

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ-ДОНОРОВ, НЕСУЩИХ ГЕН *egfp*, НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ МЫШЕЙ ПРИ СИНГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

© 2018 г. Л.А. Сергиевич, **Е.В. Карнаухова**, А.В. Карнаухов, Н.А. Карнаухова, Е.В. Богданенко*, И.А. Лизунова, В.Н. Карнаухов

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8*

E-mail: larserg@mail.ru

Поступила в редакцию 22.02.18 г.

Исследовано влияние процедуры криоконсервирования клеток костного мозга на продолжительность жизни мышей при сингенной трансплантации как необлученным, так и облученным в дозе 7 Гр мышам-реципиентам. В качестве доноров костного мозга использовали мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка. Клетки криоконсервировали с помощью методики, используемой в клинической практике для аутотрансплантации костного мозга при лечении онкологических больных. В качестве криопротектора использовали растворенный в полиглиокине диметилсульфоксид в конечной концентрации 5%. Трансплантацию размороженного костного мозга проводили без отмывания от криопротектора. Побочных эффектов, связанных с токсичностью криопротектора не зарегистрировано. Было показано, что флуоресцентный вариант методики окрашивания клеток костного мозга трипановым синим является более чувствительным для оценки степени повреждения клеток после криоконсервирования. Средняя продолжительность жизни необлученных реципиентов статистически не отличалась от группы интактного контроля. У облученных реципиентов средняя продолжительность жизни увеличилась на $51 \pm 2\%$ по сравнению с группой облученного контроля. Анализ пробы крови, взятой из хвостовой вены облученных мышей, показал пожизненное заселение органов кроветворной системы реципиента клетками донора. Таким образом, модельные эксперименты на сингенной линии мышей показали, что криоконсервированный костный мозг может быть достаточно эффективным для использования в клеточной терапии при аутотрансплантации пациентам после лучевой терапии.

Ключевые слова: криоконсервирование, трансплантация, костный мозг, облучение, продление жизни, GFP⁺-мышь, информационная гипотеза старения.

В клинической практике трансплантация гематопоэтических стволовых клеток (ГСК) является высокоспециализированным методом лечения, который проводится после облучения и химиотерапии для предупреждения цитопении, когда существует высокая вероятность развития тяжелых осложнений. Наиболее часто применяется аутотрансплантация (60% от всех трансплантаций костного мозга (КМ) в США и Европе и около 90% – в России [1,2]). Причиной преимущественного применения аутологичных трансплантаций является проблема подбора

гистосовместимого донора для аллогенной трансплантации, так как использование цельной фракции донорских клеток КМ часто сопровождается развитием реакции «трансплантат против хозяина».

Вторым актуальным направлением использования гематопоэтических стволовых клеток в настоящее время является их безоблучательная аутотрансплантация в целях омоложения [3,4], в том числе после криоконсервации цельной фракции КМ, взятого в молодом возрасте [5–7].

Проведенные нами ранее модельные эксперименты на инбредной линии мышей по сингенной трансплантации свежевыделенного КМ от молодых доноров необлученным животным подтвердили возможность существенного уве-

Сокращения: ГСК – гематопоэтические стволовые клетки, КМ – костный мозг, СПЖ – средняя продолжительность жизни, ДМСО – диметилсульфоксид, EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок.

личения средней продолжительности жизни (СПЖ) старых мышей и удлинения сроков фертильности самок-реципентов [5,6]. Трансплантация такого КМ мышам, облученным в дозе 7 Гр, значительно продлила их СПЖ по сравнению с облученным контролем; при этом наблюдалось тотальное пожизненное заселение клетками донора КМ, селезенки, тимуса и крови реципиента [8].

Эти результаты подтверждают предложенную нами ранее информационную теорию старения [9,10], согласно которой основной причиной старения является накопление ошибок в геноме вследствие воздействия внешних факторов, и позволяют сделать вывод о возможности лечения и омоложения путем замены клеточного состава в стареющем организме клетками, геном которых содержит меньшее число ошибок.

При этом важными критериями успеха клеточной терапии криоконсервированными стволовыми клетками является их количество (концентрация) и сохранность способности к пролиферации в момент аутотрансплантации. Жизнеспособность клеток в процессе замораживания можно повысить оптимизацией режимов охлаждения и подбором криопротекторов.

В настоящее время наиболее широко применяется и дает наилучшие результаты в качестве криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации от 5 до 10% [11]. Отмывание от ДМСО трансплантационного материала с целью снижения вероятности побочных эффектов приводит к снижению количества ГСК и их способности к пролиферации [12,13]. В состав криопротекторов, содержащих ДМСО, для снижения его токсического действия часто вводят препараты декстрана [14]. Декстран проявляет свойства экзоцеллюлярного криопротектора. В настоящее время разработаны эффективные методики криоконсервации мононуклеаров КМ, а также ГСК, выделенных из кордовой крови. В качестве криопротектора используется ДМСО, растворенный в декстране с молекулярной массой 60000 (полиглюкин) в конечной концентрации 5 и 3,5% для мононуклеаров КМ и ГСК соответственно [15,16].

Целью настоящей работы было исследование влияния сингенной трансплантации клеток костного мозга на продолжительность жизни как необлученных, так и облученных в дозе 7 Гр мышей-реципиентов после процедуры замораживания–оттаивания этих клеток с использованием в качестве криопротектора растворенного в полиглюкине ДМСО в конечной концентрации 5%. При проведении этого эксперимента использование в качестве доноров КМ

мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP), позволило проводить мониторинг наличия и миграции донорских клеток различных типов в организме исследуемого животного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. В качестве доноров КМ использовали самок и самцов мышей в возрасте 4–6 месяцев, несущих ген зеленого флуоресцентного белка (Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J,) разводимые на основе инбредной линии C57BL/6 EGFP^{-/-} [17,18]. Животные были получены при содействии А.М. Малащенко из Научного Центра биомедицинских технологий РАМН, куда они поступили из Jackson Laboratory (Bar Harbor, США) с любезного разрешения А.В. Червонского. Трансген *egfp* в клетках донора (GFP⁺-мыши) использовали как метку для определения их приживаемости в организме не несущего этот трансген реципиента (GFP⁻-мыши). При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395–488 нм EGFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции на длине волны 508 нм.

Мышей содержали в виварии Института биофизики клетки РАН по одной–три особи в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью.

