

## Оценка фенотипических характеристик фетальных нервных клеток после криоконсервирования с использованием различных режимов замораживания

UDC 612.647.08.014.3:615.014.41

Ye.A. POROZHAN\*, M.V. OSTANKOV, N.N. BABENKO, A.N. GOLTSEV

## Assessment of Phenotype Characteristics of Fetal Neural Cells After Cryopreservation Using Different Freezing Regimens

В работе проанализировано влияние трех различных режимов криоконсервирования на субпопуляционный состав фетальных нервных клеток (ФНК) 11 суток гестации. К действию физико-химических факторов криоконсервирования, реализуемых при использовании данных режимов замораживания, различные субпопуляции ФНК проявляли разную чувствительность. Установлен факт большей криостабильности глиальных и стволовых клеток в гетерогенном составе биоматериала независимо от режима замораживания. Показано, что при использовании одного из режимов в общем пуле ФНК увеличивается количество мультипотентных прогениторных клеток с фенотипом CD133 и nestin за счет гибели более дифференцированных предшественников нейронов. Доказано селективное влияние определенных режимов криоконсервирования на гетерогенный состав ФНК.

**Ключевые слова:** фетальные нервные клетки, криоконсервирование, стволовые клетки.

В роботі проаналізовано вплив трьох різних режимів криоконсервування на субпопуляційний склад фетальних нервових клітин (ФНК) 11 діб гестації. До дії фізико-хімічних факторів криоконсервування, що реалізуються при використанні даних режимів заморожування, різні субпопуляції ФНК проявляли різну чутливість. Встановлено факт більшої криостабільності гліальних і стовбурових клітин в гетерогенному складі біоматеріалу незалежно від режиму заморожування. Показано, що при використанні одного з режимів в загальному пулі ФНК збільшується кількість мультипотентних прогеніторних клітин з фенотипом CD133 і nestin за рахунок загибелі більш диференційованих попередників нейронів. Доведено селективний вплив певних режимів криоконсервування на гетерогенний склад ФНК.

**Ключові слова:** фетальні нервові клітини, криоконсервування, стовбурові клітини.

In the paper the effect of three different cryopreservation regimens on subpopulation composition of fetal neural cells (FNCs) of 11 gestation days was analyzed. FNC subpopulations revealed different sensitivity to the effect of physical and chemical factors of cryopreservation, implemented when using these freezing regimens. The fact of higher cryostability of glial and stem cells in biomaterial of heterogenous composition independently on freezing regimen was found. It has been shown that using one of the regimens in general pool of FNCs the number of multipotent progenitor cells with CD133 and nestin phenotype increases due to the death of more differentiated neuron precursors. Selective effect of certain cryopreservation regimens on heterogenous content of FNCs was proved.

**Key words:** fetal neural cells, cryopreservation, stem cells.

Обоснованность применения метода тканевой и клеточной терапии в современной медицине [18] объясняется присутствием во вводимом материале клеток стволового компартмента различного уровня дифференцировки, а также широкого спектра продуцируемых ими биологически активных веществ, которые обладают высокой терапевтической эффективностью [15].

Механизм действия применяемых фетальных нервных клеток (ФНК) определяется их структурными и функциональными особенностями. Криоконсервирование – один из этапов технологического процесса применения ФНК в клинической практике – позволяет хранить сертифицированный

Expediency of applying the tissue and cell therapy in contemporary medicine [18] is explained by the presence in the administered material of the stem compartment cells of different differentiation rate, as well as a wide spectrum of the produced by them biologically active substances, possessing a high therapeutic efficiency [15].

The action mechanism of applied fetal neural cells (FNCs) is determined by their structural and functional peculiarities. Cryopreservation is one of the stages of technological process of applying the FNC in clinic, it allows the storage of certified biomaterial during different time at low temperature banks and its application when the need arise [13].

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-57-89, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: janepor@yandex.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 57 89, fax: +380 57 373 3084, e-mail: janepor@yandex.ru

биоматериал на протяжении различного времени в условиях низкотемпературных банков и использовать его по мере востребованности [13].

Установлено, что криоконсервирование оказывает многовекторное влияние на структуру и функцию биообъекта [14]. При замораживании-оттаивании происходит угнетение жизнедеятельности тканей и клеток, изменяются их функциональные свойства, так как при этом замедляются процессы восстановления и удлиняется рефрактерный период [6]. В настоящее время интенсивно проводятся экспериментальные исследования природы криолабильности и криорезистентности клеточных суспензий [5]. Сведения о морфологической и функциональной сохранности криоконсервированных ФНК (кФНК), включая и элементы стволового компартмента, весьма противоречивы, что можно объяснить широким спектром методических подходов к реализации процесса замораживания-оттаивания [3, 24, 25]. Кроме того, степень его влияния определяется не только воздействием физико-химических факторов, но и исходным состоянием биообъекта [4].

Учитывая гетерогенный клеточный состав ткани фетального мозга с определенной функциональной активностью для каждого типа клеток, особое значение приобретает сохранение при замораживании-оттаивании клеточных популяций.

Цель данной работы – исследовать влияние различных режимов криоконсервирования на субпопуляционный состав ФНК.

### Материалы и методы

Объектом исследования были клетки фетального мозга крыс 11 суток гестации. Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.).

Извлеченные плоды крыс 11 суток гестации [2] трижды промывали в стерильном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия) и переносили в чашку Петри для препарирования. С помощью пинцета и глазных ножниц извлекали головной мозг, освобождали его от мезенхимной оболочки и разрезали на фрагменты [1]. Для получения суспензии ФНК ткань мозга гомогенизировали в 3 мл раствора Хенкса, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («БиоЛек», Россия). Все манипуляции проводили при 4°C.

