

УДК 615.361.811.013.014.41:57.08

UDC 615.361.811.013.014.41:57.08

Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Т.М. ГУРИНА, Н.Н. БАБЕНКО, ОСТАНКОВ М.В.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Different Cryopreservation Regimens on Some Characteristics of Embryonic Neuronal Cells

GOLTSEV A.N., GURINA T.M., BABENKO N.N., OSTANKOV M.V.

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

Исследовано влияние различных режимов криоконсервирования на сохранность эмбриональных нервных клеток (ЭНК) по критериям количества ядерных клеток в суспензии, их жизнеспособности и адгезивного потенциала. Отмечена зависимость морфофункциональных характеристик ЭНК как от скорости охлаждения, так и от величины переохлаждения образца. Рассмотрена возможность селективного влияния различных режимов криоконсервирования на субпопуляционный состав клеток эмбрионального мозга.

Ключевые слова: криоконсервирование, эмбриональные нервные клетки, переохлаждение.

Досліджено вплив різних режимів криоконсервування на схоронність ембріональних нервових клітин (ЕНК) за критеріями кількості ядерних клітин у суспензії, їхньої життєздатності й адгезивного потенціалу. Відзначено залежність морфофункціональних характеристик ЕНК як від швидкості охолодження, так і від величини переохолодження зразка. Розглянуто можливість селективного впливу різних режимів криоконсервування на субпопуляційний склад клітин ембріонального мозку.

Ключові слова: криоконсервування, ембріональні нервові клітини, переохолодження.

The effect of different cryopreservation regimens on the integrity of embryonic neuronal cells (ENC) according to the criteria of nuclear cell number in suspension, their viability and adhesive potential was studied. There was noted the dependency of the ENC morphofunctional characteristics both on cooling rate and the overcooling value of a sample. The possibility of a selective effect of different cryopreservation regimens on a subpopulation composition of embryonic brain cells was under consideration.

Key words: cryopreservation, embryonic neuronal cells, overcooling.

В настоящее время трансплантация ЭНК - новое направление в медицине, которое находит применение при восполнении анатомических или функциональных дефектов нервной системы [7].

В экспериментальных условиях часто речь идет о пересадке свежеполученных (нативных) ЭНК с минимальным временем ишемии (от нескольких минут до 1 часа). Однако в условиях клиники, когда возникает необходимость транспортировать материал, период нахождения ткани в условиях ишемии может превосходить допустимые пределы, что приводит к гибели большей части, а порой и всех клеток трансплантата. Поэтому одним из путей сохранения жизнеспособности ЭНК является создание адекватного способа их консервирования. Сведения о морфологической и функциональной сохранности криоконсервированных клеток весьма противоречивы, что можно объяснить широким спектром методических подходов

Nowadays the ENC transplantation is a new direction in medicine, which is applied when filling-up the anatomic or functional defects of nerve system [7].

Under experimental conditions the matter often concerns the grafting of freshly procured (native) ENC with minimum time of ischemia (from several minutes to 1 hour). However under clinical conditions, when the material transportation is necessary, the period of tissue staying under ischemia conditions can exceed the allowable limits, that results in a death of major part and sometimes of all the cells of a transplant. Therefore one of the ways for preserving ENC viability is to create the adequate means for their preservation. The information about morphological and functional integrity of cryopreserved cells is quite contradictory, that can be explained by a wide range of methodical approaches to the realisation of freeze-thawing process: the variability of regimens of low temperature

Адрес для корреспонденции: Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720104, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Goltsev A.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720104, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

реализации процесса замораживания-отогрева: вариабельностью режимов низкотемпературного консервирования, использованием разнообразных видов контейнеров для образцов, применением протекторов различной химической природы и их концентрацией в криозащитной среде [5,8-10]. Для криоконсервирования ЭНК используют в основном два режима замораживания:

двухэтапное замораживание с постоянной медленной скоростью (1 град/мин) охлаждения до температуры -60°C на первом этапе и дальнейшим погружением в жидкий азот [9,10];

трехэтапное замораживание предусматривает охлаждение от комнатной температуры до -25°C со скоростью 15-30 град/мин, выдержку при конечной температуре -25°C в течение 20 мин и последующее погружение в жидкий азот [5].

