

Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования

UDC 591.88.084:57.043

A.N. SUKACH^{1,2*}, T.D. LYASHENKO²

Role of Forming Aggregates in Post-Thaw Survival of Isolated Neural Cells from Newborn Rats

Изучали роль формирования агрегатов нервными клетками (НК) новорожденных крыс в процессе восстановления после выделения и криоконсервирования этих клеток. Установлено, что краткосрочное культивирование НК в составе агрегатов устраняет повреждения, образовавшиеся в процессе их выделения, и возможно, позволяет клеткам избежать апоптоза. Показано, что замораживание НК в составе агрегатов под защитой 10% ДМСО эффективно сохраняет стволовые/прогениторные и дифференцированные НК. Сохранение целостности агрегатов НК после криоконсервирования является необходимым условием их выживания в культуре.

Ключевые слова: нервные клетки новорожденных крыс, многоклеточные агрегаты, выживаемость, жизнеспособность, криоконсервирование, культивирование.

Вивчали роль формування агрегатів нервовими клітинами (НК) новонароджених щурів в процесі відновлення після виділення і криоконсервування цих клітин. Встановлено, що короткострокове культивування НК у складі агрегатів відновлює uszkodження, що утворилися в процесі їх виділення та, можливо, дозволяє клітинам уникнути апоптозу. Показано, що заморожування НК у складі агрегатів під захистом 10% ДМСО ефективно зберігає стволові/прогеніторні і диференційовані НК. Збереження цілісності агрегатів НК після криоконсервування є необхідною умовою їх виживання в культурі.

Ключові слова: нервові клітини новонароджених щурів, багатоклітинні агрегати, виживання, життєздатність, криоконсервування, культивування.

The role of formation of newborn rat neural cell aggregates on cell recovery after isolation and cryopreservation was studied. Short-term cultivation of neural cells within aggregates eliminate the damages that appear during cell isolation and possibly protects from apoptosis. It was shown that freezing of neural cells within aggregates under protection of 10% DMSO is effective for storage of stem/progenitor and differentiated neural cells. Maintenance of integrity of neural cell aggregates after cryopreservation is a necessary condition for survival in culture.

Key words: neural cells of newborn rats, multicellular aggregates, survival, viability, cryopreservation, cultivation.

Криоконсервирование изолированных клеток включает несколько этапов: выделение клеток в максимально жизнеспособном состоянии; инкубирование в защитных растворах; замораживание по определенной программе; оттаивание; удаление криопротектора при необходимости. Если выделение сопряжено с дезагрегацией тканей, то у клеток появляются микроповреждения, что может значительно снизить их выживаемость после криоконсервирования.

В процессе криоконсервирования, а также отмывки криопротектора в клетках могут происходить структурно-метаболические нарушения в плазматической мембране и мембранах внутриклеточных компонентов, что сопровождается потерей поверхностных рецепторов, а также наруше-

Cryopreservation of isolated cells comprises several stages: isolation of cells preserving highest viability; equilibration in protective solutions; freezing according to a certain program; thawing; removal of cryoprotective agent (CPA) if necessary. If the isolation is associated with tissue disaggregating, the cells are subjected to a microdamages, which may significantly reduce their post-thaw survival.

Cryopreservation and CPA removal could be accompanied with occurrence in cells of structure and metabolism disorders in plasma membrane and intracellular components, that may be accompanied with the loss of surface receptors as well as impaired homeostasis of cells. Therefore a very important stage of cryopreservation is the creation of the conditions activating reparation of frozen-thawed cells. More

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: an_sukach@yahoo.com

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: an_sukach@yahoo.com

нием гомеостаза клеток. Поэтому очень важным этапом криоконсервирования является создание условий, активирующих репарацию деконсервированных клеток. Чаще всего для этого используют восстановительные среды, которые содержат метаболически активные соединения, стимулирующие биоэнергетический цикл клеток и процессы биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. Эти среды могут содержать стабилизаторы мембран и соединения, подавляющие процессы перекисного окисления липидов [1]. Однако использование таких сред не всегда эффективно для всех видов клеток.

Следует отметить, что чувствительность клеток к действию криопротекторов и низких температур зависит от их вида и степени дифференциации. Поэтому при криоконсервировании различных типов клеток в каждом отдельном случае необходим экспериментальный подбор условий их подготовки к замораживанию, замораживания и восстановления после оттаивания. Подбор таких условий усложняется, если замораживаемые суспензии клеток гетерогенны. Поиск оптимальных условий подготовки к замораживанию, замораживания и восстановления после оттаивания гетерогенных суспензий важен для создания эффективных протоколов криоконсервирования клеток, полученных из различных тканей.

Для эффективного восстановления клеток после выделения их из ткани и криоконсервирования необходимы восстановление межклеточных связей и контакт с внеклеточным матриксом, которые обеспечивают сигналы выживания и предотвращают апоптоз [8, 9]. Как правило, клетки, находящиеся в суспензии, не могут достаточно быстро восстановить клеточное микроокружение, следствием чего являются инициация апоптоза и гибель. Условия, в которых клетки, как и в тканях, контактируют друг с другом и в которых формируется внеклеточный матрикс, можно воссоздать в небольших многоклеточных 3D-структурах. В этих структурах для клеток создаются оптимальные условия для выживания, пролиферации и дифференциации. Такими структурами также являются агрегаты, которые формируют клетки, полученные как из нормальных [6–10, 15], так и опухолевых тканей [16]. Как показали наши исследования, свойством формировать агрегаты обладают и клетки, полученные из фетальных [3, 4] и постнатальных [2] нервных тканей.

Цель нашего исследования – изучение роли образования многоклеточных агрегатов в условиях культивирования *in vitro* в восстановлении поврежденных нервных клеток (НК) новорожденных крыс, возникающих при их выделении и криоконсервировании.

often for this aim there are used the recovering media containing metabolically active compounds, stimulating bioenergetic cycle of cells, the processes of biosynthesis of proteins and nucleic acids. These media can contain the stabilizers of membranes and compounds suppressing the lipid peroxidation [1]. However, the application of these media is not always effective for all the cell types.

It should be noted that the cell sensitivity to the effect of CPAs and low temperatures depends on their type and differentiation rate. Therefore during cryopreservation of different cell types in each individual case the experimental selection of the conditions of their preparing to freezing, freezing itself and recovery after thawing is necessary. The selection of these conditions is getting complicated if the cell suspensions to be frozen are heterogenous. The search for optimal conditions of preparing to freezing, freezing and recovery after thawing of heterogenous suspension is important to create the effective protocols for cryopreservation of cells, derived from different tissues.