Используемые режимы (Р) замораживания:

Р1: охлаждение со скоростью 1 град/мин до –5°C с последующей инициацией кристаллообразования,

Cryopreservation has been found to render a multi-vector effect on bioobject structure and function [14]. During freeze-thawing the suppression of vital activity of tissues and cells takes place, their functional properties change since herewith the recovery processes slow-down and refractory period extends [6]. Nowadays, experimental studies of the origin of cryolability and cryoresistance of cell suspensions have been intensively carried-out [5]. Data on morphological and functional integrity of cryopreserved FNCs (cFNCs) including also the elements of stem compartment are very contradictory, which can be explained by a wide range of methods to perform freeze-thawing [3, 24, 25]. In addition, the extent of its effect is determined not only by physical and chemical factors, but also with initial state of bioobject [4].

Taking into account heterogenous cell composition of fetal brain tissue with certain functional activity for each cell type, of special value is the preserving of cell populations during freeze-thawing.

The research aim was to study the effect of different cryopreservation regimens on subpopulation composition of FNCs.

### Materials and methods

Research objects were the cells of rat fetal brain of 11 gestation days. The experiments were performed in accordance with the General principles of experiments in animals approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and coordinated with the statements of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The derived fetuses of rats of 11 gestation days [2] were thrice washed in sterile Hanks' solution (PanEco, Russia) and transferred to Petri dish for dissection. By means of forceps and ophthalmic scissors the brain was excised, the mesenchyme membrane was removed and tissue was cut into fragments [1]. To obtain the suspension of FNC the brain tissue was homogenized in 3 ml of Hanks' solution, containing 10% fetal bovine serum (FBS) (BioLek, Russia). All the manipulations were performed at 4°C.

The used regimens (R) of freezing were as follows:

R1: cooling with the rate of 1 deg/min down to –5°C with following initiation of crystal formation, then cooling with the rate of 2 deg/min down to –60°C and plunging into liquid nitrogen [8];

R2: cooling with the rate of 1 deg/min down to –80°C and plunging into liquid nitrogen [24];

R3: cooling with the rate of 1 deg/min down to –9°C, stop for 10 min, then cooling with the rate of 1 deg/min down to –25°C, 10 deg/min down to –60°C and plunging into liquid nitrogen [9];

Fetal neural cells were frozen in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Galichfarm, Ukraine) in

затем охлаждение со скоростью 2 град/мин до  $-60^{\circ}\text{C}$  и погружение в жидкий азот [8];

P2: охлаждение со скоростью 1 град/мин до  $-80^{\circ}\text{C}$  и погружение в жидкий азот [24];

P3: охлаждение со скоростью 1 град/мин до  $-9^{\circ}\text{C}$ , остановка в течение 10 мин, затем охлаждение со скоростью 1 град/мин до  $-25^{\circ}\text{C}$ , 10 град/мин до  $-60^{\circ}\text{C}$  и погружение в жидкий азот [9].

Фетальные нервные клетки замораживали с диметилсульфоксидом (ДМСО) (АО «Галичфарм», Украина) в конечной концентрации 7% (для P1 и P2) и 10% (для P3). В качестве среды криоконсервирования использовали раствор Хенкса с добавлением 0,6% глюкозы, 10% ЭТС, 0,2 Ед/мл инсулина. Раствор ДМСО добавляли к суспензии ФНК через инъекционную иглу по каплям в соотношении 1:1 (по объему) при постоянном легком перемешивании суспензии. Экспозиция с криопротектором составляла 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ .

Суспензию ФНК с концентрацией  $5 \times 10^6$  кл/мл замораживали на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) в пластиковых ампулах («Nunc», Германия) объемом 1,8 мл. Замороженные ФНК хранили при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАН Украины 2 месяца. Образцы отогревали на водяной бане при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 50 с при постоянном встряхивании ампул [2] (до исчезновения твердой фазы). Для отмывания клеток от ДМСО однократно медленно добавляли равный объем раствора Хенкса, содержащего 20% ЭТС, затем центрифугировали (1000 об/мин, 10 мин). Сохранность ФНК до и после криоконсервирования определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим (ТС) и раствором пропидия йодида (PI) (5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере) («Sigma», США).

Для оценки экспрессии фенотипических маркеров ФНК применяли метод проточной цитофлуориметрии с использованием первичных моноклональных антител (МАТ) к внутриклеточным антигенам nestin (клон RAT401, кат. №556309), GFAP (клон 2E1, кат. №556329),  $\beta$ -tubulin III (клон 5H1, кат. №556321) и вторичных МАТ, меченных Fluorescein isothiocyanate (FITC): для nestin –  $\text{IgG}_{1,\kappa}$  (клон R3-34, кат. №553924), для GFAP –  $\text{IgG}_{2,\text{b}}$  (клон A95-1, кат. №553988), для  $\beta$ -tubulin III – Ig Specific Polyclonal Antibody (Multiple Adsorption) (кат. №554001). В качестве изотипов использовали FITC-меченные  $\text{IgG}_{1,\kappa}$  (клон MOPC-31, кат. №550616),  $\text{IgG}_{2,\text{b}}$  (клон MPC-11, кат. № 559532),  $\text{IgM}_{\kappa}$  (клон G155-228, кат. №551448) соответственно (все «BD Pharmingen», США). Перед инкубацией с МАТ для внутриклеточных антигенов, как описано в протоколе фирмы-производителя, клетки предварительно пермеабилizировали с использованием реактивов Cytofix/

final concentration of 7% (for R1 and R2) and 10% (for R3). Hanks' solution supplemented with 0.6% glucose, 10% FBS and 0.2 units/ml insulin was used as medium. DMSO solution was added to the suspension of FNCs via injection needle dropwise in 1:1 (v/v) ratio at constant slight shaking of the suspension. Exposure with cryoprotectants lasted 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ .

FNCs suspension with concentration of  $5 \times 10^6$  cells per ml was frozen with programmable freezer UOP-6 (Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine) in 1.8 ml plastic ampoules (Nunc, Germany). Frozen FNCs were stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  at low temperature bank of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine for 2 months. The samples were thawed in water bath at  $37^{\circ}\text{C}$  for 50 s at constant shaking [2] (up to disappearance of solid phase). To remove DMSO from cell suspension an equal volume of Hanks' solution containing 20% FBS was added slowly once, thereafter it was centrifuged (1,000 rpm, 10 min). Integrity of FNCs prior to and after cryopreservation was found by supravital staining with trypan blue (TB) and solution of propidium iodide (PI) (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in phosphate saline buffer) (Sigma, USA).