В качестве реципиентов для трансплантации без облучения животных использовали GFP⁻-мышей в возрасте семи–девяти месяцев. В качестве реципиентов для трансплантации с предварительным облучением животных использовали GFP⁻-мышей в возрасте четырех–пяти месяцев. Контролем служили облученные в той же дозе мыши, но без последующей трансплантации КМ (облученный контроль), и животные, над которыми не проводили никаких манипуляций (интактный контроль).

Выделение клеток КМ. Мышей-доноров забивали дислокацией шейных позвонков. КМ выделяли из двух бедренных костей донора путем их измельчения в фарфоровой ступке с раствором фосфатно-солевого буфера (600 мкл) и последующей фильтрацией через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм. Общее количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. От двух бедренных костей получали $(5 \pm 1) \cdot 10^7$ клеток.

Методика криоконсервирования. Для криоконсервирования клеток КМ мышей использовали 10%-й раствор криопротектора ДМСО (Panгеас, Испания) в 6%-м растворе декстрана

(ОАО «Биохимик», Россия) с молекулярной массой 60000 (полиглюкин). Эквilibрацию проводили в криопробирках на 1,8 мл (ТРР, Швейцария) на ледяной бане в течение 6 мин во избежание гипертермии клеток в соотношении клеточной суспензии и криопротектора 1 : 1 (по 500 мкл). Замораживание проводили в тех же пробирках в два этапа: на первом этапе пробирки помещали на 3 ч в контейнер для бесспиртового замораживания клеток CoolCell (Biocision, США) [19], в котором происходило охлаждение со скоростью 1°C/мин в морозильнике при -80°C, на втором – пробирки переносили в сосуды Дьюара с жидким азотом.

Перед трансплантацией проводилось быстрое размораживание клеточной суспензии на водяной бане при 37°C с последующей трансплантацией клеток без отмывания от криопротектора. Жизнеспособность и морфологию клеток до и после криоконсервирования оценивали после окрашивания суправитальным красителем трипановым синим в конечной концентрации 0,07% под микроскопом в проходящем свете с использованием дифференциального интерференционного контраста и в свете флуоресценции при освещении светом с длиной волны 488 нм. Поврежденные клетки флуоресцируют в красной области спектра.

В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). Количество и интенсивность флуоресценции GFP⁺-клеток оценивали с помощью программы Cell Analyzer-2 [20].

Облучение животных. Облучение мышей проводили сотрудники Группы источников излучений Института биофизики клетки РАН на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ 17), $I = 15$ мА, $U = 200$ кВ, с фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1 мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин. Мышей облучали в дозе 7 Гр, после чего в экспериментальных группах мышей через сутки проводили трансплантацию размороженного КМ.

Трансплантация КМ. Трансплантацию суспензии клеток КМ проводили непосредственно после их замораживания без удаления криопротектора с учетом совпадения пола донора и реципиента в боковую вену предварительно разогретого при температуре 40–45°C хвоста реципиента с помощью инсулинового шприца в объеме 200 мкл, содержащем $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$ клеток.

Мониторинг заселения крови GFP⁺-клетками донора. При исследовании продолжительности жизни облученных животных после транс-

плантации КМ проводили мониторинг заселения крови клетками донора (GFP⁺-клетками) в разные сроки после облучения. Для этого небольшую каплю крови из хвоста реципиента помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и проводили фотосъемку. На препаратах оценивали содержание флуоресцирующих лейкоцитов и тромбоцитов.

Статистическая обработка данных. Данные обрабатывали с использованием компьютерного языка программирования МАТЕМАТИКА 5.2 и программы SigmaPlot 12.1. Доверительную вероятность P определяли стандартным образом с использованием критерия Стьюдента. Результаты представлены как $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Перед трансплантацией мы оценили общую концентрацию клеток КМ до и после размораживания и их жизнеспособность. Подсчет в камере Горяева показал, что использование криопротектора, содержащего ДМСО и полиглюкин (в конечной концентрации 5 и 3% соответственно), не изменяет общую концентрацию клеток суспензии КМ после размораживания по сравнению с той, что была до криоконсервирования (табл. 1).

Жизнеспособность клеток КМ определяли с использованием красителя трипанового синего двумя способами: одно и то же поле зрения фотографировали в проходящем свете с использованием дифференциального интерференционного контраста и в свете флуоресценции (рис. 1). В проходящем свете подсчитывали общее количество клеток в поле зрения и количество окрашенных синих клеток (рис. 1а,в). При освещении светом с длиной волны 488 нм клетки, окрашенные трипановым синим, ярко флуоресцировали в красной области спектра (рис. 1б,г). Это позволило выявить большее количество клеток на разных стадиях повреждения.

Следует отметить, что до криоконсервирования при окрашивании трипановым синим жизнеспособность интактных клеток КМ составила $87,3 \pm 1,8$ и $89,3 \pm 1,9\%$ от общего количества клеток для вариантов подсчета в проходящем свете и в свете флуоресценции соответственно. Однако после размораживания было обнаружено, что жизнеспособность этих клеток, определяемая в проходящем свете, составила $73,2 \pm 4,2\%$, а в свете флуоресценции – $58,0 \pm 6,9\%$, из чего мы делаем вывод, что второй вариант почти в полтора раза чувствительнее первого и позволяет выявлять повреж-

Таблица 1. Количество и жизнеспособность клеток КМ GFP⁺ мышей-доноров до замораживания и после размораживания

№	Количество клеток до замораживания в 1 мл, $\times 10^7$	Количество клеток после размораживания в 1 мл, $\times 10^7$	Доля живых GFP ⁺ клеток после размораживания, %	Общая жизнеспособность клеток (GFP ⁺ и GFP ⁻) после размораживания, %		Время хранения
				по дифференциальному интерференционному контрасту	по флуоресценции	
1	4,3 ± 0,9	6,0 ± 1,5	22,6 ± 0,2	78,7 ± 0,4	52,2 ± 0,4	5 сут.
2	4,6 ± 0,2 (10% ДМСО + сыворотка)	4,7 ± 0,4	48,0 ± 0,2	95,0 ± 0,4	90,0 ± 0,4	14 сут.
3	5,5 ± 0,5 (1 ч в криостативе)	6,5 ± 1,5	5,3 ± 1,2	63,1 ± 8,9	35,5 ± 0,5	50 сут.
4	4,9 ± 0,2	4,8 ± 0,1	27,8 ± 0,2	76,0 ± 0,5	71,7 ± 0,5	3 мес.
5	4,8 ± 0,1 (после отмывания)	4,8 ± 0,1	8,0 ± 1,4	52,0 ± 0,5	51,4 ± 3,6	3 мес.
6	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	18,0 ± 2,0	65,0 ± 1,0	50,0 ± 0,8	21 мес.
	Среднее значение в опыте		22,8 ± 2,8	73,2 ± 4,2	58,0 ± 6,9	
	Среднее значение в интактном контроле		33,2 ± 1,3	87,3 ± 1,8	89,3 ± 1,9	