For effective recovery of cells after their isolation from a tissue and cryopreservation the restoration of cell-cell relationships and contact with extracellular matrix, providing the surviving signals and preventing apoptosis are needed [8, 9]. As a rule the cells being in suspension can not quite rapidly restore a cell microenvironment, that may result in apoptosis initiation and death. The conditions in which the cells contact each other like in tissues and when an extracellular matrix forms can be reproduced in small multi-cellular 3D structures. In these structures the optimal conditions for the cells' survival, proliferation and differentiation are created. These structures are the aggregates forming the cells obtained both from normal [6–10, 15] and tumor tissues [16] as well. As our studies demonstrated the feature to form the aggregates is inherent to the cells derived from fetal [3, 4] and post-natal [2] neural tissues.

The research aim was to study the role of forming the multicellular aggregates under *in vitro* culturing in restoration of the damages in newborn rat neural cells (NCs), appearing during their isolation and cryopreservation.

Materials and methods

The research objects were NCs isolated from brain of newborn rats using enzyme-mechanical method. To do this the brain tissue was incubated for 10 min in 0.25% trypsin solution at 37°C, and then disintegrated to single cells. The resulted suspension was filtered through nylon filter and later was washed free of trypsin using centrifugation at 1500 rpm. Cell viability was estimated by staining with 0.4% Trypan blue solution (Sigma, USA) and was expressed in percents [18]. The number of cells was counted in Goryaev's chamber.

Материалы и методы

Объектом исследования были изолированные НК, которые выделяли из тканей мозга новорожденных крыс ферментативно-механическим методом. Для этого ткань мозга инкубировали 10 мин в 0,25%-м растворе трипсина при 37°C, затем дезагрегировали на единичные клетки. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр, затем отмывали от трипсина центрифугированием при 1500 об/мин. Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию 0,4%-м раствором трипанового синего ("Sigma", США) и выражали в процентах [18]. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Нервные клетки культивировали в 24-луночных планшетах ("Corning", США) в среде DMEM/F12 ("Sigma"), обогащенной 0,6% глюкозы и 2 мМ глутамина, 3 мМ бикарбоната натрия. Свежевыделенные клетки высевали в концентрациях 1, 2, 4 и 8 млн/мл. Культивировали НК в присутствии 10% сыворотки крови крыс. В среду добавляли 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культивирование проводили в CO₂ инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Среду культивирования меняли через 3–4 суток.

Иммуноцитохимические исследования клеток проводили после их предварительной фиксации в растворе 4%-го параформальдегида. В НК иммуноцитохимически определяли присутствие специфических маркерных белков: нейронов – β -tubulin III; нервных стволовых клеток – nestin; нервных прогениторных клеток – vimentin. В качестве первичных антител использовали mouse monoclonal to β -tubulin III ("Sigma"), mouse monoclonal to nestin ("Abcam", Великобритания) и rabbit polyclonal to vimentin ("Abcam"). В качестве вторичных антител использовали chromeo 546 goat anti-mouse ("Abcam"), chromeo 488 goat anti-rabbit ("Abcam"). Ядра клеток окрашивали hoechst 33342 ("Sigma").

Микрофотосъемку культур клеток проводили на микроскопе "Observer Z1" ("Carl Zeiss", Германия).

Результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента с использованием программы "MS Excel".

Эксперименты были проведены в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными III конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положением "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" (Страсбург, 1986).

Результаты и обсуждение

Исходную суспензию клеток, полученную из нервной ткани новорожденных крыс, жизнеспособность которых составляла $56,2 \pm 4,2\%$ (рис. 1),

Neural cells were cultured in 24-well plates (Corning, USA) in DMEM/F12 (Sigma, USA) supplemented with 0.6% glucose, 2 mM glutamine and 3 mM sodium bicarbonate. Freshly isolated cells were seeded under the concentrations of 1; 2; 4; 6 and 8 mln/ml. NCs were cultured in presence of 10% rat blood serum. The medium was supplemented with 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Culturing was performed in CO₂ incubator at 37°C in 5% CO₂ and 95% air atmosphere. Culturing medium was changed each 3–4 days.

Immune cytochemical studies of cells were carried-out after their preliminary fixation in 4% paraformaldehyde solution. In the NCs there was immunocytochemically examined the presence of specific marker proteins: beta-tubulin III for neurons; nestin for neural stem cells; vimentin for neural progenitor cells. Mouse monoclonal to beta tubulin III (Sigma), mouse monoclonal to nestin (Abcam, UK) and rabbit polyclonal to vimentin (Abcam) primary anti-bodies were used. As secondary antibodies there were used chromeo 546 goat anti-mouse (Abcam), chromeo 488 goat anti-rabbit (Abcam). Cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma).

Micro photo-imaging of cell cultures was performed with microscope Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany).

The results were statistically processed according to the Student's method using MS Excel software.

The experiments were performed in the accordance with General Principles of the Experiments in Animals approved by the 3rd Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and coordinated with the statement of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Results and discussion

Initial cell suspension, derived from neural tissue of newborn rats, with viability of $56.2 \pm 4.2\%$ (Fig. 1) was cultured in the medium containing 10% rat blood serum. In some hours of culturing the cells formed floating multicellular aggregates (Fig. 2A). As well as during culturing of human fetal NCs [3, 5] the number of formed aggregates depended on the concentration, the structure did from viability and the dimensions was determined by concentrations and viability of the seeded cells. Optimal concentrations of newborn rat NCs, which provided the formation of homogenous aggregates of 100 μ m in average, were 2 and 4 mln of cells/ml. When culturing the NCs under concentration of 1 mln/ml the aggregates of small diameter and in small amount were formed. NCs' culturing under concentrations of 6 and 8 mln of cells/ml was accompanied with the formation of aggregates of large dimensions, and following fusion of the aggregates. Herewith the suspension density of the formed aggre-

культивировали в среде, содержащей 10% сыворотки крови крыс. Через несколько часов культивирования клетки формировали плавающие многоклеточные агрегаты (рис. 2, А). Как и при культивировании фетальных НК человека [3, 5] количество образованных агрегатов зависело от концентрации, структура – от жизнеспособности, а размер – от концентрации и жизнеспособности посеянных клеток. Оптимальные концентрации НК новорожденных крыс, при которых образуются однородные агрегаты размером в среднем 100 мкм, – 2 и 4 млн клеток/мл. При культивировании НК в концентрации 1 млн/мл формировались агрегаты небольшого размера и в меньшем количестве. Культивирование НК в концентрациях 6 и 8 млн/мл сопровождалось образованием агрегатов большого размера, которые сливались друг с другом. При этом плотность суспензии образованных агрегатов была очень высокой, что затрудняло наблюдение за ними. В дальнейших экспериментах мы использовали посевную концентрацию НК, равную 4 млн/мл. В течение 1–2 суток культивирования в неприкрепленном состоянии упаковка клеток в агрегатах становилась более плотной, и агрегаты превращались в сфероиды (рис. 2, В).