To estimate the expression of phenotype markers of FNCs the flow cytometry was applied using primary monoclonal antibodies (MABs) to intracellular antigens nestin (clone RAT401, cat. Nr. 556309), GFAP (clone 2E1, cat. Nr. 556329),  $\beta$ -tubulin III (clone 5H1, cat. Nr. 556321) and secondary MABs, labeled with Fluorescein isothiocyanate (FITC): for nestin –  $\text{IgG}_{1,\kappa}$  (clone R3-34, cat. Nr. 553924) for GFAP –  $\text{IgG}_{2,\text{b}}$  (clone A95-1, cat. Nr. 553988), for  $\beta$ -tubulin III – Ig Specific Polyclonal Antibody (Multiple Adsorption) (cat. Nr. 554001). As isotypes there were used FITC-labeled  $\text{IgG}_{1,\kappa}$  (clone MOPC-31, cat. Nr. 550616),  $\text{IgG}_{2,\text{b}}$  (clone MPC-11, cat. Nr. 559532)  $\text{IgM}_{\kappa}$  (clone G155-228, cat. Nr. 551448), correspondingly (all reagents from BD Pharmingen, USA). Prior to incubation with MABs for intracellular antigens as described in the protocol of manufacturer, the cells were preliminarily permeabilized using the reagents Cytofix/Cytoperm (Fixation/Permeabilization Solution) (cat. Nr. 554722) and Perm/Wash Buffer (cat. Nr. 554723) (BD Pharmingen).

To reveal surface antigen CD133 there were used primary MAB (clone 133A2, cat. Nr. ab8980) and secondary Goat Polyclonal Secondary Antibodies to Mouse IgG (cat. Nr. ab96879), isotype  $\text{IgG}_{3,\kappa}$  (clone ICIGG3, cat. Nr. ab91541) labelled with phycoerythrin (PE) (Abcam, USA). For investigation of the expression of antigens the cells were incubated with MAB for 30 min at  $25^{\circ}\text{C}$  in darkness; MABs were washed out in 100  $\mu\text{l}$  of colourless Hanks' solution, centrifuged, afterwards the sediment was diluted by 500  $\mu\text{l}$  of Hanks' solution. The cells were analyzed (10,000 cells per sample) with flow cytometer (FACS Calibur, BD,

Cytoperm (Fixation/Permeabilization Solution) (кат. № 554722) и Perm/Wash Buffer (кат. №554723) («BD Pharmingen»).

Для определения поверхностного антигена CD133 использовали первичные МАТ (клон 133A2, кат. №ab8980) и вторичные – Goat Polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG (кат. №ab96879), изотип – IgG<sub>3,κ</sub> (клон ICIGG3, кат. №ab91541), меченных phycoerythrin (PE; «Abcam», США). Для определения экспрессии антигенов клетки инкубировали с МАТ в течение 30 мин при 25°C в темноте; МАТ отмывали в 100 мкл бесцветного раствора Хенкса, центрифугировали, после чего к осадку добавляли 500 мкл раствора Хенкса. Клетки анализировали (по 10000 клеток на образец) на проточном цитофлуориметре («FACS Calibur», «BD», США). Были проанализированы количество меченных клеток и средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) исследуемых маркеров, отражающая плотность присутствия антигенов, выраженная в условных единицах (у. е.).

Обработку результатов цитофлуориметрического анализа проводили с помощью программы «WinMDI 2.9», а при статистической обработке полученных в работе результатов использовали программу «Stat 6».

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что ФНК чувствительны к процедуре выделения и получения клеточной суспензии. Так, сохранность нативных ФНК (нФНК), оцененная по окрашиванию ТС и PI составила  $59,7 \pm 5,1$  и  $63,0 \pm 5,8\%$  соответственно. После экспозиции ФНК с криопротектором изучаемые показатели достоверно не изменялись и были приняты за 100% (контроль).

Замораживание с использованием P1 привело к уменьшению количества кФНК (таблица). При этом сохранность по ТС составила от  $72,8 \pm 6,1$ , а по PI –  $78,8 \pm 4,9\%$  от контрольных значений. Замораживание согласно P2 достоверно снижало как количество клеток, так и их сохранность. После использования P3 количество и сохранность ФНК были самыми высокими (таблица).

Можно предположить, что низкие показатели сохранности и количества клеток после использования P2 связаны с повреждающим действием на клетки физико-химических факторов, зависящих как от скорости замораживания, так и от величины переохлаждения образцов, поскольку P1 и P3 предусматривали снятие переохлаждения в образцах перед началом кристаллизации.

Особенностями структурной организации различных типов клеток объясняется выбор протокола криоконсервирования с использованием определенной скорости замораживания.

USA). The number of labelled cells and mean fluorescence intensity (MFI) of the studied markers reflecting the density of present antigens, expressed in arbitrary units (arb. units) were analyzed.

The results of cytofluorimetric analysis were processed using WinMDI 2.9 and statistical processing was performed with Stat 6 software.

### Results and discussion

The performed studies have shown that FNCs were sensitive to procedures of isolation and procurement of cell suspension. The integrity of native (fresh/intact) FNCs (nFNCs) assessed by TB and PI staining made  $59.7 \pm 5.1$  and  $63.0 \pm 5.8\%$ , correspondingly. After exposure of FNCs with cryoprotectant the studied indices did not statistically and significantly change and were assumed as 100% (the control).

Freezing using the R1 led to the lessening of the post thaw number of cFNCs (Table). Herewith the post thaw integrity by TB made  $72.8 \pm 6.1$  and by PI it was  $78.8 \pm 4.9\%$  from the control values. Freezing according to R2 statistically and significantly decreased both the post thaw number of cells and their integrity. After application of R3 the number of FNCs and integrity were the highest (Table).