Примечание. Строка № 2 – использовали криоконсервант, содержащий в конечной концентрации 10% ДМСО с 20% фетальной телячьей сыворотки, в остальных случаях – 5% ДМСО с 3% полиглюкина. Строка № 3 – образцы охлаждали в криостативе в течение часа, в остальных случаях – 3 ч. Строка № 5 – после размораживания проводили отмывание от криопротектора, в остальных случаях эта процедура отсутствовала. Усреднение данных после размораживания проводили по образцам, криоконсервированным стандартным способом (строки №№ 1, 4, 6).

дения в клетках, невидимые в проходящем свете.

После длительных сроков хранения в жидком азоте при окрашивании трипановым синим не выявлено существенного снижения жизнеспособности клеток, определяемой в проходящем свете и в свете флуоресценции. Она составила соответственно 78,7 ± 0,4 и 52,2 ± 0,4% после 5 суток хранения, 76,0 ± 0,5 и 71,7 ± 0,5% после 3 месяцев хранения, 65,0 ± 1,0 и 50,0 ± 0,8% – после 21 месяца хранения (табл. 1).

Однако количество жизнеспособных клеток, экспрессирующих EGFP (GFP⁺-клетки), до криоконсервации составляло 33,2 ± 1,3%, а после размораживания – 22,8 ± 8%, т.е. уменьшилось в среднем на 30% (табл. 1). При этом только 20,0 ± 5,2% от общего количества размороженных GFP⁺-клеток оказались нежизнеспособными, остальные же, по-видимому, значительно снизили экспрессию EGFP. До замораживания количество нежизнеспособных GFP⁺-клеток в КМ составило 3,0 ± 1,4%.

На гистограмме распределения клеток по интенсивности флуоресценции EGFP видно, что диапазон интенсивностей флуоресценции у размороженных клеток КМ значительно шире, чем

в контроле, присутствуют клетки с низкой и высокой интенсивностью флуоресценции (рис. 2). При этом средние значения интенсивностей практически не отличаются и составляют 0,34 ± 0,1 в контроле и 0,34 ± 0,24 у размороженных клеток. Клетки в левой части гистограммы с низкими значениями интенсивности, по-видимому, и составляют ту часть GFP⁺-клеток, которые не относятся к погибшим, однако и не попадают в число живых клеток при исследовании в свете флуоресценции из-за трудности их обнаружения на препарате. Клетки с более высокой интенсивностью флуоресценции EGFP, вероятно, составляют пул клеток, активирующихся при размораживании суспензии.

При криоконсервировании важным является подбор режима (скорости) охлаждения клеточной суспензии перед погружением в азот. При «медленном» режиме образцы охлаждали примерно 3 ч в криостативе из полипропилена со скоростью 1°С/мин до -80°С (рис. 3). При «быстром» режиме охлаждение суспензии прошло в течение 1 ч. После размораживания было обнаружено, что жизнеспособность клеток после быстрого охлаждения значительно ниже, чем после медленного: 63,1 ± 8,9% при подсчете