Через сутки культивирования образовавшиеся агрегаты собирали. Концентрация клеток в этих суспензиях агрегатов составляла $2,0 \pm 0,25$ млн/мл, а их жизнеспособность – $87 \pm 5,4\%$ (см. рис. 1). Часть собранных агрегатов (200–250 тыс. клеток) пересеивали, оставшиеся агрегаты криоконсервировали под защитой 10%-го раствора ДМСО. Для этого перед замораживанием к агрегатам в среде DMEM/F12 (“Sigma”) с 10% сыворотки крыс по каплям добавляли равный объем 20%-го раствора ДМСО, затем их инкубировали при 4°C 15 мин и охлаждали со скоростью 1 град/мин до -80°C в криоконтейнерах (“Corning”). Через сутки замороженные агрегаты НК помещали в жидкий азот.

Через несколько часов после посева агрегаты свежесывороточных НК начинали прикрепляться, их клетки мигрировали и распластывались, формируя участки монослоя. При этом наблюдалось образование длинных отростков, по которым клетки мигрировали (рис. 3, А). Возможно, эти отростки образуются клетками радиальной глии [11]. После прикрепления агрегатов происходила дифференциация как в направлении клеток с морфологией глии, так и β -тубулин III – положительных клеток с морфологией нейронов (рис. 3, В).

На 4–6-е сутки культивирования на 80% поверхности лунки формировался монослой клеток с морфологией глии, на 8–9-е сутки на поверхности глиального монослоя появлялись β -тубулин III – положительные клетки, морфологически похожие на нейробласты (рис. 4). При этом β -тубулин III –

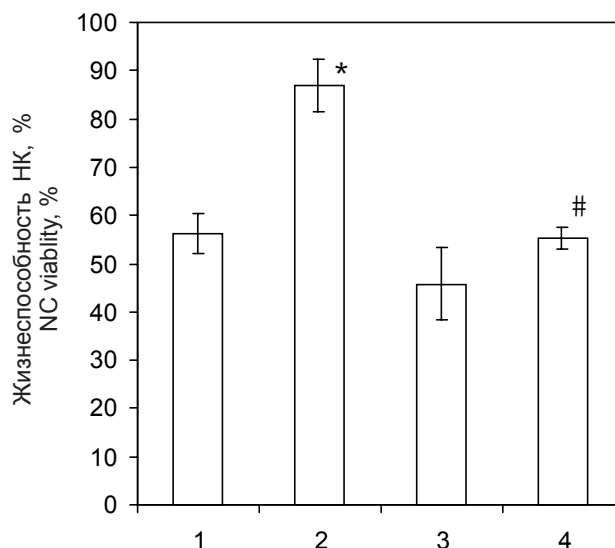


Рис. 1. Влияние криоконсервирования и способа отмыывания ДМСО на жизнеспособность НК в составе агрегатов: 1 – свежесывороточных НК; 2 – НК агрегатов через 1 сутки культивирования; 3 – НК деконсервированных агрегатов после отмыывания ДМСО центрифугированием; 4 – НК деконсервированных агрегатов после удаления ДМСО путем разведения и последующего посева; * – отличия статистически достоверны по сравнению со свежесывороточными НК, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с НК деконсервированных агрегатов, отмытыми от ДМСО центрифугированием, $p < 0,05$.

Fig. 1. Effect of cryopreservation and removing of DMSO on viability of NCs as the components of aggregates: 1 – freshly isolated NCs; 2 – NCs of aggregates in 24 hrs of culturing; 3 – NCs of frozen-thawed aggregates after DMSO removal with centrifugation; 4 – NCs of frozen-thawed aggregates after DMSO removal by dilution and following re-plating; * – differences are statistically significant if compared with freshly isolated NCs, $p < 0,05$; # – differences are statistically significant if compared with NCs of frozen-thawed aggregates, washed free of DMSO with centrifugation, $p < 0,05$.

gates was very high, which made the observation difficult. In further experiments we used plating concentration of NCs of 4 mln/ml. During 1–2 days of culturing in a non-attached state the cell packing in aggregates became denser and the aggregates transformed into spheroids (Fig. 2B).

In 24 hrs of culturing the formed aggregates were collected. Cell concentration in these suspensions of aggregates made 2.0 ± 0.25 mln/ml and their viability was $87 \pm 5.4\%$ (see Fig. 1). The part of collected aggregates (200–250 thousand of cells) were re-plated, the rest was cryopreserved under 10% DMSO protection. For this aim prior to freezing the equal volume of 20% DMSO was added dropwise to aggregates in DMEM/F12 (Sigma) supplemented with 10% rat serum, then they were incubated at 4°C for 15 min and cooled with the rate of 1 grad/min down to -80°C

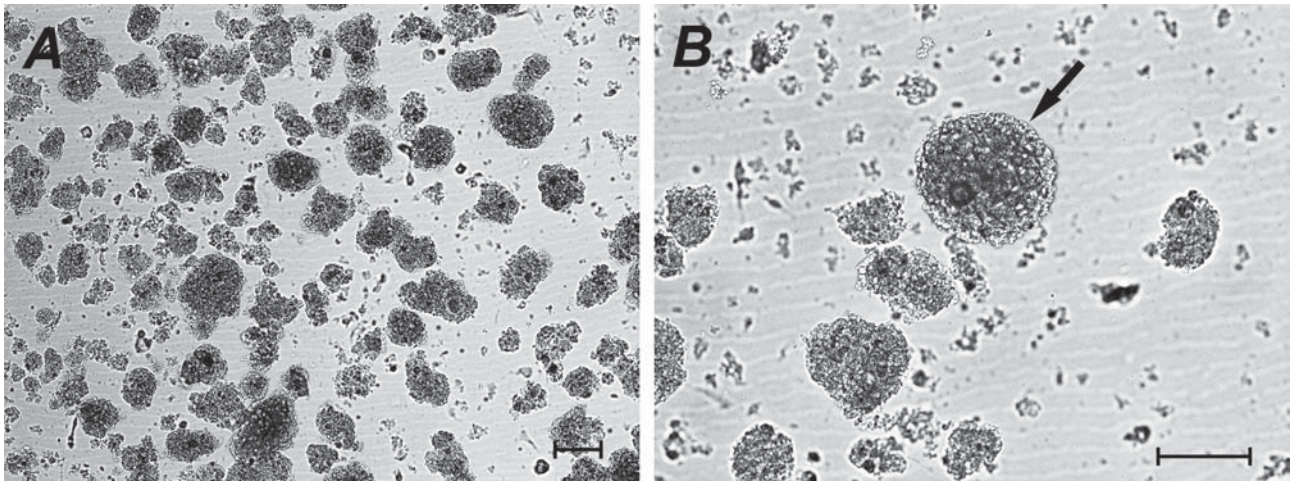


Рис. 2. Формирование свежеизолированными НК новорожденных крыс плавающих многоклеточных агрегатов (А), в которых упаковка клеток (В), в процессе культивирования становилась более плотной (стрелка). Масштаб 100 мкм.
Fig. 2. Formation of floating multicellular aggregates (A), wherein the cell packing (B) during culturing was getting denser (arrow). Scale 100 μ m.