One can suppose that low indices of preservation rate and number of cells after using R2 are related to damaging effect on cells of physical and chemical factors depending both on cooling rate and on the level of overcooling of the samples, because R1 and R3

Влияние криоконсервирования с различными режимами замораживания на показатели количества и сохранности ФНК

Effect of cryopreservation with different regimens of freezing on indices of number and preservation rate of FNCs

Режим Regimen	Количество клеток,% от контроля Number of cells, % from the control	Сохранность,% от контроля Integrity,% from the control	
		Окраска трипановым синим Trypan blue staining	Окраска пропидий йодидом Propidium iodide staining
Нативные ФНК Native FNCs	100	100	100
P1 R1	$84,4 \pm 6,9^*$	$72,8 \pm 6,1^*$	$78,8 \pm 4,9^*$
P2 R2	$48,2 \pm 3,1^*$	$28,2 \pm 2,9^*$	$32,2 \pm 3,1^*$
P3 R3	$89,1 \pm 7,3$	$78,7 \pm 1,9^*$	$82,3 \pm 3,7^*$

**Примечание:** \* – различия показателей достоверны по сравнению с нФНК после экспозиции с криопротектором,  $p < 0,05$

**Notes:** \* – differences of indices are statistically significant if compared with nFNCs after exposure with cryoprotectant,  $p < 0.05$ .

Режим P1 предусматривает предотвращение переохлаждения образца перед началом кристаллизации [3]. Данный факт особенно важен с учетом того, что критическим этапом при криоконсервировании биоматериала является область фазовых переходов, когда вероятность возникновения глубоких криповреждений консервированного материала наибольшая [6]. Предполагается, что при медленном охлаждении, используемом в P2, свободная вода успевает выйти из клетки и повреждающее действие внутриклеточных кристаллов должно быть минимизировано [11]. Однако после использования этого режима наблюдали минимальную по сравнению с P1 и P3 жизнеспособность деконсервированных ФНК, что может быть объяснено повреждением мембран клеток вследствие механического напряжения, вызванного избыточной дегидратацией и последующим уменьшением объема клетки до критического уровня [6]. Режим P3 предусматривает остановку охлаждения при  $-9^{\circ}\text{C}$  для температурной адаптации клеток, медленное охлаждение до  $-25^{\circ}\text{C}$  с последующим увеличением скорости охлаждения для преимущественной сохранности функционально активных недифференцированных предшественников [20, 21].

Криоконсервирование может влиять на клеточный метаболизм различных субпопуляций ФНК, вызывая изменения их интегрального функционального статуса [4]. Поэтому от используемого режима замораживания может зависеть эффективность терапевтического применения биоматериала, в частности ФНК. Ранее были получены данные, касающиеся селективного влияния определенных режимов замораживания на субпопуляционный состав ФНК [2, 3, 7].

Каждый тип клеток имеет особый спектр цитоскелетных белков, присутствующих в определенном соотношении на различных стадиях развития и расположенных специфически [22]. Изменение структуры элементов цитоскелета приводит к значительным функциональным нарушениям в клетках [23]. Предполагают, что после криоконсервирования могут меняться особенности цитоскелетной организации клеток [17]. Поэтому изучение фенотипических характеристик ФНК представляет особый интерес для понимания механизмов влияния замораживания-оттаивания на субпопуляционный состав фетального мозга.

Субпопуляционный состав ФНК наиболее полно можно оценить цитофлуориметрически с использованием панели МАТ, специфичных к структурам прогениторных нейроцитов, глиальных и нейрональных предшественников. Наиболее ранние нейральные стволовые клетки (НСК), которые являются эндотелиальными прогениторами и способны в дальнейшем дифференцироваться в нейро-

involved the avoidance of overcooling in the samples prior to crystallization onset.

The features of structural organization of different cell types underlie the choice of the cryopreservation protocol using certain freezing rate.

Regimen R1 involves the preventing of sample overcooling prior to crystallization onset [3]. This fact is especially important taking into account that the critical stage during biomaterial cryopreservation is the zone of phase transitions, when the probability of appearance of severe cryoinjuries of preserved material is the highest [6]. It is supposed that slow cooling used in R2 allows free water to be released from a cell and damaging effect of intracellular crystals should be minimized [11]. However, after application of this regimen the minimum viability of frozen-thawed FNCs was observed if compared with R1 and R3, which may be explained by the damage of cell membranes due to mechanical tension, caused by surplus dehydration and following reduction of cell volume down to critical level [6]. R3 provides a pause in cooling at  $-9^{\circ}\text{C}$  for temperature adaptation of cells, slow cooling down to  $-25^{\circ}\text{C}$  with following rise of cooling rate for predominant preservation of functionally active non-differentiated precursors [20, 21].

Cryopreservation may affect cell metabolism of different FNCs subpopulations, causing the changes in their integral functional status [4]. Therefore, the efficiency of therapeutic application of biomaterial, in particular FNCs, may depend on the used freezing regimen. Previously there have been obtained the data concerning selective effect of certain freezing regimens on subpopulation composition of FNCs [2, 3, 7].

Each type of cells has a special spectrum of cytoskeletal proteins of certain proportion, at various developmental stages, and located specifically [22]. Change in structure of cytoskeletal elements results in significant functional impairments of cells [23]. It is supposed that after cryopreservation the peculiarities of cell cytoskeletal organization may alter [17]. Therefore the study of phenotype characteristics is of special interest to understand the mechanisms of freeze-thawing effect on subpopulation composition of fetal brain.

Subpopulation composition of FNCs can be more adequately estimated by cytofluorimetry using MABs, specific to the structures of progenitor neurocytes, glial and neuronal precursors. The earliest neural stem cells (NSCs) being endothelial progenitors and capable of further differentiation into neuronal cells, astrocytes and oligodendrocytes, are identified by the presence on their membrane of CD133 marker (prominin) [12].

