО і ПЕО-1500, аналогічна до тієї, що спостерігається в культурі свіжоізольованих гепатоцитів. Тимчасове зниження синтезу ДНК відносно контролю спостерігається на протязі першої-другої доби культивування розморожених клітин. ІМЯ за 1-у добу складає менш, ніж 0,5% в обох серіях експериментів, що достовірно нижче контролю (мал. 4). За 2-у добу спостереження в культурі гепатоцитів, що були кріоконсервовані з ДМСО і ПЕО-1500, ^3H -тимідин включають $1,5 \pm 0,6\%$ і $0,9 \pm 0,8\%$ ($P > 0,05$) клітин відповідно, що приблизно в 3,5 рази менше, ніж в культурі нативних клітин. На протязі третьої доби спостерігається висока, на рівні контролю, активність синтезу ДНК в культурі розморожених гепатоцитів незалежно від виду використаного кріопротектора.

Вивчення функції сечовиноутворення деконсервованих клітин показало, що на протязі 1-ї доби культивування гепатоцити, які були заморожені з 10% ДМСО і 10% ПЕО-1500, виробляють близько 60% від рівня синтезу сечовини нативними клітинами (мал. 5). Потім спостерігається тенденція до незначного зниження активності сечовиноутворення деконсервованих гепатоцитів, проте показники цієї функції залишаються досить високими і стабільними на протязі



Мал. 4. Динаміка проліферації в культурі свіжоізолюваних і кріоконсервованих з 10% ДМСО або 10% ПЕО-1500 гепатоцитів.



Мал. 5. Синтез сечовини в культурі свіжоізолюваних і кріоконсервованих з 10% ДМСО або 10% ПЕО-1500 гепатоцитів.

другої-третьої доби культивування. Зважаючи на те, що реакції процесу сечовиноутворення протікають у різних компартментах клітини, в мітохондріях і в цитоплазмі, через його відновлення в розморожених клітинах до рівня контролю до 2-ї доби культивування можна побічно зробити висновок про збереження системи енергозабезпечення, мембрано-транспортних процесів в мітохондріях, активності ферментної системи циклу сечовиноутворення. Вид кріопротектора не спричиняє достовірної різниці в активності синтезу сечовини між експериментальними групами.

В цілому, гепатоцити, що були заморожені в ДМСО і ПЕО-1500 і зберегли спроможність до перебування в культурі, ідентичні за показниками синтезу ДНК і сечовини. При культивуванні на протязі трьох діб і свіжоізольовані, і кріоконсервовані гепатоцити зазнають періоди адаптації до інших умов середовища і тимчасової стабілізації функцій. Зниження функцій в гепатоцитах після процесу кріоконсервування оборотне. Потрібний певний латентний період, в наших експериментах одна-дві доби, для відновлення функцій, що спостерігаються, до контрольного рівня. Аналогічну тривалість латентного періода спостерігали в культурі деконсервованих гепатоцитів людини (Dou et al., 1992). Такий самий вплив кріоконсервування є виявленим і для інших біологічних об'єктів. Відновлення низки ферментативних реакцій і фізіологічних функцій не відбувається одночасно з розмерванням, отже, потрібний додатковий час до періоду природної адаптації для репарації нелетальних пошкоджень клітин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що ізольовані гепатоцити новонароджених поросят спроможні після низькотемпературного консервування до існування в культурі із збереженням ряду елементарних і специфічних функцій.

2. Виявлено різницю у впливі кріопротекторів ДМСО, ПЕО-400, ПЕО-1500 на адгезивні якості деконсервованих гепатоцитів новонароджених поросят. Здатність клітин до прикріплення та розпластування найбільш висока після заморожування їх в присутності ДМСО; найменш ефективний - ПЕО-400.

3. Показано відсутність впливу використаних швидкостей заморожування ($1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ і $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) і концентрацій кріопротекторів (5%, 10%, 20%) на збереження здатності гепатоцитів до прикріплення і розпластування на колагеновій підложці.

4. Виявлена ідентичність показників динаміки синтезу ДНК і сечовини в культурі гепатоцитів новонароджених поросят після криоконсервування з 10% ДМСО або 10% ПЕО-1500.

5. Низькотемпературне консервування з 10% ДМСО і 10% ПЕО-1500 індуктує оборотне зниження активності проліферації та сечовиноутворення в культурі гепатоцитів новонароджених поросят. Потрібний певний латентний період (1-2 доби) для відновлення досліджуваних функцій до рівня контролю.

6. За оцінкою стійкості плазматичної мембрани до трипанового синього і по збереженню здатності клітин до прикріплення і розпластування на субстраті показано найбільшу ефективність ДМСО в концентрації 10% для криоконсервування гепатоцитів новонароджених поросят.

7. Виявлено, що гепатоцити новонароджених поросят, нативні і деконсервовані, мають високий проліферативний потенціал і здатні до вступу в S-фазу клітинного циклу при відсутності додаткових ростових і гормональних факторів в середовищі культивування. Проліферуюча культура гепатоцитів новонароджених поросят може бути зручною моделлю для випробування гепатотропних факторів, як стимуляторів, так і інгібіторів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ РОБІТ.

1. Волкова Н. А., Белочкина И. В. Культивирование печеночных клеток новорожденных поросят // Культивирование клеток животных и человека. Тез. докл. III Всесоюзного совещания 13-15 февраля 1990 г., г. Пущино. - М., 1990. - С. 81-82.
2. Волкова Н. А., Белочкина И. В., Сигал Н. С. Способность гепатоцитов поросят к пролиферации в культуре // Структурно-функциональные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии. Тез. докл. научно-практич. конференции, 1-3 октября 1991. - Харьков, 1991. - С. 45.
3. Белочкина И. В., Волкова Н. А. Культивирование гепатоцитов новорожденных поросят // Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии / Под ред. Г. А. Бабийчука. - Харьков, 1993. - С. 13-16.
4. Белочкина И. В., Волкова Н. А. Адгезивные способности изолированных гепатоцитов новорожденных поросят после низкотемпературного консервирования // Проблемы криобиологии. - 1994. - N 2. - С. 52-54.

Ответственный за выпуск
академик НАН Украины В. И. Грищенко

Подписано к печати 27.04.94. Физ. п. л. 2. уч.-изд. 2.
Заказ 25 , тираж 100 экз.

Ротапринт ФТИНТ АН Украины, г. Харьков-164, просп. Ленина, 47

1157858

AB 30.327