положительных клеток с морфологией нейронов, образовавшихся после прикрепления агрегатов, мы не наблюдали. Возможно, эти клетки погибали вследствие отсутствия соответствующего микроокружения в процессе культивирования. При дальнейшем культивировании количество нейроblastоподобных β -тубулин III – положительных клеток увеличивалось. На 15-е сутки культивирования образовывались колонии недифференцированных β -тубулин III – положительных клеток (см. рис. 3). Иммуноцитохимическое окрашивание также показало, что большинство этих клеток были нестин- и виментин-положительными (рис. 5), т. е. являлись стволовыми и прогениторными клетками, которые в процессе дальнейшего культивирования пролиферировали, что проявлялось в увеличении размера

in the containers (Corning, USA). In 24 hrs the frozen aggregates of NCs were plunged into liquid nitrogen.

In some hours after re-plating the aggregates of freshly isolated NCs started to attach, their cells migrated and spreaded forming the monolayer sites. Herewith there was observed the formation of long processes along with the cells migrated (Fig. 3 A). These processes are likely formed by the cells of radial glia [11]. After the aggregates attached the cells started to differentiate both in the direction of cells with glial morphology and β -tubulin III positive cells with neuron morphology (Fig. 3B).

To the 4–6th culturing days 80% of a well surface were coated by the cell monolayer with glial morphology, to the 8–9th days on the surface of glial monolayer appeared β -tubulin III positive cells, morphologically

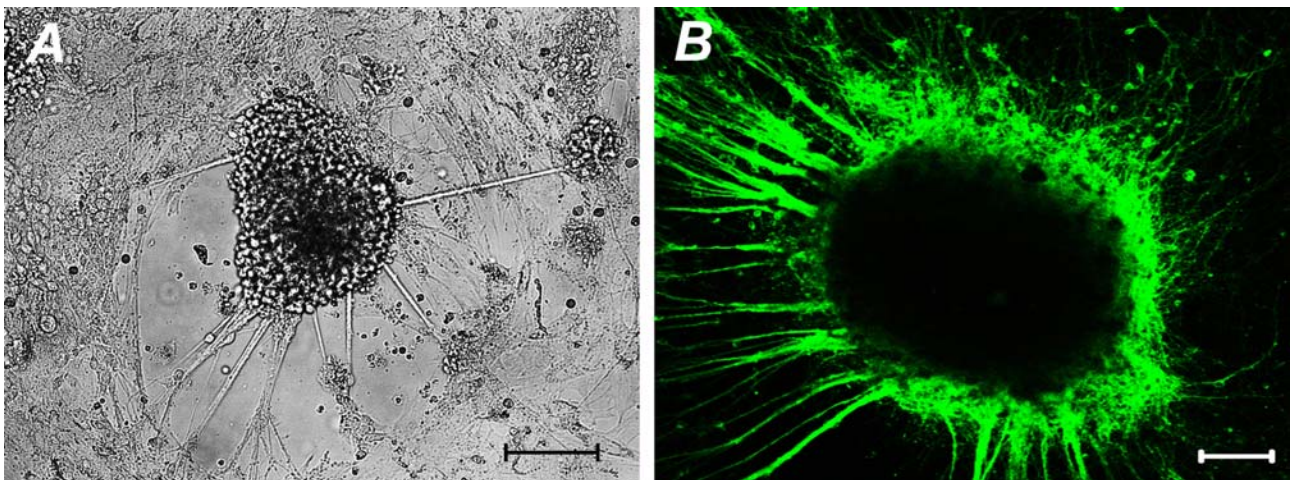


Рис. 3. Миграция, дифференциация и пролиферация клеток прикрепленных агрегатов: А – фазовый контраст. В – флуоресценция β -тубулин III. Масштаб 100 мкм.
Fig. 3. Migration, differentiation and proliferation of cells of the attached aggregates: A – phase contrast; B – fluorescence of β -tubulin III. Scale 100 μ m.

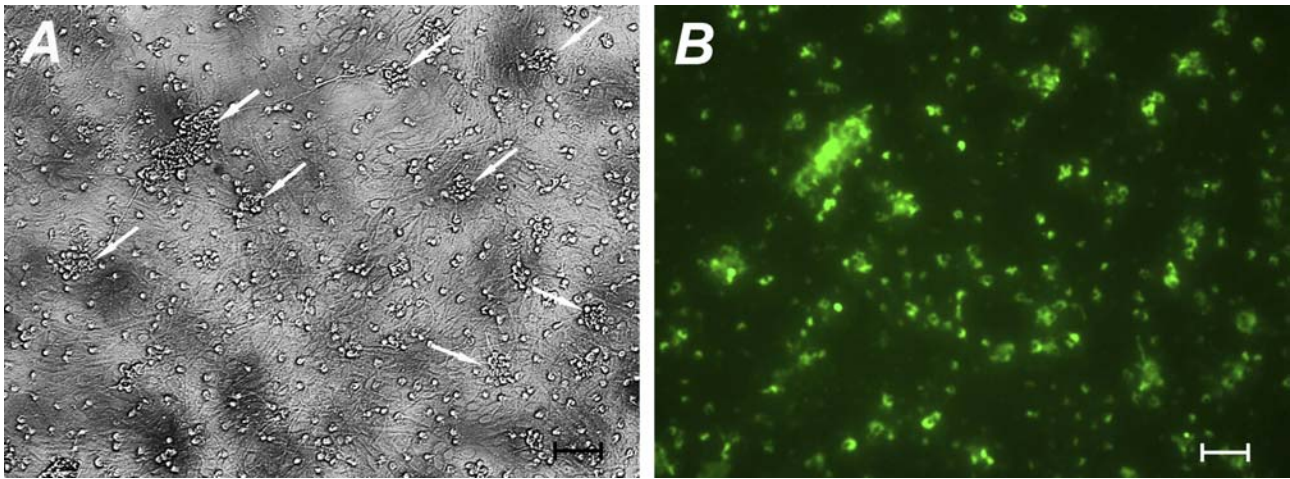


Рис. 4. Образование на монослое глии β -тубулин III-положительных нейробластоподобных клеток и их колоний (стрелки): А – фазовый контраст; В – флуоресценция β -тубулин III. Масштаб 100 мкм.