Neural differentiation is accompanied with the rise in expression of specific genes and correspondingly appearance in cells of such cytoskeletal proteins as nestin,  $\beta$ -tubulin III, GFAP (glial fibrillary acidic protein), the protein interacting with MAP2 microtubules (microtu-

нальные клетки, астроциты и олигодендроциты, идентифицируются по наличию на их мембране маркера CD133 (проминина) [12].

Нейральная дифференцировка сопровождается повышением экспрессии специфических генов и соответственно появлением в клетке таких белков цитоскелета, как nestin,  $\beta$ -tubulin III, GFAP (глиальный кислый фибриллярный белок), белок, взаимодействующий с микротрубочками MAP2 (microtubule-associated protein 2), и некоторых других маркеров [22]. Одними из важнейших компонентов цитоскелета являются промежуточные филаменты. Они создают внутриклеточный каркас, обеспечивают упругость клетки, поддерживают упорядоченность расположения компонентов цитоплазмы, координируют связи между внеклеточным матриксом, цитоплазмой и ядром. Промежуточные филаменты цитоскелета являются специфическими маркерами уровня тканевой и клеточной дифференцировки [10]. Один из стадиоспецифических белков цитоскелета нейроэпителиальных стволовых клеток nestin рассматривается как маркер мультипотентных прогениторов, постмитотических нейронов, ранних нейробластов [7]. Показано, что по мере дифференцировки нервной ткани синтез nestin подавляется [19], в дифференцирующихся астроцитах и нейронах начинают экспрессироваться GFAP и  $\beta$ -tubulin III соответственно [22]. GFAP – специфический маркер астроцитов, участвует в формировании глиальных филаментов и в молекулярных механизмах нейрон-астроцитарных взаимодействий [7].  $\beta$ -tubulin III является самым ранним из известных маркеров нейрональной дифференцировки [12].

Важный компонент анализа состояния ФНК методом проточной цитофлуориметрии – оценка интенсивности флуоресценции того или иного маркера с использованием показателя СИФ, который отражает количество экспрессируемых антигенных молекул и является объективным показателем структурно-функционального состояния клеток [5]. Учитывая функциональную роль каждого оцениваемого маркера, изменение плотности рецепторных структур на клетке переводит ее в иное функциональное состояние. Использование данного методического подхода показало, что криоконсервирование оказывало существенное влияние как на субпопуляционный состав ФНК, так и функциональную активность клеток (судя по СИФ) в субпопуляциях с определенными фенотипами.

Криоконсервирование с использованием P1 (рисунок) позволило сохранить практически все клеточные популяции фетального мозга на уровне нативного контроля с некоторой тенденцией к обогащению CD133<sup>-</sup> и nestin<sup>-</sup>-клетками, относящимися к стволовым, что соответствует данным, полученным ранее [13].

bule-associated protein 2) and some other markers [22]. One of the most important cytoskeletal components are intermediate filaments. They form intracellular skeleton, provide cell elasticity, maintain the ordered disposition of cytoplasm components, coordinate the relations between extracellular matrix, cytoplasm and nucleus. Intermediate filaments of cytoskeleton are specific markers of tissue and cell differentiation level [10]. One of stage-specific cytoskeletal proteins of neuroepithelial stem cells, nestin, is considered as the marker of multipotent progenitors, post-mitotic neurons, early neuroblasts [7]. It has been shown that along with the differentiation of nerve tissue the nestin synthesis is suppressed [19], in differentiating astrocytes and neurons correspondingly GFAP and  $\beta$ -tubulin III are expressed, [22]. GFAP is a specific marker of astrocytes, participates in the formation of glial filaments and in molecular mechanisms of neuron-astrocyte interactions [7]. Beta-tubulin III is the earliest among the known markers of neuronal differentiation [12].

An important component of analysis of FNC state by means of flow cytometry is the estimation of fluorescence intensity of any given marker using MFI, reflecting the amount of expressed antigen molecules and is an intrinsic index of structural and functional state of cells [5]. Taking into account a functional role of each marker to be studied, the change in density of receptor structures on a cell transfers it into other functional state. The use of this methodical approach has shown that cryopreservation affected strongly both the subpopulation composition of FNCs and functional activity of cells (judging on MFI) in the subpopulations with certain phenotypes.

Cryopreservation using R1 (Figure) enabled to preserve virtually all cell populations of fetal brain at the level of native control with a tendency to enrichment by CD133<sup>+</sup> and nestin<sup>+</sup> cells, referred to stem cells, that corresponded to the data obtained previously [13].

Regimen R2 manifested a certain 'aggression' in respect of neuroblasts and neuron precursors judging on a significant reduction of the number of  $\beta$ -tubulin III<sup>+</sup> cells (Figure). However the relative amount of glial elements considering GFAP<sup>+</sup> cells *vice versa* increased significantly. In this case we likely observed the redistribution of FNC populations due to higher cryoresistance of glial elements.

Regimen 3 resulted in predominant preservation of subpopulations referred to the elements with multipotent differentiation potential. The number of CD133<sup>+</sup> cells increased thrice with simultaneous rise in 2.4 times of the content of nestin<sup>+</sup> cells if compared with nFNCs. The cells of stem compartment had higher expression rate of CD133 and nestin markers (rise in MFI in 2.5 and 1.4 times, correspondingly if compared with nFNCs).