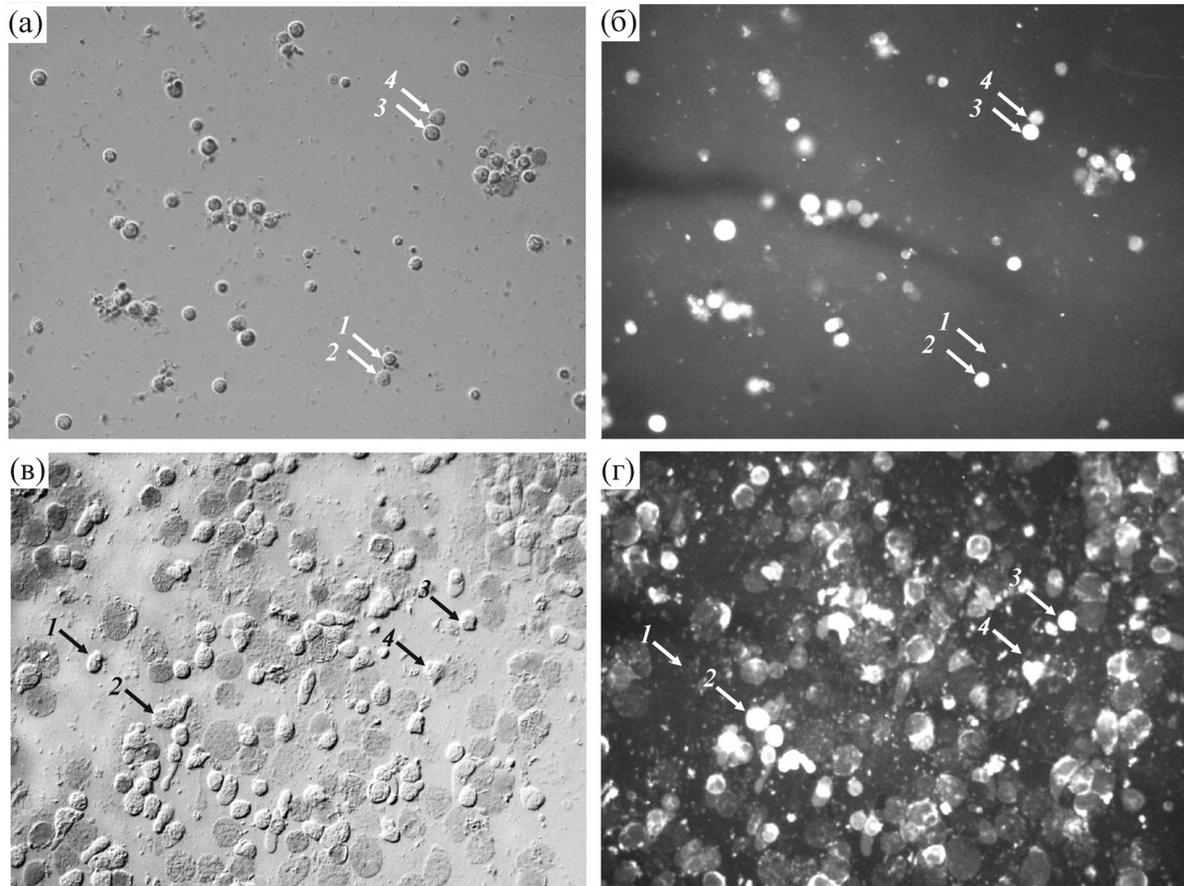


Рис. 1. Микрофотографии клеток размороженного КМ, окрашенные трипановым синим, GFP⁺ мышей-доноров без отмывания от криопротектора (а, б) и с отмыванием от криопротектора (в,г) в проходящем свете с использованием дифференциального интерференционного контраста (а,в) и в свете флуоресценции на длине волны 508 нм (б, г). 1 – живая GFP⁻-клетка, 2 – погибающая GFP⁻-клетка, 3 – живая GFP⁺-клетка, 4 – погибающая GFP⁺-клетка.

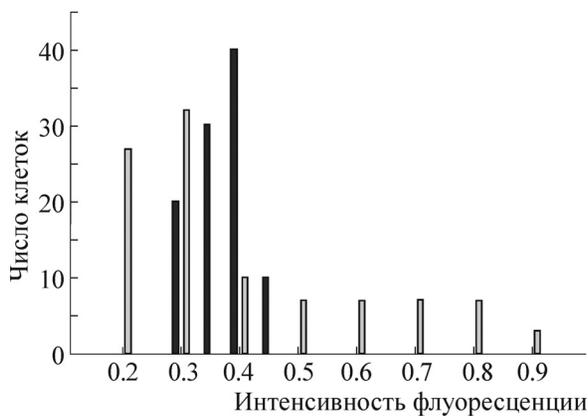


Рис. 2. Распределение GFP⁺-клеток КМ по интенсивности флуоресценции I на длине волны 508 нм до замораживания (темные столбцы) и после размораживания (светлые столбцы).

в проходящем свете и $35,5 \pm 0,5\%$ – в свете флуоресценции (табл. 1, № 3).

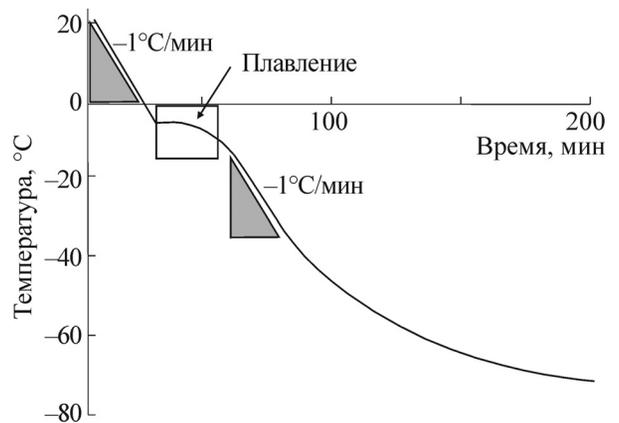


Рис. 3. Динамика охлаждения криопробирок с КМ в контейнере CoolCell, помещенных в холодильник (-80°C).

При этом до $10,9 \pm 3,2\%$ уменьшается общее количество GFP⁺-клеток, среди них живые клетки составляют менее половины. Таким образом,

нарушение режима замораживания отрицательно сказывается на жизнеспособности клеток, особенно на экспрессии EGFP.

Процедура отмывания от криопротектора также имела отрицательное влияние, так как приводила к уменьшению количества жизнеспособных клеток до $52,0 \pm 0,5$ и $51,4 \pm 3,6\%$ при подсчете в проходящем свете и в свете флуоресценции соответственно. В процессе отмывания криопротектора после центрифугирования суспензии образовывались труднорастворимые конгломераты клеток, в которых клетки слипались и гибли в большем количестве, нежели в однородной суспензии клеток (рис. 1в,г).

Нами также было показано, что для КМ, криоконсервированного с использованием в качестве криоконсерванта фетальной сыворотки вместо полиглюкина (10% ДМСО с 20% эмбриональной телячьей сыворотки в конечной концентрации), количество клеток после размораживания не изменяется, а жизнеспособность составляет $95 \pm 0,4\%$ с высоким содержанием жизнеспособных GFP⁺-клеток ($48,0 \pm 0,2\%$) (табл. 1, № 2). Однако данный метод не применяется в медицинской практике как ввиду возможности заражения вирусами сыворотки, так и вследствие высокой стоимости.

Для исследования выживаемости мышей после сингенной трансплантации криоконсервированного КМ были проведены следующие эксперименты. В первом эксперименте проводили трансплантацию КМ необлученным реципиентам (9 мышей в опыте и 9 мышей в контроле, возраст мышей 9 мес.). Трансплантацию проводили дважды с интервалом в 3 месяца. Во втором эксперименте трансплантацию проводили однократно облученным в дозе 7 Гр мышам (17 мышей в опыте и 22 мыши в облученном контроле, возраст мышей 4,5 мес.). Во всех экспериментах пол донора и реципиента совпадал. Количество трансплантируемых клеток криоконсервированного КМ составило $(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$.

Для мышей в первом эксперименте при трансплантации криоконсервированного КМ не установлено статистически достоверного отличия СПЖ от СПЖ мышей группы интактного контроля. СПЖ после трансплантации криоконсервированного КМ составила 528 ± 20 суток. Для мышей, которым вводили свежий КМ, как показано в нашей предыдущей работе [7], СПЖ увеличилась на 25%, а увеличение продолжительности дожития с момента трансплантации КМ в сравнении с интактным контролем составило 42% (рис. 4а,б; табл. 2). СПЖ после

трансплантации свежего КМ составила 647 ± 49 суток.

В отличие от эксперимента без применения облучения, СПЖ группы облученных в дозе 7 Гр мышей, которым проводили трансплантацию размороженного КМ, увеличилась на $51 \pm 2\%$ по сравнению с группой облученного контроля, тогда как ранее нами было показано, что трансплантация свежего КМ [8] увеличивала СПЖ на $94 \pm 12\%$ (рис. 5а,б; табл. 2). Увеличение продолжительности дожития облученных реципиентов от начала эксперимента (с возраста в 4,5 месяца) в сравнении с облученным контролем для криоконсервированного КМ составило $200 \pm 70\%$ (СПЖ равнялась 272 \pm 47 суток), а свежего КМ – $369 \pm 90\%$ (СПЖ составила 350 \pm 46 суток).