Fig. 4. Formation of β -tubulin III positive neuroblast cells and their colonies on glia monolayer (arrows): А – phase contrast; В – fluorescence of β -tubulin III. Scale 100 μm .

колоний и количества единичных недифференцированных клеток.

Через 5–7 суток низкотемпературного хранения криоконсервированные агрегаты НК отогревали на водяной бане при 40°C. ДМСО, обладающий токсическим действием на клетки [17, 19], удаляли двумя способами: центрифугированием на протяжении 90 с при 100g с последующим суспендированием осадка в среде культивирования, разведением той же средой до концентрации ДМСО, равной 0,15%, и пересевом агрегатов в среду культивирования с сывороткой. При этом центрифугирование и суспендирование разрушали значительную часть деконсервированных агрегатов до единичных клеток, жизнеспособность которых составляла $45,8 \pm 7,4\%$ (см. рис. 1). В процессе культивирования *in vitro* эти клетки агрегатов не формировали, хотя при этом некоторые из них прикреплялись к подложке, однако не распластывались и в последующем погибали.

Для “удаления” ДМСО путем разведения в лунку 24-луночного планшета высевали 200 мкл суспензии деконсервированных агрегатов (200–250 тыс. клеток), добавляли к ним 300 мкл среды культивирования с сывороткой и культивировали 20 мин в инкубаторе. За это время агрегаты НК концентрировались в центре лунки, после чего их в объеме 20 мкл пересевали и культивировали в 500 мкл среды с сывороткой. Такой способ удаления ДМСО приводил к потере части агрегатов НК, однако при этом сохранялись их целостность и структура (рис. 6, А). Жизнеспособность клеток агрегатов составляла $53,5 \pm 2,3\%$ (см. рис. 1). На 2-е сутки культивирования агрегаты начинали

similar to neuroblasts (Fig. 4). Herewith no β -tubulin III positive cells with neuron morphology formed after attaching of aggregates were observed. These cells likely died due to the absence of corresponding micro-environment during culturing. During following culturing the number of neuroblast-similar β -tubulin III positive cells increased. To the 15th culturing day there were formed the colonies of non-differentiated β -tubulin III positive cells (see Fig. 3). Immune cytochemical staining also demonstrated that the majority of these cells was nestin- and vimentin-positive (Fig. 5.), *i. e.* they were stem and progenitor ones, proliferating during following culturing, that was manifested in the enhancing of the colonies’ size and number of single non-differentiated cells.

In 5–7 days of low temperature storage the cryo-preserved aggregates of NCs were thawed in water bath at 40°C. DMSO having a toxic effect on cells [17, 19] was removed by two ways: a) centrifugation for 90 sec at 100 g with following suspending of the pellet in culturing medium, and b) dilution with the same medium up to the concentration of DMSO, equal to 15% and re-plating of aggregates into culturing medium with serum. Herewith centrifugation and suspending destroyed a significant part of frozen-thawed aggregates into single cells, viability of those made $45.8 \pm 7.4\%$ (see Fig. 1). During culturing *in vitro* these cells did not form aggregates, though some of them attached to embedding, but did not spread and died.

To ‘remove’ DMSO by dilution into a well of 24-well plate we placed 200 μl of the suspension of frozen-thawed aggregates (200–250 thousands of cells), added 300 μl of culturing medium supplemented with serum and later cultured for 20 min in an incubator.

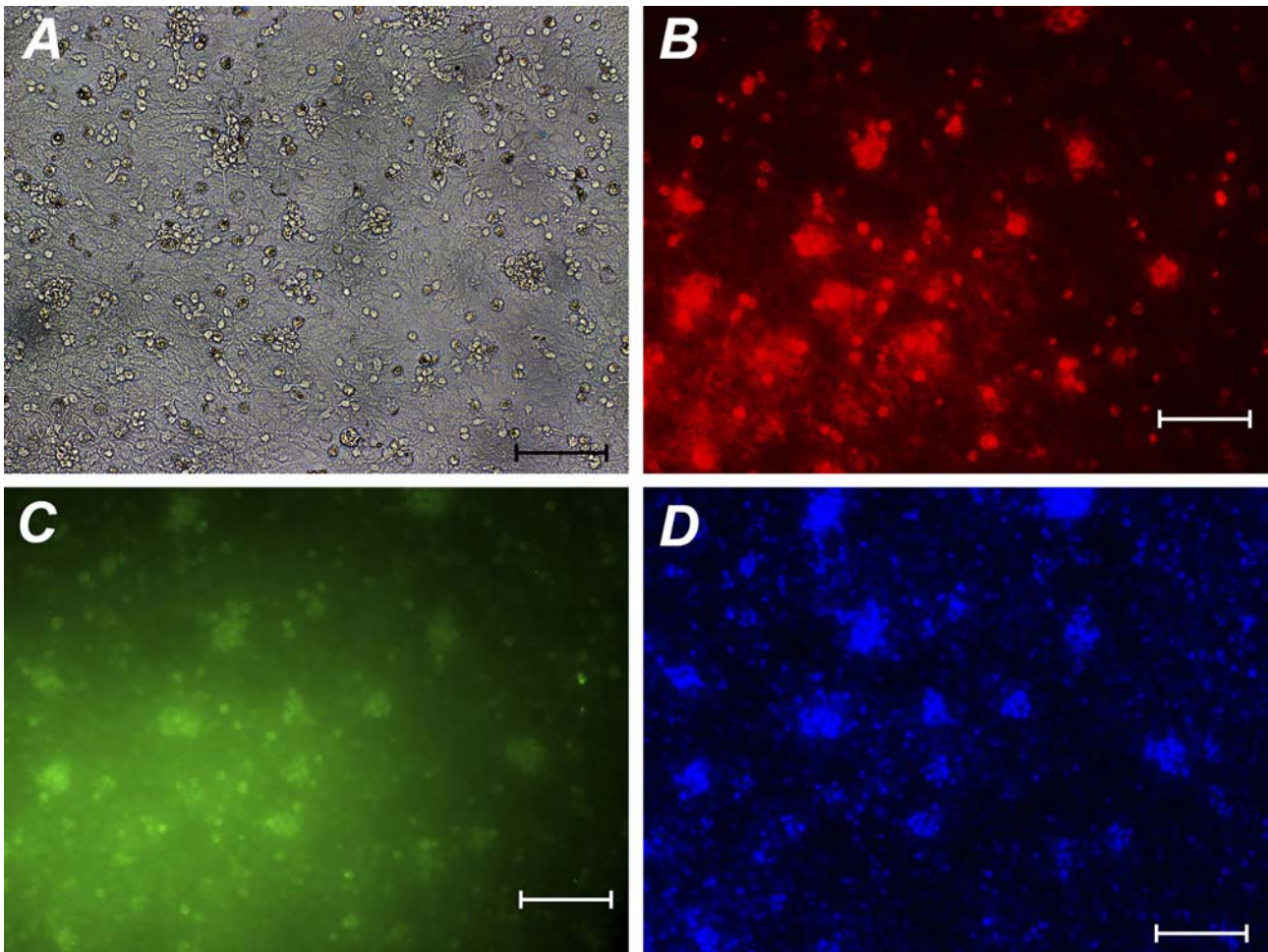


Рис. 5. Иммуноцитохимическое окрашивание культуры свежевыделенных НК новорожденных крыс после 15 суток культивирования (A) на присутствие маркерных белков нервных стволовых клеток – нестин (B) и прогениторных – виментин (C). Ядра клеток были окрашены красителем Hoechst (D). Масштаб 100 мкм.