These changes were stipulated with the peculiarities of membrane lipid composition of progenitor cells, ma-

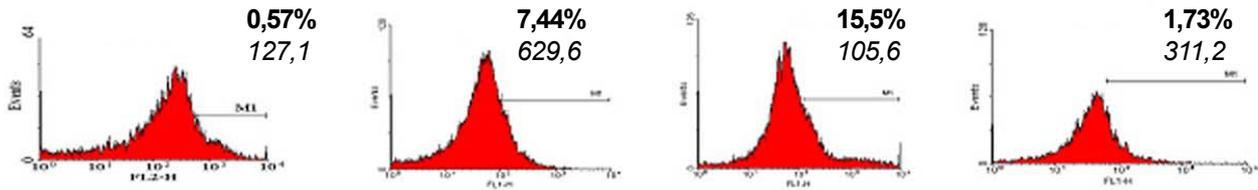
CD133<sup>+</sup>

nestin<sup>+</sup>

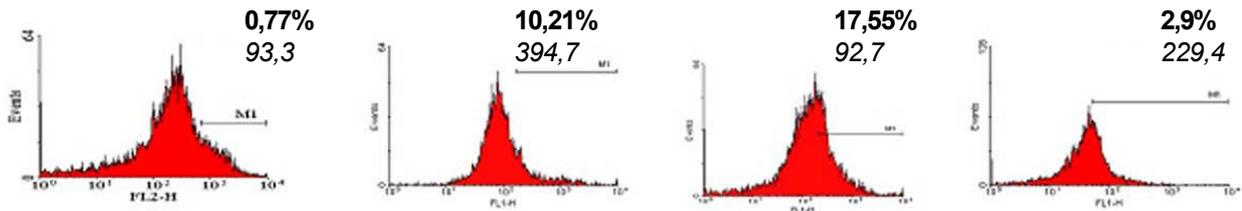
β-tubulin III<sup>+</sup>

GFAP<sup>+</sup>

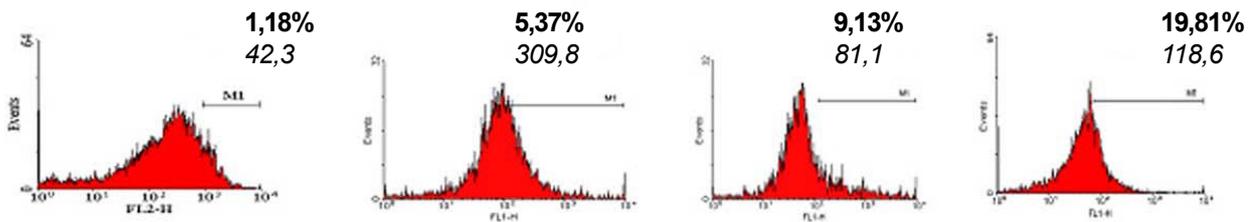
**Нативные ФНК Native FNCs**



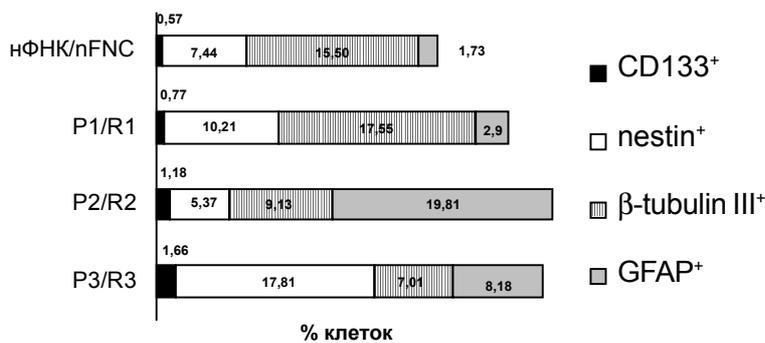
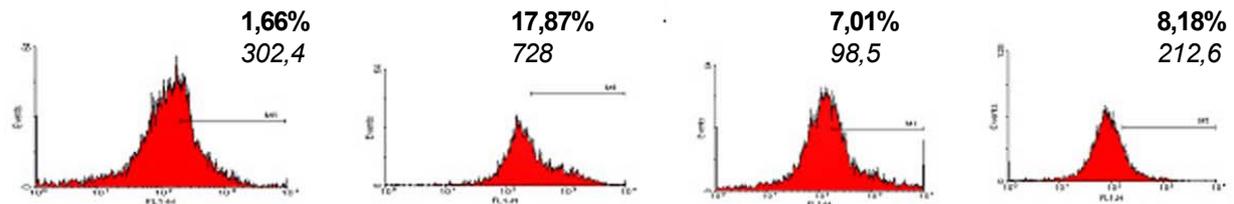
**Режим 1 Regimen 1**



**Режим 2 Regimen 2**



**Режим 3 Regimen 3**



Иммунофенотип нативных и криоконсервированных с использованием разных режимов замораживания ФНК 11 суток гестации. На гистограммах указано содержание клеток в общей популяции в процентах (жирным шрифтом) и соответствующая СИФ в условных единицах (курсивом).

Immune phenotype of native and cryopreserved according to different regimens FNCs of 11 gestation days. Histograms show content of cell population in total suspension, percents, (bold) and MFI in arbitrary units (italic).

Режим Р2 проявлял определенную «агрессивность» по отношению к нейробластам и предшественникам нейронов, судя по значительному снижению количества  $\beta$ -tubulin III<sup>+</sup> – клеток (рисунок). При этом относительное количество глиальных элементов, с учетом количества GFAP<sup>+</sup>-клеток, напротив, существенным образом возрастало. Очевидно, в данном случае мы имеем дело с перераспределением клеточных популяций ФНК за счет большей криоустойчивости глиальных элементов.

Режим Р3 обеспечивал преимущественную сохранность субпопуляций, относящихся к элементам с мультипотентным дифференцировочным потенциалом. Так, количество CD133<sup>+</sup>-клеток увеличивалось в 3 раза с одновременным повышением в 2,4 раза содержания nestin<sup>+</sup>-клеток по сравнению с нФНК. Клетки стволового компартмента имели более высокую степень экспрессии маркеров CD133 и nestin (увеличение СИФ в 2,5 и 1,4 раза соответственно по сравнению с нФНК).

Такого рода изменения обусловлены особенностями компонентного состава липидов мембран прогениторных клеток, которые проявляют при использовании определенных режимов криоконсервирования большую криоустойчивость по сравнению с другими клетками. Использование Р3 приводило к гибели значительного числа клеток, дифференцированных в нейрональном направлении, судя по снижению содержания клеток, экспрессирующих маркер  $\beta$ -tubulin III.

Существенно, что после использования всех режимов криоконсервирования ФНК, СИФ практически всех исследуемых маркеров была более низкая, чем в нативе (за исключением CD133 и nestin при Р3).

