

Исследование *in vitro* апоптоза и некроза при холодовом хранении на модели клеток дыхательных путей человека

In Vitro Assessment of Apoptosis and Necrosis Following Cold Storage in a Human Airway Cell Model

W.L. CORWIN^{1,2}, J.M. BAUST^{1,2}, R.G. VAN BUSKIRK^{1,2}, J.G. BAUST²

¹Cell Preservation Services, Inc., Owego, New York, USA

²Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, New York, USA

Достижения в области медицинских технологий повышают эффективность трансплантируемых клеток и тканей, но конкретные молекулярные реакции клеток на низкотемпературное хранение полностью не исследовано. Несмотря на большое внимание, уделяемое разработке составов растворов для перфузирования тканей при хранении для повышения их жизнеспособности, исследования сложных молекулярных изменений, которые происходят во время холодового воздействия и их последующего влияния на конечный результат, по-прежнему немногочисленны. Понимание природы клеточного стресса на молекулярном уровне имеет фундаментальное значение, поскольку такие сведения указывают на критические аспекты в процедурах хранения и трансплантации тканей, а также в развитии новых технологий и процессов в других областях клеточной биологии, биотехнологии и т.д.

Цель работы – количественная оценка уровня гибели клеток после гипотермического хранения на модели клеток легких для создания основы перспективных углубленных молекулярных исследований, направленных на улучшение процедуры трансплантации легких.

Нормальные фибробласты легких человека (IMR-90) хранили в течение 1, 2 и 3 суток при 4°C в минимальной среде, полной среде и среде ViaSpan. Жизнеспособность оценивали через 1, 2 и 3 суток после хранения с использованием метаболического индикатора Alamar Blue™. Для определения уровня вовлечения процессов апоптоза и некроза использовали проточную цитометрию и дополнительно результаты подтверждали с помощью визуализации с флуоресцентной микроскопией через 1, 4, 8 и 24 ч после хранения с помощью теста на апоптоз Vybrant®.

Анализ показал, что в образцах со средой ViaSpan жизнеспособность клеток после 24 ч хранения при 4°C составила 68% (±4%), а репопуляция – 103% (±6%) в течение 3 суток. Хранение в других средах привело к полной потере жизнеспособности клеток после 24 ч гипотермического хранения и отсутствию репопуляции. Увеличение срока хранения до 3 суток, привело к полной потере жизнеспособности клеток в каждом варианте исследований. Анализ апоптотических и некротических популяций в образцах, хранившихся в среде ViaSpan, показал, что через 8 ч после гипотермического хранения 5% клеточной популяции было в состоянии апоптоза, а 20% – в состоянии некроза. Результаты подтвердили высокий уровень чувствительности данной клеточной системы к холодовому хранению, которое привело к значительному уровню гибели клеток вследствие как апоптоза, так и некроза. Эти данные свидетельствуют о необходимости более глубокого понимания молекулярных изменений в клетках как результата холодового воздействия.

As advances in medical technology improve the ability and efficacy of cells and tissues to be transplanted, there remains a void in our knowledge of the specific molecular response of cells to low temperature storage. While much focus has been given to the formulation of solutions to perfuse the tissue during storage to increase viability, investigations into the complex molecular changes that occur during cold exposure and their subsequent effect on outcome remain limited. An understanding of cellular stress on a molecular level is of fundamental importance as such information proves critical to tissue storage and transplantation as well as to the development of new technologies and processes in non-related areas of cell biology, bioprocessing, etc. The intent of this study was to begin to quantify the levels of cell death following hypothermic storage in a lung cell model in order to establish a foundation for future in depth molecular studies in support of improved lung transplantation.

Normal human lung fibroblast (IMR-90) cells were stored statically for 1, 2 and 3 days at 4°C in basal media, complete media, and ViaSpan. Post-storage viability was assessed at 1, 2 and 3 days post-storage using the metabolic indicator Alamar Blue™. To determine the level of apoptotic and necrotic involvement, flow cytometry was performed and corroborated via visualization under fluorescent microscopy at 1, 4, 8 and 24 hours post-storage using the Vybrant® apoptosis assay.

Sample analysis revealed that cells stored in ViaSpan were 68% (±4%) viable after 24 hours of storage at 4°C and repopulated to 103% (±6%) within 3 days. The other solutions resulted in complete cell loss after 24 hours of hypothermic storage with no re-growth observed. Extension of the storage interval to 3 days resulted in complete cell loss in all conditions. Analysis of the apoptotic and necrotic populations in the ViaSpan stored samples revealed that 5% of the population was apoptotic at 8 hours post-storage while around 20% of the same population was found to be necrotic. The data revealed a high level of sensitivity to cold storage for this cell system, resulting in a significant amount of cell death, through both apoptosis and necrosis. These data highlight the critical need for a more indepth understanding of the molecular changes that occur as a result of cold exposure in cells.