Fig. 5. Immune cytochemical staining of the culture of freshly isolated NCs derived from newborn rats after 15 culturing days (A) for the presence of marker proteins of nervous stem cells, nestin (B), and progenitor ones, vimentin (C). Cell nuclei were Hoechst-stained (D). Scale 100 μ m.

прикрепляться к подложке. Через 4 суток их прикрепилось около 60%. В процессе культивирования клетки агрегатов активно мигрировали, распластывались и дифференцировались (рис. 6, B). На 6-е сутки культивирования монослой клеток занимал 40%, на 9–10-е сутки – 80% поверхности лунок. При этом первичный монослой клеток состоял преимущественно из клеток глии (рис. 6, C). На 15–16-е сутки культивирования на монослой глии появлялись клетки, морфологически похожие на нейробласты (рис. 6, D). На 19–21-е сутки культивирования, как и в случае свежевыделенных клеток, появлялись колонии стволовых/прогениторных клеток, дальнейшее культивирование которых также приводило к их росту.

Таким образом, проведенные исследования показали, что свежевыделенные гетерогенные НК новорожденных крыс через несколько часов культивирования в присутствии 10% сыворотки крови

During this time the NC aggregates concentrated in a center of the well, afterwards they were re-plated in a volume of 20 μ l and cultured in 500 μ l of the medium supplemented with serum. This method of DMSO removal resulted in the loss of the part of NCs aggregates, however their integrity and structure were preserved (Fig. 6A). Viability of cell in aggregates made $53.5 \pm 2.3\%$ (see Fig. 1). To the 2nd day of culturing the aggregates started to attach to the surface. In 4 days 60% of aggregates attached. During culturing the cells of aggregates migrated, flattened and differentiated (Fig. 6B). To the 6th day of culturing the cell monolayer covered 40%, and to the 9–10th days it did 80% of well surface. Herewith the primary monolayer consisted predominantly of glial cells (Fig. 6C). To the 15–16th days of culturing the cells morphologically similar to neuroblasts appeared on glial monolayer (Fig. 6D). To the 19–21st culturing days we revealed the colonies of stem/progenitor cells like in the case

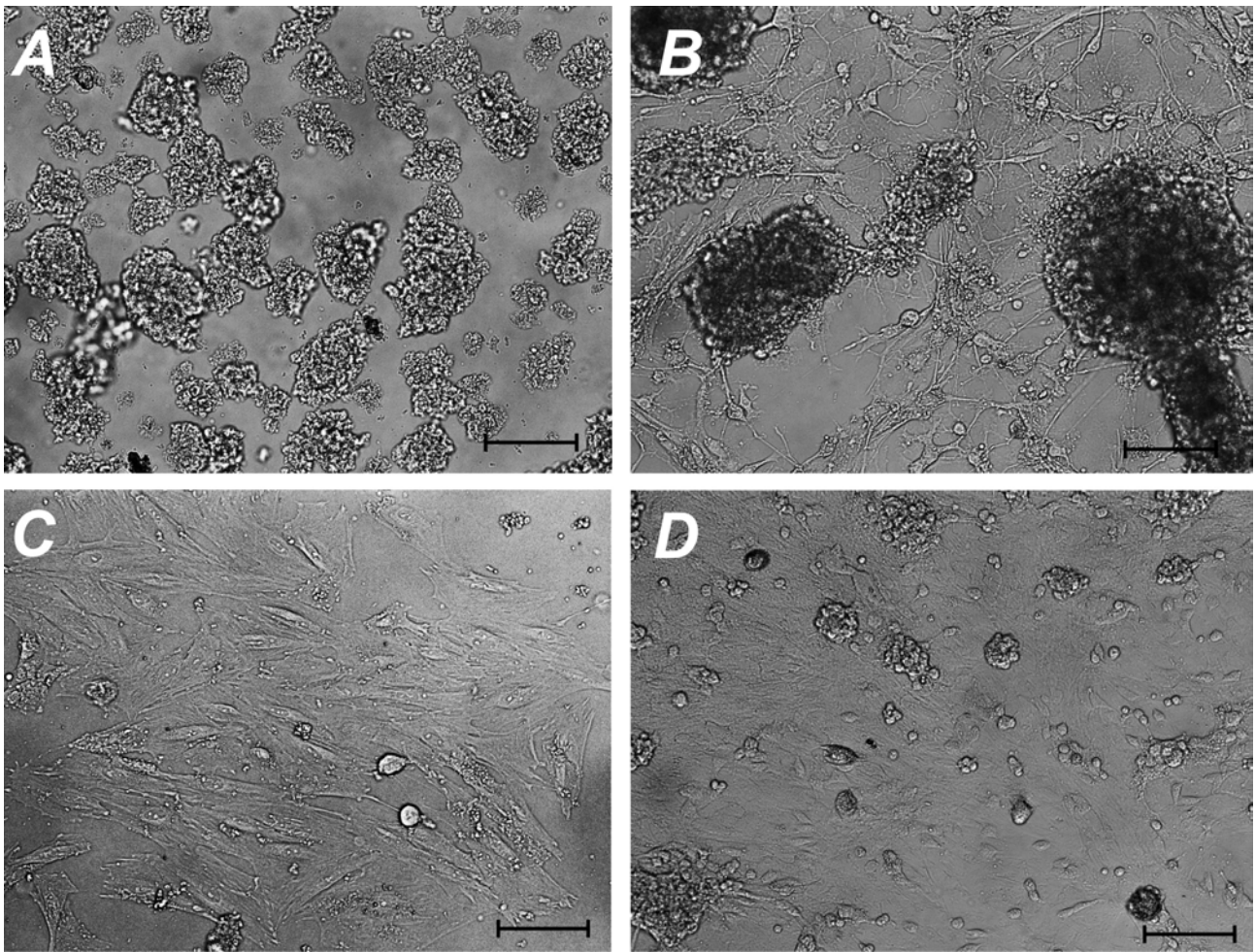


Рис. 6. Деконсервированные агрегаты НК новорожденных крыс после удаления ДМСО разведением (А) в процессе культивирования прикрепляются (В), их клетки мигрируют, пролиферируют и формируют монослой (С), на котором образуются нейробласты и колонии стволовых/прогениторных клеток (D). Масштаб: А, В, С – 100 мкм, D – 50 мкм.

