Особливості токсичної та мутагенної дії кріопротекторів на перещеплювані культури клітин

О.А. Лаврик

Інститут експериментальної клінічної ветеринарної медицини, м. Харків

Peculiarities of Toxic and Mutagenic Cryoprotective Effect on Re-inoculated Cell Cultures

O.A. Lavrik

Institute of Experimental Clinical Veterinary Medicine, Kharkov

Більшість кріопротекторів – токсичні для біологічних об'єктів, в тому числі й для перещеплюваних культур клітин, але їх мутагенний вплив на культури клітин мало вивчений і потребує додаткових досліджень.

На моделі перещеплюваних клітин PK-15-IECVM (клітини нирки свині) та BHK-21 clone 13/04 (клітини нирки сірійського хом'ячка) було вивчено вплив на їх збереження, адгезивні та цитогенетичні порушення наступних кріопротекторів: диметилсульфоксиду (ДМСО), оксиетильованого гліцерину (ОЕГ) зі ступенем полімеризації 5, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), ацетилетаноламіну, оксиетильованого N-ацетилетаноламіну, ПЕГ-400, диметилацетаміду та ПЕО-1500, які додавались до кріозахисних середовищ у концентрації 10%. Суспензія культур клітин у кріозахисному середовищі була розфасована в скляні ампули з концентрацією 10-12 млн/см^3 та законсервована в рідкому азоті.

Після зберігання біомаси клітин у рідкому азоті 30 діб порушення адгезивних властивостей клітин були більш виражені при використанні кріопротекторів ОЕГ, ПЕГ-400 та диметилацетаміду (близько 15% клітин втрачали адгезивну здатність, а при застосуванні ДМСО – 5%).

Аналіз мітотичного режиму клітин PK-15-IECVM показав значне пригнічення проліферативних властивостей клітин (більш ніж у 2 рази в порівнянні з показниками до кріоконсервування) після їх заморожування з використанням більшості кріопротекторів, окрім ДМСО та ПЕО-1500. Клітини, що були заморожені з більшістю кріопротекторів, після відтавання мали знижену мітотичну активність, але після 2-х пасажів їх проліферативні властивості нормалізувались до рівня перед кріоконсервуванням. При використанні 1,2-ПД та диметилацетаміду нормалізації не спостерігалося. Мітотична активність клітин, заморожених у середовищі з ДМСО, після деконсервування практично не змінювалась. У той же час кількість патологічних мітозів у клітин, кріоконсервованих у присутності ДМСО, на нульовому пасажі на 10-20% перевищувала аналогічний показник у клітин, які заморожувались з іншими кріопротекторами, що свідчить про мутагенні властивості цього кріопротектора.

За хромосомним аналізом клітин після заморожування-відтавання не встановлено достовірних розбіжностей щодо їх показників у клітин на нульовому пасажі, але розмах мінливості кількості хромосом у більшості кріопротекторів, окрім ДМСО, збільшився в бік гіпоплодії.

Отримані результати потребують проведення дослідів щодо пошуку оптимального складу кріозахисних середовищ для перещеплюваних культур клітин, які на фоні високих кріозахисних властивостей не будуть мати мутагенний вплив на хромосомний апарат цих клітин.

The majority of cryoprotectants are toxic for biological objects, including re-inoculated cell cultures, but their mutagenic effect on cell cultures is poorly studied and needs to be additionally investigated.

In the model of re-inoculated PK-15-IECVM cells (pig kidney cells) and BHK-21 clone 13/04 (Syrian hamster kidney cells) we have studied the effect on their integrity, adhesive and cytogenic disorders of following cryoprotectants: dimethyl sulfoxide (DMSO), oxyethylated glycerol (OEG) with 5 polymerisation grade, 1,2-propanediol (PD), acetyl ethanolamine, oxyethylated N-acetyl ethanolamine, PEG-400, dimethyl acetamide and PEO-1500, added into cryoprotective media in 10% concentration. Cell culture suspension in a cryoprotective medium was packed into glass vials with 10-12 mln/cm^3 concentration and preserved into liquid nitrogen.

Following 30 days after cell biomass storage in liquid nitrogen the disorders in cell adhesive properties were mostly manifested when using OEG, PEG-400 and dimethyl acetamide cryoprotectants (near 15% cells lost their adhesive ability versus 5% for DMSO).

Analysis of PK-15-IECVM cell mitotic regimen has demonstrated a significant suppression of cell proliferative properties (more than twice compared to the indices prior to cryopreservation) and after their freezing when the majority of cryoprotectants except DMSO and PEO-1500) was used. Cells frozen with the majority of cryoprotectants after thawing had a decreased mitotic activity but after 3 passages their proliferative properties normalised up to the level prior to cryopreservation. When using 1,2-PD and dimethyl acetamide no normalisation was observed. Mitotic activity of cells, frozen in the media with DMSO after freeze-thawing was practically unchanged. At the same time the number of pathological mitosis in cells, cryopreserved in DMSO presence at 0 passage exceeded by 10-20% the same index in cells, frozen with other cryoprotectants that testified to mutagenic properties of this cryoprotectant.

When using chromosome cell analysis after freeze-thawing no statistically significant differences as for their indices in cells at 0 passage were established but the variation range of chromosome number in the majority of cryoprotectants, except DMSO augmented towards hypoploidy.

The results obtained require the further investigations, directed to search for an optimal composition of cryoprotective media for re-inoculated cell cultures, that will not have a mutagenic effect on chromosome apparatus of these cells at the background of high cryoprotective properties.