В экспериментах как без облучения, так и с облучением реципиентов побочных эффектов, связанных с токсичностью ДМСО при трансплантации КМ совместно с криопротектором, у мышей в первые сутки после введения не зарегистрировано.

Начиная с семи суток после облучения, раз в неделю в течение первого месяца и раз в две недели в дальнейшем у мышей в группах с облучением из хвостовой вены брали каплю крови для исследования наличия в ней донорских GFP⁺-клеток. Уже через неделю после облучения было обнаружено присутствие GFP⁺-лейкоцитов и GFP⁺-тромбоцитов в крови реципиентов. Эти клетки сохранялись в организме вплоть до смерти животного (от 4 до 12 месяцев после трансплантации КМ). Однако у отдельных мышей в крови отсутствовали донорские GFP⁺-тромбоциты на разных сроках после трансплантации. Это являлось прогностически неблагоприятным фактором для выживания животных.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе установлено, что определение жизнеспособности клеток с регистрацией флуоресценции трипанового синего является более чувствительным методом по сравнению с вариантом определения жизнеспособности клеток в проходящем свете с использованием дифференциального интерференционного контраста. Трипановый синий является красителем, который был одним из первых применен для определения жизнеспособности клеток с помощью световой микроскопии [21,22]. В настоящее время в исследованиях по тестированию целостности клеточных мембран при криоконсервации широко используются флюо-

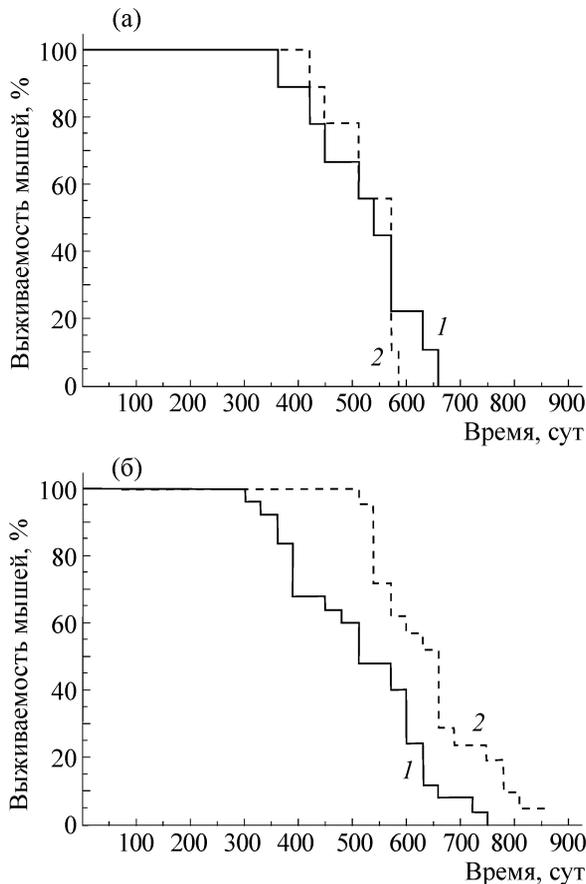


Рис. 4. Выживаемость мышей (в %) в эксперименте № 1 по трансплантации криоконсервированного (а) и свежего КМ (б) необлученным мышам-реципиентам: 1 – контроль, 2 – эксперимент.

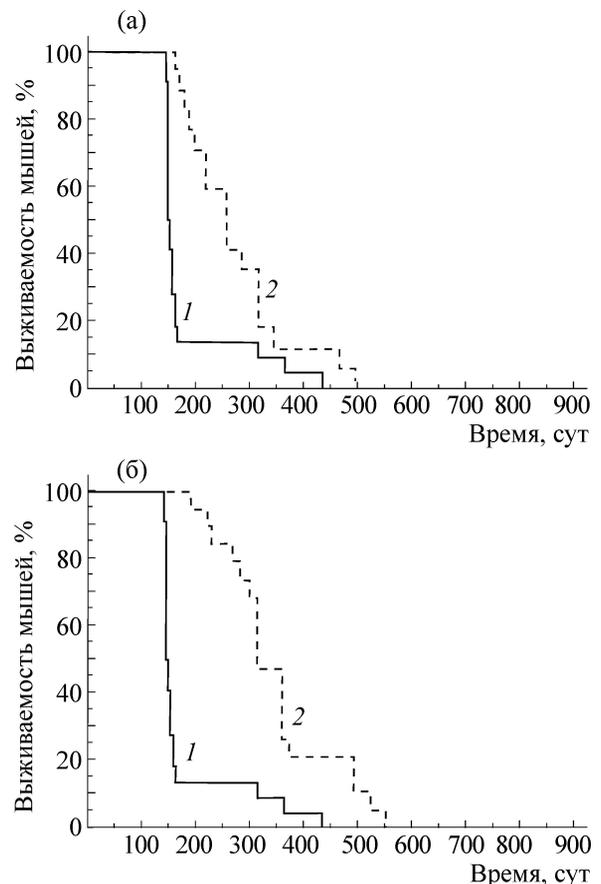


Рис. 5. Выживаемость мышей (в %) в эксперименте № 2 по трансплантации криоконсервированного (а) и свежего КМ (б) облученным в дозе 7 Гр мышам-реципиентам: 1 – облученный контроль, 2 – эксперимент.

ресцентные методы, основанные на принципе двойного окрашивания проникающим и не проникающим в клетку красителем, например SYTO13 с этидиум бромидом [23] или акридиновый оранжевый с пропидиум йодидом [24]. Флуоресценция же трипанового синего применяется для других задач, таких как гашение автофлуоресценции или флуоресценции красителей [25,26], исследования целостности сосудистого эндотелия [27,28] и др. Разработанная нами методика использования флуоресценции трипанового синего является более простой и доступной методикой для выявления поврежденных клеток под флуоресцентным микроскопом.

По литературным данным наибольшая степень повреждений клеток наблюдается при фазовом переходе от жидкой к твердой фазе (выделяется латентное тепло при кристаллизации клеточной взвеси) при медленном его прохождении [29]. В работе [30] было показано, что при неконтролируемом режиме замораживания количество гранулоцитарно-макрофагальных

колоний ниже, чем при контролируемом режиме криоконсервирования. При охлаждении образцов в криостативе из полипропилена обеспечивается контролируемая скорость теплоотдачи за счет использования специального теплопроводного сплава и внешних материалов с очень хорошими теплоизолирующими свойствами [19], и наши эксперименты подтверждают эти данные.