Оба режима замораживания имеют универсальный характер, то есть не связаны с физико-химическими свойствами конкретных протекторных растворов, и могут быть использованы для криоконсервирования любых типов клеток с различными криопротекторами и контейнерами. Однако эти режимы не гарантируют высокой жизнеспособности биоматериала, особенно имеющего низкую криорезистентность, как например ЭНК. Совершенствование технологического процесса замораживания для возможного нивелирования действия основных повреждающих факторов позволит повысить эффективность клинического применения криоконсервированного материала.

Цель данной работы - сравнительное изучение зависимости криоустойчивости ЭНК экспериментальных животных от используемого режима замораживания.

Материалы и методы

Суспензию ЭНК получали методом щадящей механической диссоциации фрагментов мозга эмбрионов крыс 9-11 сут гестации [1]. Криоконсервирующей средой служил раствор Хенкса с добавлением 10%-й инактивированной телячьей сыворотки, глюкозы и 7%-го ДМСО. В качестве контейнеров для замораживания использовали криоампулы фирмы "Nunc" объемом 1 мл. Объем замораживаемого образца составлял 0,5 мл. Замораживание проводили на программном замораживателе фирмы "Cryoson" (Германия). Во всех случаях до и после замораживания-отогрева определяли общее количество ядерных клеток в суспензии, их жизнеспособность с помощью суправитального окрашивания трипановым синим и количество адгезивных клеток с использованием метода преплейтинга [6]. Суть метода заключается в том, что суспензию диссоциированных клеток

preservation with different kinds of containers for samples, the application of protectants of different chemical origin and their concentrations in cryoprotective medium [8-10]. Two regimens of freezing are mainly used for ENC cryopreservation: two-stage freezing with a constant slow cooling rate ($1^{\circ}/\text{min}$) down to the temperature of -60°C at the first stage and further immersion into liquid nitrogen [9, 10]; three-stage freezing envisages the cooling from the room temperature down to -25°C with the rate of $15-30^{\circ}/\text{min}$, exposure at the final temperature of -25°C during 20 min and following immersion into liquid nitrogen [5]. Both regimens of freezing have the universal character, i.e. are not related to physical and chemical properties of specific cryoprotective solutions and can be used for cryopreservation of any cell types with different cryoprotectants and containers. However these regimens do not guarantee a high viability of biomaterial, namely with low cryoresistance, as for ENC, for example. The improvement of technological process of freezing for possible grading the effect of main damaging factors will permit to increase the efficiency of the cryopreserved material clinical application.

The aim of this work was a comparative study of the dependence of ENC cryoresistance in experimental animals on the used freezing regimen.

Materials and methods

The ENC suspension was obtained using the method of mild mechanical dissociation of the rat's embryo brain fragments of 9-11 gestation day [1]. Henks solution with adding 10% inactivated calf serum, glucose and 7% DMSO served as a cryopreserving medium. "Nunc" 1 ml's cryoampoules were used as the containers for freezing. The volume of frozen sample made 0.5 ml. Freezing was carried-out using the "Cryoson" programmable freezer (Germany). In all cases before and after freeze-thawing there were determined a total number of nuclear cells in the suspension, their viability by means of supravital staining with trypane blue and the number of adhered cells using the "preplating" method [6]. The main point of this method is that the suspension of dissociated cells is placed at the bottom of plastic Petri dishes of 60mm diameter for 15 min. At the same time the glial and connective tissue cells with a high adhesive capability are attached to the plastic surface, but neurones remain in a suspension.

There were studied the crystallisation temperature of chosen cryopreserving solution, a possible value of the sample supercooling for this type of container and the volume of cell suspension in it. Taking into account a negative effect of supercooling on cell biological integrity after freezing [2], the program with slow constant cooling rate was modified in these investi-

наливают на дно пластиковых чашек Петри диаметром 60 мм и выдерживают при комнатной температуре 30 мин. При этом глиальные и соединительно-тканые клетки, обладающие высокой адгезивностью, прикрепляются к поверхности пластика, а нейроны остаются в суспензии.

Были изучены температура кристаллизации выбранного криоконсервирующего раствора, возможная величина переохлаждения образца для данного типа контейнера и объема клеточной суспензии в нем. Учитывая негативное влияние переохлаждения на биологическую полноценность клеток после замораживания [2], в исследованиях была модифицирована программа с медленной постоянной скоростью охлаждения введением температурной инициации и снятием таким образом переохлаждения, что привело к подавлению резкого скачка температуры образца в начале его кристаллизации. Критерием для выбора начала ввода инициации послужила температура кристаллизации используемого криоконсервирующего раствора, а ее величину и продолжительность определил градиент возможного переохлаждения образца при данной скорости охлаждения.