Данный факт, по-видимому, можно объяснить модификацией цитоскелета, а также различных белков и липидного матрикса клеточной мембраны под действием факторов криоконсервирования, а именно, изменением состояния белок-фосфолипидного матрикса. Основой таких изменений может быть, например, осмотический и термальный шок, которым подвергаются клетки в процессе криоконсервирования и которые сопровождаются шеддингом, агрегацией или интернализацией мембранных структур клеток [16]. В итоге это приводит к нарушению интегральной функциональной активности ФНК [2, 3].

Ведется интенсивная работа по совершенствованию методологических и методических подходов к терапии нейродегенеративных заболеваний аутоиммунного генеза, в том числе с применением кФНК. В связи с этим полученные данные могут быть учтены при оптимизации такого рода терапии. Особую значимость имеет установленный эффект возможности использования определенных режи-

низирующих higher cryoresistance if compared with other cells in certain cryopreservation regimens. Use of regimen R3 led to the death of a large amount of cells differentiated into neuronal lineage judging on the reduced content of cells, expressing  $\beta$ -tubulin III.

It is important that after use of all the regimens for FNCs cryopreservation the MFI of virtually all the studied markers was lower than in native cells (excluding CD133 and nestin at R3).

This fact can be apparently explained by modification of cytoskeleton, as well as of various proteins and lipid matrix of cell membrane under the effect of cryopreservation factors, namely the protein-phospholipid matrix modification. The basis of these changes can be for example osmotic and thermal shocks, to those the cells are subjected during freeze-thawing and which are accompanied with shedding, aggregation or internalization of cell membrane structures [16]. Finally this leads to the impairment of integral functional activity of FNCs [2, 3].

Intensive investigations on improving the methods and approaches to therapy of neurodegenerative diseases of autoimmune nature including those with application of cFNCs are in progress. In this connection the findings may be taken into account when optimizing this type of therapy. Of value is the established effect about possible use of certain cryopreservation regimens as the way to enrich FNCs pool with stem cells.

The data obtained as a result of this research corroborate the hypotheses about the mechanisms of action of freeze-thawing on FNCs.

## Conclusions

1. There was revealed different sensitivity of fetal brain subpopulations to the effect of physical and chemical factors of cryopreservation, implemented when using the freeze-thawing regimens with different parameters.

2. Independently on cryopreservation regimen the most resistant are glial and multipotent stem precursors, that is explained by composition of their membranes.

3. When using R3 there has been established the fact of the highest enrichment of FNC population with stem cells due to the death of more differentiated neuron precursors. This confirms the selective effect of cryopreservation on heterogenous composition of cell suspensions.

## References

1. Bozhkova V.P., Brezhnevsky P.D., Buravlev V.P. et al. Manual on culturing of nerve tissue. Methods. Technique. Problems. – Moscow: Nauka, 1988. – 318p.
2. Goltsev A.M., Babenko N.M., Ostankova L.V. et al. Study of functional activity of cryopreserved embryonic neuronal cells

мов криоконсервирования как способа обогащения пула ФНК стволовыми клетками.

Данные, полученные в работе, дополняют представления о механизмах действия процесса замораживания-оттаивания на ФНК.

## Выводы

1. Выявлена различная чувствительность субпопуляций фетального мозга к действию физико-химических факторов криоконсервирования, реализуемых при использовании режимов замораживания-оттаивания с различными параметрами.

2. Независимо от режима криоконсервирования наиболее устойчивыми являются глиальные и мультипотентные стволовые предшественники, что объясняется компонентным составом их мембран.

3. При использовании РЗ установлен факт наибольшего обогащения популяции ФНК стволовыми клетками за счет гибели более дифференцированных предшественников нейронов. Это подтверждает селективное влияние криоконсервирования на гетерогенный состав клеточных суспензий.