При охлаждении образцов в криостативе из полипропилена с начальной скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (рис. 3) с последующим погружением образцов в пары жидкого азота степень жизнеспособности клеток зависит от времени охлаждения. При охлаждении в криостативе в течение часа регистрируется более низкая жизнеспособность клеток. Это объясняется тем, что в течение часа образцы успевают охладиться до -20°C и за это время после фазы плавления льда успевает пройти только начальная стадия фазы медленного охлаждения. При охлаждении в криостативе в течение трех часов образец

Таблица 2. Средняя продолжительность жизни мышей в эксперименте с трансплантацией КМ по сравнению с контролем

Группы мышей	Эксперимент 1 (трансплантация КМ без облучения)				Эксперимент 2 (облучение в дозе 7 Гр с трансплантацией КМ)			
	Свежий КМ		Криоконсервированный КМ		Свежий КМ		Криоконсервированный КМ	
	СПЖ, сут	$\Delta\%$ ($P = 0,95$)	СПЖ, сут	$\Delta\%*$ ($P = 0,6$)	СПЖ, сут	$\Delta\%$ ($P = 0,95$)	СПЖ, сут	$\Delta\%$ ($P = 0,95$)
Эксперимент	647 ± 49 ($N = 21$)	$\Delta_{\text{пд(ик)}} = 42 \pm 9$	528 ± 20 ($N = 9$)	$\Delta_{\text{пд(ик)}} = 2 \pm 1$	350 ± 46 ($N = 19$)	$\Delta_{\text{пд(ок)}} = 369 \pm 90$	272 ± 47 ($N = 17$)	$\Delta_{\text{пд(ок)}} = 200 \pm 70$
Облученный контроль	–	–	–	–	181 ± 34 ($N = 22$)	–	181 ± 34 ($N = 22$)	–
Интактный контроль	517 ± 53 ($N = 25$)	$\Delta_{\text{ик}} = 25 \pm 4$	523 ± 33 ($N = 9$)	$\Delta_{\text{ик}} = 2 \pm 4$	–	$\Delta_{\text{ок}} = 94 \pm 12$	–	$\Delta_{\text{ок}} = 51 \pm 2$

Примечание. * – Достоверные различия между контролем и экспериментом не выявлены. $\Delta_{\text{пд(ик)}}$ – Увеличение продолжительности дожития с момента безоблучательной трансплантации КМ в сравнении с интактным контролем (возраст мышей – 7 и 9 месяцев для первого и второго экспериментов соответственно); $\Delta_{\text{пд(ок)}}$ – увеличение продолжительности дожития с начала эксперимента с облучением и трансплантацией КМ (возраст мышей – 4,5 месяца) в сравнении с облученным контролем; $\Delta_{\text{ок}}$ – увеличение СПЖ в эксперименте в сравнении с облученным контролем; $\Delta_{\text{ик}}$ – увеличение СПЖ в эксперименте в сравнении с интактным контролем; N – количество мышей в экспериментах.

успевают охладиться до -80°C и пройти все фазы охлаждения.

Ранее другими авторами было обнаружено, что в результате процедуры замораживания–оттаивания происходит разрушение наиболее чувствительных клеток – гранулоцитов, выделяющих нуклеопротейны и лизосомальные ферменты, что приводит к формированию геля и макроскопических сгустков в клеточной суспензии [31]. Среди мер, предпринимаемых исследователями для устранения разрушения гранулоцитов, наиболее успешным оказался метод использования непроникающих криопротекторов, таких как гидроксипропилкрахмал и полиглюкин [14–16,31]. При этом полностью сохранялась клеточность КМ, его жизнеспособность по окрашиванию трипановым синим была в два раза выше, чем при криоконсервировании только с ДМСО, а количество колониеобразующих единиц, полученных на агаре, не отличалось от нативного контроля [31].

Поскольку гидроксипропилкрахмал токсичен для человека, а отмывание от криопротектора является нежелательным, так как приводит к повреждению существенной части клеток, как показано другими исследователями и нами (табл. 1), в клинической практике криоконсервирования как клеток КМ, так и ГСК кордовой крови в настоящее время совместно с ДМСО преимущественно используется нетоксичный высокомолекулярный непроникающий криопротектор полиглюкин [14–16]. Поскольку он является детоксикантом для ДМСО, широко

используемым в качестве кровезаменителя [15], мы использовали полиглюкин в нашей работе.

Криоконсервированный КМ оказался сравним по эффективности со свежим при трансплантации реципиентам, предварительно облученным в дозе 7 Гр, хотя в этом случае СПЖ оказалась несколько ниже, чем в эксперименте при трансплантации свежего КМ (51 ± 2 и $94 \pm 12\%$ соответственно). Такой результат можно объяснить тем, что в результате процедуры криоконсервирования изменились такие показатели, как жизнеспособность и соотношение фенотипов клеток, образующих общий пул стволовых клеток КМ с разной степенью их коммитированности, что отмечают и другие авторы [14–16,31]. При этом количество криоконсервированных клеток КМ, введенных каждому реципиенту, было достаточно высоким для выживаемости животных после облучения и практически не отличалось от такового для свежего КМ.

Также следует учесть, что часть колониеобразующих клеток в криоконсервированном КМ гибнет, а у части оставшихся клеток ингибируется пролиферативная активность [32]. Кроме того, для клеток человека и мыши показано, что при криоконсервировании значительно сокращается количество ГСК, формирующих миелодные и мегакариоцитарные колонии в диффузионных камерах в мышах [33].

Что касается выживаемости в зависимости от количества трансплантируемых клеток, то в

работе [34] внутривенное введение 10^6 клеток свежего КМ спасает всех мышей после летальной дозы облучения (на 60-е сутки выживает 100% (10 из 10) мышей), при введении же 10^5 клеток выживает только 50% (5 из 10) мышей. В то же время для КМ, криоконсервированного с 10% ДМСО и 20% фетальной сыворотки в конечной концентрации, эти показатели ниже: 10^6 клеток сохраняет жизнь 70% (7 из 10) мышей, а 10^5 клеток спасает 40% (4 из 10) мышей.

В нашем эксперименте при введении 10^7 клеток облученным мышам выживаемость животных на 60-е сутки составила 100% для свежего КМ (19 из 19) и 76% (13 из 17) для криоконсервированного (5% ДМСО и 3% полиглиюкина) КМ, что указывает на хорошее качество замороженных клеток КМ в сравнении с вышеупомянутым применением криопротектора, содержащего в два раза большую концентрацию ДМСО и фетальную сыворотку.