Таким образом, для сравнения влияния различных режимов замораживания были использованы следующие три режима криоконсервирования:

режим 1 – от комнатной температуры до -5°C охлаждение со скоростью 1-1,5 град/мин, при -5°C температурная инициация с последующим охлаждением до -60°C со скоростью 2 град/мин и дальнейшее погружение образца в жидкий азот;

режим 2 – от комнатной температуры до -60°C охлаждение со скоростью 1 град/мин с последующим погружением образца в жидкий азот;

режим 3 – от комнатной температуры до -25°C охлаждение со скоростью 20 град/мин, выдержка при конечной температуре -25°C в течение 20 мин с последующим погружением образца в жидкий азот.

Образцы, замороженные по различным режимам, отогревали на водяной бане с температурой 37°C до исчезновения кристаллов льда.

Результаты и обсуждение

Полученные данные показали, что начальная жизнеспособность клеток указанного срока гестации после диссоциации на этапе их выделения не превышала 70%. Это свидетельствует о том, что ЭНК оказались весьма чувствительными к их выделению из органных структур. Показатель сохранности снижался еще на 5-7% на этапе эквilibрации клеток с протектором. В дальнейшем для того, чтобы оценить повреждающее действие на клетки цикла замораживания-отогрева, во всех

исследованиях использовали суперохлаждение с так называемой температурной инициацией, и, как результат, подавление острого скачка температуры образца в начале ее кристаллизации. Температуру кристаллизации используемого криоконсервирующего раствора служила критерием для выбора начала ввода инициации, но ее значение и длительность были определены по градиенту возможного переохлаждения при данной скорости охлаждения.

Таким образом, для сравнения различных режимов замораживания были использованы следующие три режима криоконсервирования:

режим N1 – от комнатной температуры до -5°C , охлаждение со скоростью 1-1,5 $^{\circ}$ /мин, при -5°C температурная инициация с последующим охлаждением до -60°C со скоростью 2 $^{\circ}$ /мин и дальнейшее погружение образца в жидкий азот;

режим N2 – от комнатной температуры до -60°C , охлаждение со скоростью 1 $^{\circ}$ /мин с последующим погружением образца в жидкий азот;

режим N3 – от комнатной температуры до -25°C , охлаждение со скоростью 20 $^{\circ}$ /мин, выдержка при конечной температуре -25°C в течение 20 мин с последующим погружением образца в жидкий азот.

Образцы, замороженные по различным режимам, отогревали на водяной бане с температурой 37°C до исчезновения кристаллов льда.

Results and discussion

The obtained data demonstrated, that the initial viability of cells of the mentioned gestation term after dissociation at the stage of their isolation did not exceed 70%. This testifies to the fact, that ENC occurred to be quite sensitive to their isolation from organ structures. The index of integrity decreased by 5-7% at the stage of cell equilibration with a protectant. Further in order to estimate the damaging effect of freeze-thawing cycle on cells, the material characteristics after equilibration stage were assumed for 100% in all cases.

The attention should be paid to the fact, that the number of nucleated cells was slightly and approximately in an equal extent decreased after all regimens of freeze-thawing (Figure). Cell integrity had a considerable variability, determined by cryopreservation regimen. Thus, when using the regimen N1 the viability made $72.86 \pm 6.1\%$, 42.0 ± 2.1 and $26.78 \pm 1.4\%$ for the regimens 2 and 3, correspondingly. We can suppose, that such differences in the index are related to the damaging effect on cell of both freezing rate (regimens N2 and N3) and the value of the sample overcooling during freezing, since namely regimen N1 envisaged the maximum complete suppression of overcooling before the crystallisation beginning.

The ENC adhesive capability can characterise a population composition of this material. It is known,

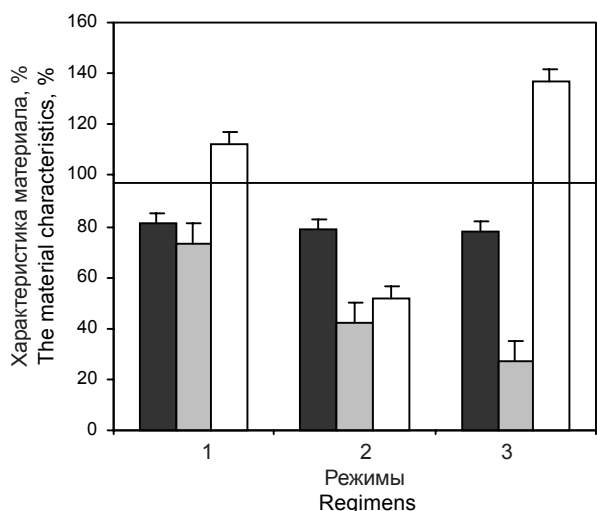
случаях за 100% принимали характеристики материала после этапа эквипирации.