Fig. 6. Frozen-thawed aggregates of newborn rats after DMSO dilution and transfer (A) adhere during culturing (B); their cells migrate, proliferate and form the monolayer (C), on which there are formed neuroblasts and the colonies of stem/progenitor cells (D). Scale: A, B, C – 100 μ m; D – 50 μ m.

крыс формируют многоклеточные агрегаты. В процессе культивирования жизнеспособность клеток в составе агрегатов повышается, упаковка клеток в них становится более плотной, часть агрегатов превращается в компактные сфероиды.

Способность НК, культивируемых в составе агрегатов, восстанавливать возможные повреждения, формировать нейроны, клетки глии, нейробласты и колонии стволовых/прогениторных клеток позволяет предположить, что в агрегате воссоздается клеточное микроокружение, приближенное к интактной нервной ткани [2]. Очевидно, такое микроокружение способствует репарации повреждений, полученных при выделении клеток, и обеспечивает сигналы выживания для них. В процессе культивирования агрегатов в клетках может происходить накопление белка адгезии Е-кадгерина [16], что является причиной морфологического перехода

of freshly isolated cells, and further culturing of the aggregates led to their growth as well.

Thus the studies performed have shown that freshly isolated heterogenous NCs of newborn rats in several hours after culturing in the presence of 10% rat blood serum form the multicellular aggregates. During culturing the viability of cells of aggregates increases, the packing of cells in them becomes denser, the part of aggregates transforms into compact spheroids.

Ability of NCs cultured as the components of aggregates to recover potential damages, to form neurons, glial cells, neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells allows the supposition that a cell microenvironment similar to an intact nervous tissue one is reproduced inside an aggregate [2]. This microenvironment likely facilitates the reparation of injuries caused by cell isolation and provides the survival signals for them. Culturing of aggregates could be accompanied by ac-

от рыхлого агрегата к компактному сфероиду. Следует отметить, что E-кадгерин (один из самых важных белков адгезии) предположительно играет определяющую роль в защите клеток от апоптоза [12].

Замораживание-отогрев приводит к снижению жизнеспособности НК агрегатов, определяемой по окрашиванию трипановым синим, в среднем до $49,6 \pm 3,9\%$ (в 1,75 раза по сравнению с клетками исходных агрегатов).

Однако, как показали проведенные эксперименты, определяющее значение для культивирования деконсервированных НК *in vitro* имеет не их жизнеспособность, а сохранение морфологической целостности агрегатов. Так, при культивировании единичных НК, полученных в результате разрушения деконсервированных агрегатов в процессе отмывания от ДМСО с центрифугированием, реагрегации клеток не происходит, они не прикрепляются к подложке и погибают. Очевидно, дезагрегация агрегатов сопровождается разрушением межклеточного матрикса и нарушением адгезивных свойств клеток, что препятствует их прикреплению, стимулирует развитие апоптоза [8, 9, 13, 14] и в итоге приводит к их гибели.

При культивировании деконсервированных морфологически целых агрегатов сохраняется их способность к прикреплению с последующей миграцией НК и формированием ими клеток глии, нейронов, нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток. Отличием от культивирования исходных пересейанных агрегатов является лишь задержка во времени стадий прикрепления агрегатов, формирования монослоя клетками глии, образования нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток (таблица).

Причиной такой задержки, очевидно, является процесс восстановления повреждений НК, возникших при криоконсервировании, который занимает определенное время. Это время, вероятно, неодинаково для стволовых/прогениторных, комитированных и дифференцированных клеток нервной ткани, о чем свидетельствует замедление сроков наступления различных стадий культивирования агрегатов НК (таблица).

Таким образом, краткосрочное культивирование НК новорожденных крыс в составе агрегатов позволяет клеткам эффективно восстанавливаться после выделения и криоконсервирования.

Сравнение стадий культивирования агрегатов НК до и после криоконсервирования
Comparison of the stage for culturing NCs aggregates prior to and after cryopreservation

Стадии культивирования агрегатов НК NC aggregates culture steps	Время культивирования НКсутки NC culture days	
	Свежевыделенные Primary isolated	Криоконсервированные Frozen-thawed
Прикрепление агрегатов Attaching of aggregates	0,5 – 1	1 – 2
Формирование 80% монослоя 80% monolayer forming	4 – 6	9 – 10
Появление нейробластов Appearing of neuroblasts	8 – 9	15 – 16
Формирование колоний НК NC colonies forming	14 – 16	19 – 21

cumulation of adhesion protein e-cadherin in the cells [16], that is the cause of morphological transition of a loose aggregate to a compact spheroid. It should be noted that e-cadherin (being one of the most important adhesion proteins) plays a significant role in protecting cells from apoptosis [12].

Freeze-thawing results in a reduced viability of NC aggregates, assessed by trypan blue staining in average up to $49.6 \pm 3.9\%$ (in 1.75 times if compared with the cells of initial aggregates).

However, as the carried-out experiments showed, the crucial factor for successful *in vitro* culturing of frozen-thawed NCs was not their viability, but preservation of morphological integrity of aggregates. So, the culturing of single NCs obtained as a result of destruction of frozen-thawed aggregates during the process of DMSO removal using centrifugation resulted in no re-aggregation of cells, they did not attach to surface and die. Disaggregation of aggregates is probably accompanied with the destruction of intercellular matrix and disorder in adhesive properties of cells, that lead to absence of adhesion, stimulation the apoptosis development [8, 9, 13, 14], and finally to their death.

Culturing of frozen-thawed aggregates with preserved morphological integrity showed their ability to attach, following migration of NCs and formation of glial cells, neurons, neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells. The only difference from culturing of primary re-plated aggregates was the time delay in attaching the aggregates, formation of glial cell monolayer, formation of neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells (Table).

The cause of such a delay is likely the recovery of injuries of NCs, appeared during cryopreservation, and this is time-consuming. For stem/progenitor, committed and differentiated cells of nervous tissue this time is probably different, which is confirmed with slowing-

Выводы

Краткосрочное культивирование НК в составе агрегатов позволяет восстановить повреждения, образовавшиеся в процессе их выделения и, возможно, избежать апоптоза, который может возникнуть вследствие потери клеточного микроокружения.