Кроме того, что при криоконсервировании КМ может теряться фракция гранулоцитов, в нем могут меняться пропорции клеток и с другими фенотипами. Так, в работе [16] было установлено, что для ГСК кордовой крови, криоконсервированных аналогично нашей методике, т.е. с криопротекторами ДМСО и полиглиюкином (в конечной концентрации 3,7 и 3% соответственно), сохраняется до 85% CD45⁺ и до 95% CD34⁺. Таким образом, общие лимфоидные и миелоидные клетки-предшественники (фенотип CD34⁺) сохраняются полностью, а более коммитированные лейкоциты (фенотип CD45⁺) – в меньшей степени.

В работе [35] было показано, что низкая сохранность примитивных плюрипотентных предшественников ГСК при 5% ДМСО объясняется тем, что этот криопротектор, так же как цитостатики и суправитальный краситель родамин, может элиминироваться примитивными стволовыми клетками с помощью мембранного механизма, известного как Р-гликопротеин-транспортная система [36,37]. Снижение ниже порогового уровня концентрации ДМСО может приводить к повышенной чувствительности примитивных стволовых клеток к криоконсервации, как отмечается в работах других авторов [38].

В нашем случае можно предположить, что степень сохранности примитивных плюрипотентных предшественников стволовых клеток КМ из-за применения 5%-й концентрации ДМСО также была несколько снижена, что подтверждается более низкой СПЖ в эксперименте по трансплантации облученным мышам криоконсервированного КМ в сравнении с экспериментом по трансплантации свежего КМ (рис. 4, 5).

С другой стороны, тест на приживаемость донорских клеток криоконсервированного КМ у экспериментальных животных по капле крови, взятой из хвостовой вены реципиента на длительных сроках после облучения, подтверждает наличие достаточно высокого количества криоконсервированных донорских GFP⁺-клеток. Также нами зарегистрировано тотальное заселение клетками донора органов системы крови животных (данные не представлены) на длительных сроках после трансплантации. Эти данные позволяют предположить, что приживаются не только коммитированные (short-term), но и ранние предшественники (long-term) ГСК, что согласуется с работами других исследователей по конгенной трансплантации ГСК разной степени коммитированности облученным мышам [39–41]. В работе [39] было показано, что при введении только коммитированных потомков ГСК (мегакариоцито-эритроидных предшественников) к шестой неделе после трансплантации донорские клетки уже не регистрируются в периферической крови и гематопозз восстанавливается только за счет клеток собственного организма. В то же время только через три–семь недель после инъекции ранних предшественников ГСК (long-term cells) зарегистрированы их клоны в периферической крови [40,41].

При этом в нашей работе анализ кривых выживаемости двух групп облученных мышей, которым был трансплантирован свежий или криоконсервированный КМ, показывает, что в первые два месяца после облучения наблюдается повышенная смертность мышей в группе с трансплантацией криоконсервированного КМ (рис. 5а). Вероятно, это связано с низкой концентрацией пула именно короткоживущих (short-term) стволовых клеток, состоящих из общих миелоидных и мегакариоцито-эритроидных предшественников.