Следует обратить внимание, что количество ядросодержащих клеток незначительно и примерно в равной степени уменьшалось после всех режимов замораживания-отогрева (рисунок). Сохранность клеток имела значительную вариабельность, определяемую режимом криоконсервирования. Так, при использовании режима 1 жизнеспособность составила $72,86 \pm 6,1\%$, для режимов 2 и 3 – $42,0 \pm 2,1$ и $26,78 \pm 1,4\%$ соответственно. Можно предположить, что такие различия показателя связаны с повреждающим действием на клетки как скорости замораживания (режимы 2 и 3), так и величины переохлаждения образцов во время замораживания, поскольку именно режим 1 предусматривал максимально полное подавление переохлаждения перед началом кристаллизации.

Адгезивная способность ЭНК может характеризовать популяционный состав данного материала. Известно, что свойством адгезии к стеклу или пластику обладают глиальные клетки, в то время как нервным клеткам для этого нужны субстраты, несущие на своей поверхности положительный заряд [6]. Оценка клеточных популяций эмбрионального мозга свидетельствует о том, что с использованием режима 1 при некотором снижении количества жизнеспособных клеток отклонение от величины контроля по количеству адгезивных клеток было наименьшим. После замораживания клеток по режиму 2 количество адгезивных клеток снизилось на 48,3%. Снижение экспрессии молекул адгезии на клетках суспензии, криоконсервированной по режиму 2, можно объяснить модификацией клеточной мембраны, в частности, сжиданием (shedding) клеточных рецепторов под действием факторов криоконсервирования, включая переохлаждение образца [3]. Замораживание по режиму 3 привело к резкому возрастанию процента адгезивных клеток. Такого рода изменения на фоне низкой выживаемости клеток в суспензии можно объяснить перераспределением клеточных субпопуляций головного мозга после криоконсервирования, что соответствует данным литературы [10] о большей криостабильности глиальных клеток по сравнению с нейрональными.

Выводы

Исходя из полученных данных, можно предположить, что при использовании различных режимов замораживания мы, очевидно, имеем дело с селективным действием факторов криоконсервирования на субпопуляционный состав клеток эмбрионального мозга. В основе этого предположения лежат ранее полученные данные о



Влияние различных режимов криоконсервирования на число ядросодержащих клеток, их жизнеспособность и адгезивную способность: ■ - клеточность; ■ - жизнеспособность; □ - число адгезивных клеток.
Effect of different cryopreservation regimens on the number of nucleated cells, their viability and adhesive capability: ■ - cellularity; ■ - viability; □ - number of adhesive cells.

that the glial cells have the adhesion property to glass or plastic, meanwhile the neuronal cells need for this the substrates with a positive charge on their surface [6]. The estimation of cell populations of embryonic brain testifies to the fact, that when using regimen N1 with a certain reduction of the viable cell number, the deviation from the control value by the number of adhesive cells was the least. After cell freezing with the regimen N2 the adhesive cell number decreased by 48.3%. The expression decrease of adhesion molecules on the suspension cells, cryopreserved with the regimen N2 can be explained by the modification of cell membrane, in particular, by a shedding of cell receptors under the effect of cryopreservation factors, including the sample overcooling [3]. The freezing by the regimen N3 resulted in a sharp increase in the percentage of adhesive cells. Such kind of changes at the background of low cell survival in a suspension can be explained by the redistribution of cell subpopulations of brain after cryopreservation, that corresponds to the data [10] on a greater cryostability of glial cells in comparison with the neuronal ones.

Conclusions

Proceeding from the data obtained, we can suppose, that when using different regimens of freezing we apparently deal with a selective effect of cryopreservation factors on a subpopulation composition of embryonic brain cells. The earlier obtained data about a selective effect of different regimens of cryopreservation on a subpopulation composition of bone marrow cells are at the base of this supposition.