Замораживание НК в составе агрегатов под защитой раствора 10% ДМСО позволяет эффективно сохранять стволовые/прогениторные и дифференцированные нервные клетки.

Сохранение целостности агрегатов НК после криоконсервирования – необходимое условие для их выживания в культуре.

Использовать центрифугирование при отмывке агрегатов НК от ДМСО после криоконсервирования нецелесообразно, так как оно приводит к разрушению агрегатов.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология.– Киев.: Наук. думка, 1994.– 431 с.
2. Ляшенко Т.Д., Сукач А.Н. Характеристика изолированных нервных клеток новорожденных крыс // Патология.– 2009.– Т. 6, №1.– С. 55–58.
3. Сукач А.Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология.– 2005.– Т. 47, №3.– С. 207–213.
4. Сукач А.Н., Иванов Э.Н. Образование сферических колоний как свойство стволовых клеток // Цитология.– 2007.– Т. 49, №11.– С. 916–922.
5. Сукач А.Н., Петренко А.Ю. Особенности поведения эмбриональных нервных клеток в условиях культивирования *in vitro* // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 385–388.
6. Abu-Absi S.F., Friend J.R., Hansen L.K., Hu W.S. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids // Exp. Cell Res.– 2002.– Vol. 274, N1.– P. 56–67.
7. Arusha O., Timothy M., Shoukat D. Regulation of E-cadherin expression and β -catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase // Biochem. Biophys. Acta.– 2004.– Vol. 1691, N1.– P. 1–15.
8. Frisch S.M., Ruoslahti E. Integrins and anoikis // Curr. Opin. Cell Biol.– 1997.– Vol. 9, N5.– P. 701–706.
9. Frisch S.M., Screaton R.A. Anoikis mechanisms // Curr. Opin. Cell Biol.– 2001.– Vol. 13, N5.– P. 555–562.
10. Furukawa K.S., Ushida T., Sakai Y. et al. Formation of human fibroblast aggregates (spheroids) by rotational culture // Cell. Transplant.– 2001.– Vol. 10, N4–5.– P. 441–445.
11. Gregg C., Weiss S. Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells // J. Neurosci.– 2003.– Vol. 23, N37.– P. 11587–11601.
12. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis" // Apoptosis.– 2002.– Vol. 7, N3.– P. 247–260.
13. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell.– 2000.– Vol. 100, N1.– P. 57–70.
14. Korff T., Augustin H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation // J. Cell Biol.– 1998.– Vol. 143, N5.– P. 1341–1352
15. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // Biotechnol. J.– 2008.– Vol. 3, N9–10.– P. 1172–1184.

down of onset time for different culturing stages of NCs aggregates (Table).

Thus short-term culturing of newborn rat NCs as the part of aggregates enables an effective recovery of cells after isolation and cryopreservation.

Conclusions

Short-term culturing of NCs as the part of aggregates enables the recovery of the damages, appeared during their isolation and likely the prevention of apoptosis, which may appear due the loss of cell microenvironment.

Freezing of NCs as the part of aggregates under 10% DMSO protection allows the effective preservation of stem/progenitor and differentiated nervous cells.

The preservation of post-thaw integrity of NCs aggregates is the essential condition for their survival in culture.

The use of centrifugation for removing DMSO from NC aggregates after cryopreservation is inexpedient, since it leads to aggregates destroying.

References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 431p.
2. Lyashenko T.D., Sukach A.N. Characteristics of isolated neural cells from newborn rats // Patologiya.– 2009.– Vol. 6, N1.– P. 55–58.
3. Sukach A.N. Characteristics of human embryonic neuronal cells, obtained by non-enzyme method // Tsitologiya.– 2005.– Vol. 47, N3.– P. 207–213.
4. Sukach A.N., Ivanov E.N. Formation of sphere colonies as the feature of stem cells // Tsytologiya.– 2007.– Vol. 49, N11.– P. 916–922.
5. Sukach A.N., Petrenko A.Yu. Behavioral peculiarities of embryonic nervous cells under culturing *in vitro* // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 385–388.
6. Abu-Absi S.F., Friend J.R., Hansen L.K., Hu W.S. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids // Exp. Cell Res.– 2002.– Vol. 274, N1.– P. 56–67.
7. Arusha O., Timothy M., Shoukat D. Regulation of E-cadherin expression and β -catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase // Biochem. Biophys. Acta.– 2004.– Vol. 1691, N1.– P. 1–15.
8. Frisch S.M., Ruoslahti E. Integrins and anoikis // Curr. Opin. Cell Biol.– 1997.– Vol. 9, N5.– P. 701–706.
9. Frisch S.M., Screaton R.A. Anoikis mechanisms // Curr. Opin. Cell Biol.– 2001.– Vol. 13, N5.– P. 555–562.
10. Furukawa K.S., Ushida T., Sakai Y. et al. Formation of human fibroblast aggregates (spheroids) by rotational culture // Cell. Transplant.– 2001.– Vol. 10, N4–5.– P. 441–445.
11. Gregg C., Weiss S. Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells // J. Neurosci.– 2003.– Vol. 23, N37.– P. 11587–11601.
12. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis" // Apoptosis.– 2002.– Vol. 7, N3.– P. 247–260.
13. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell.– 2000.– Vol. 100, N1.– P. 57–70.
14. Korff T., Augustin H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation // J. Cell Biol.– 1998.– Vol. 143, N5.– P. 1341–1352

16. *Lin R.Z., Chou L.F., Chien C.C., Chang H.Y.* Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin // *Cell. Tissue Res.*– 2006.– Vol. 324, N3.– P. 411–422.
17. *Malinin T.I., Perry V.P.* Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells // *Cryobiology.*– 1967.– Vol. 4, N2.– P. 90–96.
18. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.*– 1976.– N13.– P. 29–83.
19. *Tomford W.W., Fredericks G.R., Mankin H.J.* Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes // *J. Bone Joint Surg. Am.*– 1984.– Vol. 66, N2.–P. 253–259.
15. *Lin R.Z., Chang H.Y.* Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // *Bio-technol. J.*– 2008.– Vol. 3, N9–10.– P. 1172–1184.
16. *Lin R.Z., Chou L.F., Chien C.C., Chang H.Y.* Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin // *Cell. Tissue Res.*– 2006.– Vol. 324, N3.– P. 411–422.
17. *Malinin T.I., Perry V.P.* Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells // *Cryobiology.*– 1967.– Vol. 4, N2.– P. 90–96.
18. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.*– 1976.– N13.– P. 29–83.
19. *Tomford W.W., Fredericks G.R., Mankin H.J.* Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes // *J. Bone Joint Surg. Am.*– 1984.– Vol. 66, N2.–P. 253–259.

Поступила 18.10.2011
Рецензент Г.А. Божок

Accepted 18.10.2011