Этим же можно объяснить и отсутствие эффекта увеличения СПЖ при трансплантации размороженного КМ необлученным реципиентам. В отличие от этого результата трансплантация свежего КМ необлученным реципиентам привела к увеличению СПЖ на 25%, вероятно, за счет временного замещения недостающего пула short-term клеток стареющего организма клетками молодого донора [7]. Поскольку ГСК являются гетерогенной популяцией [42], их разную выживаемость при криоконсервировании можно объяснить неодинаковой устойчивостью к физико-химическим факторам, действующим на клетки в течение этого процесса.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что криоконсервированный КМ оказался достаточно эффективным для выживания облученных в дозе 7 Гр мышей, хотя их СПЖ оказалась несколько ниже, чем в эксперименте с трансплантацией свежего КМ. Анализ пробы крови, взятой из хвостовой вены мышей, показал пожизненное заселение органов системы крови реципиента GFP⁺-клетками донора, что, возможно, происходит за счет приживания плюрипотентных ГСК (long-term cells) криоконсервированного КМ. Количество клеток КМ, криоконсервированных для каждого реципиента, было достаточно высоким для выживания и практически не отличалось от такового для свежего КМ. Побочных эффектов, связанных с токсичностью ДМСО при трансплантации КМ совместно с криопротектором (5% ДМСО с 3% полиглюкина в конечной концентрации), не зарегистрировано. Установлено существенное снижение жизнеспособности и уровень экспрессии EGFP после отмывания клеток от криопротектора, а также при нарушении режима заморозки. Показано, что определение жизнеспособности размороженных клеток по флуоресценции трипанового синего является более чувствительным методом по сравнению с вариантом определения жизнеспособности клеток в проходящем свете. Дальнейшее детальное изучение способов замораживания и особенностей приживаемости клеток криоконсервированного КМ как без предварительной обработки реципиентов, так и после воздействия повреждающих факторов позволит совершенствовать методики клеточной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Ezzone and K. Schmit-Pokorny, *Blood and marrow stem cell transplantation*. (Jones & Bartlett Learning, 2007).
2. С. В. Грицаев, С. С. Бессмельцев, С. А. Пономарев и др. *Метод криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток для аутологичной трансплантации. Методические рекомендации* (Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, 2015).
3. R. K. Burt, M. C. Oliveira, S. J. Shah, et al., *Lancet* **381** (9872), 1116 (2013).
4. J. M. van Laar, S. I. Nihtyanova, and K. Naraghi, *Lancet* **381** (9883), 2079 (2013).
5. А. В. Карнаухов, Е. В. Карнаухова, Л. А. Сергиевич и др., *Биофизика* **59** (4), 790 (2014).
6. Е. В. Богданенко, А. В. Карнаухов, Е. В. Карнаухова и др., *Патогенез* **13** (3), 13 (2015).
7. A. V. Karnaukhov, E. V. Karnaukhova, L. A. Sergievich, et al., *J. Biophys.* (2015). Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jbp/aip/686249/>.
8. Л. А. Сергиевич, Е. В. Карнаухова, А. В. Карнаухов и др., *Биофизика* **63** (1), 115 (2018).
9. А. В. Карнаухов и Е. В. Карнаухова, *Биофизика* **54** (4), 726 (2009).
10. А. В. Карнаухов, Е. В. Карнаухова, Л. А. Сергиевич и др. *Биофизика* **62** (5), 1008 (2017).
11. C. Donaldson, W. J. Armitage, P. A. Denning-Kendall, et al., *Bone Marrow Transplant.* **18**, 725 (1996).
12. А. А. Степанов, Е. В. Коротаев, С. С. Бессмельцев и др., *Клинич. медицина. Терапия. Гематология* **14**, 489 (2013).
13. V. Antonenas, P. J. Shaw, and K. F. Bradstock, *Bone Marrow Transplant.* **34**, 739 (2004).
14. А. А. Цуцаева, В. А. Аграненко и Л. И. Федорова, *Криоконсервирование клеточных суспензий* (Наук. думка, Киев, 1983).
15. А. А. Костяев, А. К. Мартусевич и А. А. Андреев, *Науч. обозрение. Медицинские науки* **6**, 54 (2016).
16. Л. А. Бабийчук, О. В. Кудокоцева, П. М. Зубов и др., *Укр. химиотерапевтич. журн.* **1**, 85 (2008).
17. M. Okabe, M. Ikawa, K. Kominami, et al., *FEBS Lett.* **407** (3), 313 (1997).
18. N. Kawakami, N. Sakane, F. Nishizawa, et al., *Immunol. Lett.* **70** (3), 165 (2000).
19. www.biocision.com/products/CoolCell-LX-Freezing-Container.
20. В. А. Карнаухов, Н. А. Карнаухова, Л. А. Сергиевич и В. Н. Карнаухов, в сб. *Материалы III Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии* (Москва, 2010), т. 4, сс. 43–46.
21. S. A. Altman, L. Randers, and G. Rao, *Biotechnol. Prog.* **9**, 671 (1993).
22. K. S. Louis and A. C. Siegel, in *Mammalian cell viability: methods and protocols*, Ed. by M. J. Stoddart (Springer, Berlin, 2011), Vol. 740, pp. 7–12.
23. A. Reardon, J. Elliott, and L. McGann, *Cryobiology* **69**, 91 (2014).
24. L. Chan, D. Kuksin, D. Laverty, et al., *Cytotechnology* **67**, 461 (2015).
25. J. D. Loike and S. C. Silverstein, *J. Immunol. Methods* **57** (1–3), 373 (1983).
26. O. N. Shilova, E. S. Shilov, and S. M. Deyev, *Cytometry A* **91** (9), 917 (2017).
27. T. Waris and K. Reijonen, *Ann. Chir. Gynaecol.* **65** (5), 328 (1976).
28. C. W. Adams, O. B. Bayliss, and R. S. Morgan, *Atherosclerosis* **27** (3), 353 (1977).
29. M. E. Wissel and L. C. Lasky, in *Hematopoietic Progenitor Cells: Processing, Standards and Practice*, Ed. by M. E. Brecher, L. C. Lasky, R. A. Sacher, and L. A. Issitt (American Association of Blood Banks, Bethesda, 1995), pp. 109–124.
30. J. Perez-Oteyza, R. Bornstein, M. Corral, et al., *Hematologia* **83**, 1001 (1998).

31. P. Stiff, A. Murgo, C. Zaroulis, et al., *Cryobiology* **20**, 17 (1983).
32. А. А. Цуцаева, О. А. Дроздова, Л. В. Останкова и др., *Цитология* **16** (2), 14 (1982).
33. E. O. Niskanen, J. R. Welles, P. J. Quesenberry, et al., *Exp. Hematol.* **9** (4), 411 (1981).
34. T. Skorski and M. Kawalec, *Folia Histochem. Cytobiol.* **27** (2), 67 (1989).
35. B. Balint, Z. Ivanovic, M. Petakov, et al., *Bone Marrow Transplant.* **23**, 613 (1999).
36. P. M. Chaundary and I. B. Roninson, *Cell* **66**, 85 (1991).
37. Y. Kuwazuru, A. Yoshimura, and S. Hanoda, *Cancer* **66**, 868 (1990).
38. A. Petzer, L. Ponchio, L. Ponchio, et al., *Blood* **84** (Suppl. 1), 400a (1994).
39. N. Thanyaphong, D. Traver, I. Weissman, et al., *J. Clin. Investig.* **109** (12), 1579 (2002).
40. L. G. Smith, I. L. Weissman, and S. Heimfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2788 (1991).
41. T. D. Randall and I. L. Weissman, *Blood* **89** (10), 3596 (1997).
42. И. А. Чертков и А. Я. Фриденштейн, *Клеточные основы кроветворения* (Медицина, М., 1977).

The Effect of Cryopreservation of Bone Marrow Cells from Donor Mice Carrying the *egfp* Gene, on the Lifespan of Mice after Syngeneic Transplantation

L.A. Sergievich*, E.V. Karnaukhova*, A.V. Karnaukhov*, N.A. Karnaukhova*,
E.V. Bogdanenko**, I.A. Lizunova*, and V.N. Karnaukhov*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences,
Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia*

The effect of cryopreservation of bone marrow cells on the lifespan of mice after syngeneic transplantation has been studied in nonirradiated mice and 7-Gy-irradiated mice. Mice with the enhanced green fluorescent protein gene were donors. Bone marrow cells were cryopreserved according to the method used in clinical practice in the field of bone marrow autotransplantation in the treatment for patients with cancer. Dimethyl sulfoxide dissolved in polyglucine at the final concentration of 5% acted as a cryoprotectant agent. Transplantation of the thawed stem cells was carried out without washing out the cryoprotectant. No side effects associated with the cryoprotectant toxicity were observed. It has been shown that staining of bone marrow cells with trypan blue is a more selective technique to evaluate the extent of cell damage after cryopreservation. The mean lifespan of nonirradiated recipient mice was not statistically different from that of the intact control group. In irradiated recipient mice, the mean lifespan increased by $51 \pm 2\%$ compared to the group of irradiated controls. The analysis of a blood sample taken from the tail vein of irradiated mice revealed lifelong engraftment of donor-derived cells in the hematopoietic system of the recipient mice. Thus, model experiments on the syngeneic line of mice showed that cryopreserved bone marrow cells can be effectively used for cell therapy in autotransplantation in patients after X-ray radiation therapy.

Keywords: cryopreservation, transplantation, bone marrow, irradiation, life extension, GFP⁺ mice, information hypothesis of aging