селективном влиянии различных режимов криоконсервирования на субпопуляционный состав клеток костного мозга [4]. Судя по определяемым показателям, предложенная нами модификация режима медленного замораживания является более оптимальным способом консервирования ЭНК, что, однако, требует дальнейшего проведения исследований с использованием функциональных тестов оценки статуса криоконсервированных ЭНК.

Литература

1. *Бабенко Н.Н.* Особенности пролиферации и дифференцировки нативных и криоконсервированных эмбриональных нервных клеток человека. Сообщение 2. Подбор оптимальных условий культивирования нативных клеток эмбрионального мозга человека // Пробл. криобиологии. – 1999. – №1. – С. 39-45.
2. *Бронштейн В.Л., Розанов Л.Ф.* Начальное переохлаждение как фактор повреждения при замораживании клеточных суспензий // Криобиология и криомедицина. – Киев: Наук. думка, 1977. – Вып.3. – С. 26-29.
3. *Гольцев А.Н.* Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис. ... доктора мед. наук. – Харьков, 1988. – 35 с.
4. *Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В. и др.* Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Пробл. криобиологии. – 1996. – №2. – С. 3-10.
5. *Кріоконсервування ембріональної нервової тканини для клінічного використання: Метод. рекомендації.* – Харків, 1999. – 21 с.
6. *Fischbach G.D.* Synapse formation between dissociated nerve and muscle // Science. – 1970. – Vol.169. – P. 1331-1333.
7. *Masato Mitome, Hoi Pang Lo, Anthony van den Pol et al.* Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells // Brain, 2001. – Vol. 124, N11. – P. 2147-2161.
8. *Petite D., Calvet M.C.* Cryopreserved neuronal cells in long-term cultures of dissociated rat cerebral cortex: survival and morphometric characteristics as revealed by immunocytochemistry // Brain Res. – 1995. – Vol. 669, N2. – P. 263-274.
9. *Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al.* Human neuronal cell viability demonstrated in culture after cryopreservation // Brain Res. – 1988. – Vol.473, N1. – P.169-174.
10. *Redmond DE Jr., Naftolin F., Collier T.J. et al.* Cryopreservation, culture, and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into monkeys // Science. – 1988. – Vol. 242, N4. – P. 768-771.

Поступила 14.01.2003

According to the determined indices, the proposed by us modification for slow freezing regimen is more optimal way of ENC preservation, that however requires a further research using functional tests for estimating the status of cryopreserved ENC.

References

1. *Babenko N.N.* Peculiarities of proliferation and differentiation of native and cryopreserved human embryonic nerve cells. Part 2. Selection of optimal conditions for native cell culturing of human embryonic brain // Problems of Cryobiology. – 1999. – N1. – P.39-45.
2. *Bronshtein V.L., Rozanov L.F.* Initial overcooling as the damage factor during freezing the cellular suspensions. Cryobiology and cryomedicine. – Kiev: Naukova Dumka, 1977, Issue 3., P. 26-29.
3. *Goltsev A.N.* The effect of cryopreservation factors on immunobiological properties of bone marrow hemopoietic cells: Abstract for Doctor thesis (medicine). – Kharkov, 1988. – 35 p.
4. *Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al.* Application of cryobiology in solving immune-conflict problems when grafting histocompatible bone marrow // Problems of Cryobiology. – 1996. – N2. – P.3-10.
5. *Cryopreservation of embryonic neuronal tissue for clinical application: Methodical recommendations.* – Kharkov, 1999, 21 p.
6. *Fischbach G.D.* Synapse formation between dissociated nerve and muscle // Science. – 1970. Vol. – 169. – P.1331-1333.
7. *Masato Mitome, Hoi Pang Lo, Anthony van den Pol et al.* Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells // Brain, 2001. – Vol.124, N11. – P. 2147-2161.
8. *Petite D., Calvet M.C.* Cryopreserved neuronal cells in long-term cultures of dissociated rat cerebral cortex: survival and morphometric characteristics as revealed by immunocytochemistry // Brain Res. – 1995. – Vol.669, N2. – P. 263-274.
9. *Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al.* Human neuronal cell viability demonstrated in culture after cryopreservation // Brain Res. – 1988. – Vol. 473, N1. – P. 169-174.
10. *Redmond D.E., Naftolin F., Collier T.J. et al.* Cryopreservation, culture and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into monkeys // Science. – 1988. – Vol.242, N4. – P. 768-771.

Accepted in 14.01.2003