## Литература

1. Божкова В.П., Брежневский П.Д., Буравлев В.П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. – М.: Наука, 1988. – 318 с.
2. Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. та ін. Вивчення функціональної активності кріоконсервованих ембріональних нервових клітин щурів в системі *in vitro* та *in vivo* // Трансплантологія. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 46 – 56.
3. Гольцев А.Н., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н., Останков М.В. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 46–50.
4. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Гаевская Ю.А. и др. Криобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – №1, 2. – С. 46–51.
5. Гольцев А.Н., Сафранчук О.В., Бондарович Н.А. и др. Влияние факторов криоконсервирования на уровень экспрессии маркеров стволовых раковых клеток в аденокарциноме Эрлиха // Биол. вестник. – 2009. – Т. 13, №1–2. – С. 13–16.
6. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
7. Останков М.В., Лебединец Д. В., Порожан Е.А., Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на цитоморфологические и структурные характеристики фетальных нервных клеток // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №4. – С. 431– 438.
8. Патент № 4523, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / В.І. Грищенко, А.М. Гольцев, Т.М. Гурина, Н.М. Бабенко; заявник: ІПКіК НАН України; заявл. 24.05.2004; опубл. 17.01.2005. Бюл. №1.
9. Патент № 59206, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб кріоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / А.М. Гольцев, Є.О. Порожан, Н.М. Бабенко; М.В. Останков; of rats *in vitro* and *in vivo* // Transplantologiya. – 2004. – Vol. 6, N2. – P. 46–56.
3. Goltsev A.N., Gurina T.M., Babenko N.N., Ostankov M.V. Effect of different cryopreservation regimens on some characteristics of embryonic neuronal cells// Problems of Cryobiology. – 2003. – N1. – P. 46–50.
4. Goltsev A.N., Dubrava T.G., Gaevskaya Yu.A. et al. Cryobiological technologies as component of optimized methods of treatment of autoimmune diseases// Klinicheskaya Immunologiya. Alergologiya. Infektologiya. – 2009. – N1, 2. – P. 46–51.
5. Goltsev A.N., Safranchuk O.V., Bondarovich N.A. et al. Effect of cryopreservation factors on expression level of markers of stem cancer cells in Ehrlich carcinoma // Biol. Vestnyk. – 2009. – Vol.13, N1, 2. – P. 13–16.
6. Cryopreservation of cell suspensions / Ed. by A.A. Tsutsayeva. – Kiev: Naukova Dumka, 1983. – 240p.
7. Ostankov M.V., Lebedinets D.V., Porozhan E.A., Goltsev A.N. Effect of cryopreservation factors on cytomorphologic and structural characteristics of fetal nerve cells // Problems of Cryobiology. – 2009. – Vol. 19, N4. – P. 431–438.
8. Patent N4523, Ukraine, IPC A01N1/02. Method of cryopreservation of embryonic nerve tissue cell suspension / V.I. Grischenko, A.M. Goltsev, T.M. Gurina, N.M. Babenko, applied by IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine. – appl. 24.05.2004; Publ. 17.01.2005, Bul. N1.
9. Patent N59206, Ukraine, IPC A01N1/02. Method of cryopreservation of fetal neural cell suspension / A.M. Goltsev, E.O. Porozhan, N.M. Babenko, M.V. Ostankov, applied by IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine. – appl. 04.10.2010; Publ. 10.05.2011, Bul. N9.
10. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects / Ed. by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers et al. – Philadelphia: Lippincott–Raven; 1999. – 1380 p.
11. Fang J., Zhang Z.X. Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat // Cryobiology. – 1992. – Vol. 29, N2. – P. 267 – 273.
12. Gage F.H. Mammalian neural stem cells // Science. – 2000. – Vol. 287, N5457. – P. 1433 – 1438.
13. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G., Gurina T.M. Cryopreservation as selective method of enrichment with stem elements of embryonic neuronal cell population // Abstract Book of the Word Congress of Cryobiology and Cryomedicine. – Hamburg, Germany, 2006. – P.137.
14. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // Biopreservation and Biobanking. – 2009. – Vol. 7, N1. – P. 29–38.
15. Hess D.C., Borlongan C.V. Stem cells and neurological diseases // Cell Prolif. – 2008. – Vol. 41, N 1. – P. 94–114.
16. Higgins A.Z., Cullen D.K., LaPlaca M.C., Karlsson J.O. Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // J. Neurosci. Methods. – 2011. – Vol. 30, N1. – P. 9–16.
17. Ladewig J., Koch P., Endl E. et al. Lineage selection of functional and cryopreservable human embryonic stem cell-derived neurons // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26. – P. 1705–1712.
18. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects // J. Transl. Med. – 2010. – Vol. 10, N8. – P. 131–146.
19. Messam C.A., Hou J., Major E.O. Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody // Exp. Neurol. – 2000. – Vol. 161. – P. 585–596.
20. Milosevic J., Storch A., Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23, N5. – P. 681–688.
21. Norton W.T., Poduslo S.E. Neuronal perikarya and astroglia of rat brain: chemical composition during myelination // Journal of Lipid Research. – 1971. – Vol. 12. – P. 84–90.
22. Petros T.J., Tyson J.A., Anderson S.A. Pluripotent stem cells for the study of CNS development // Front. Mol. Neurosci. – 2011. – Vol. 4. – P. 30–39.

- заявник: ІПКіК НАН України; заявл. 4.10.2010; опубл.10.05.2011. Бюл.№9.
10. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* / Ed. by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers *et al.* – Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. – 1380 p.
  11. *Fang J., Zhang Z.X.* Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29, №2. – P. 267 – 273.
  12. *Gage F.H.* Mammalian neural stem cells // *Science.* – 2000. – Vol. 287, №5457. – P. 1433 – 1438.
  13. *Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G., Gurina T.M.* Cryopreservation as selective method of enrichment with stem elements of embryonic neuronal cell population // *Cryobiology.* – 2006. – Vol. 53, N3. – P. 409.
  14. *Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al.* Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products // *Biopreservation and Biobanking.* – 2009. – Vol. 7, №1. – P. 29–38.
  15. *Hess D.C., Borlongan C.V.* Stem cells and neurological diseases // *Cell Prolif.* – 2008. – Vol. 41, № 1. – P. 94–114.
  16. *Higgins A.Z., Cullen D.K., LaPlaca M.C., Karlsson J.O.* Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // *J. Neurosci Methods.* – 2011. – Vol. 30, №1. – P. 9–16.
  17. *Ladewig J., Koch P., Endl E. et al.* Lineage selection of functional and cryopreservable human embryonic stem cell–derived neurons // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26, N7. – P. 1705–1712.
  18. *Liras A.* Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects // *J. Transl. Med.* – 2010. – Vol. 10, №8. – P. 131–146.
  19. *Messam C.A., Hou J., Major E.O.* Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody // *Exp. Neurol.* – 2000. – Vol. 161. – P. 585–596.
  20. *Milosevic J., Storch A., Schwarz J.* Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23, №5. – P. 681–688.
  21. *Norton W.T., Poduslo S.E.* Neuronal perikarya and astroglia of rat brain: chemical composition during myelination // *J. Lipid Res.* – 1971. – Vol. 12, N1. – P. 84–90.
  22. *Petros T.J., Tyson J.A., Anderson S.A.* Pluripotent stem cells for the study of CNS development // *Front. Mol. Neurosci.* – 2011. – Vol. 4. – P.30–39.
  23. *Robilotto A.T., Baust J.M., Van Buskirk R., Baust J.G.* Involvement of the cysteine protease calpain family in cell death after cryopreservation // *Cell Preservation Technology.* – 2006. – Vol. 4, №1. – P. 17–30.
  24. *Tan F. C., Lee K. , Gouk S. S. et al.* Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols // *Cryo Letters.* – 2007. – Vol. 28, №6. – P. 445–460.
  25. *Wagh V., Meganathan K., Jagtap S. et al.* Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing // *Stem Cell Reviews and Reports.* – 2011. – Vol. 7, №3. – P. 506 – 517.

Accepted 28.02.2012

Поступила 28.02.2012