

## **АДГЕЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК КАК КРИТЕРИЙ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПОЛНОЦЕННОСТИ**

**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской темы 2.2.6.35 «Оцінка стану пула стовбурових гемопоетичних клітин з метою оптимізації лікування аутоімунних захворювань кріоконсервованими продуктами ембріофетоплацентарного комплексу», № гос.регистрации 0107U000535.

**Вступление.** Одним из перспективных направлений в решении проблемы длительного хранения препаратов клеточной и тканевой терапии с целью дальнейшего клинического их использования является их низкотемпературное консервирование [4]. Именно этот метод позволяет не только хранить образцы на протяжении длительного времени и использовать по мере востребованности, но и обеспечивает возможность получения сертифицированного и стандартизованного биоматериала [14]. Сведения о морфологической и функциональной сохранности кріоконсервированных фетальных нервных клеток (ФНК) весьма противоречивы [12,13,14,18]. Причинами этого могут быть как исходное состояние биообъекта перед кріоконсервированием, так и использование разных режимов и методов оценки [5].

Структурно-функциональный потенциал кріоконсервированного материала может быть оценен с помощью ряда методов, начиная с экспресс-определения биологической полноценности ФНК, заканчивая оценкой функционального статуса нейроткани в системе *in vivo* и *in vitro* [3]. Каждый из этих методов, имея свои преимущества и недостатки, при комплексном использовании позволяют всесторонне оценить состояние донорского материала.

Одним из основных критериев оценки функциональной сохранности ФНК после кріоконсервирования в системе *in vitro* может выступать их адгезивный потенциал [2]. Он определяет одно из главных свойств нервных клеток – способность прикрепляться к субстрату и образовывать межклеточные контакты [1]. Согласно современным представлениям, фетальная нервная ткань, в зависимости от срока гестации, состоит из нейроэпителиальных клеток, нейро- и глиобластов, малодифференцированных нейронов и глии, которые формируют определенную citoархитектонику и находятся в специфических межнейрональных и нейроглиальных взаимоотношениях [10,15,16]. В связи с этим определение адгезивного потенциала каждой

субпопуляции клеток фетального мозга, обеспечиваемого разными типами рецепторов, позволит достаточно полно оценить функциональную активность кріоконсервированного материала.

**Целью данной работы** было определение функциональной активности кріоконсервированных по разным режимам ФНК в системе *in vitro* по их способности образовывать различного типа адгезивные контакты.

**Объект и методы исследования.** Работа выполнена в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей» (Страсбург, 1985г.). Материалом для исследования служили нативные и кріоконсервированные в различных режимах ФНК белых беспородных крыс 11 суток гестации.

Плоды крыс после выделения трижды промывали в стерильном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия) и переносили в чашку Петри для препарирования. Извлекали головной мозг, освобождали его от мезенхимной оболочки, разрезали на фрагменты и гомогенизировали в 3 мл раствора Хенкса, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («БиоЛек», г.С-Петербург) [2].

**Кріоконсервирование ФНК.** Суспензию ФНК кріоконсервировали на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины г. Харьков) с криопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) (АО «Галичфарм», Украина, г. Львов) в пластиковых ампулах Nunc (Германия), объемом 1,8 мл с концентрацией  $5 \times 10^6$  кл/мл по 3 режимам (Р):

Р1: охлаждение со скоростью 1°/мин до -5°С с последующей инициацией кристаллообразования в течении 5 мин, затем охлаждение со скоростью 2° мин до -60°С и погружение в жидкий азот [8].

Р2: охлаждение со скоростью 1°/мин до -80°С и погружение в жидкий азот [18].

Р3: охлаждение со скоростью 1°/мин до -9°С, остановка в течении 10 мин, затем охлаждение со скоростью 1°/мин до -25°С, 10°/мин до -60°С и погружение в жидкий азот [9].

В качестве среды криоконсервирования использовали раствор Хенкса с добавлением 0,6% глюкозы, 10% ЭТС, 0,2 Ед/мл инсулина.

Хранение криоконсервированных ФНК (кФНК) осуществляли при температуре -196°C в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАНУ в течении 2-х месяцев. Отогрев образцов проводили на водяной бане при температуре 37°C [3]. Клетки отмывали от ДМСО однократным медленным добавлением равного объема раствора Хенкса, содержащего 20% ЭТС, с последующим центрифугированием (1000 об/мин, 10 мин).

В суспензии ФНК во всех случаях до и после цикла замораживания-оттаивания определяли количество ядросодержащих клеток и их жизнеспособность с помощью суправитального окрашивания 0,4% раствором трипанового синего в световом микроскопе Zeiss Primo Star.

Оценка адгезивного потенциала глиальных и нейрональных клеток ФНК. Адгезивный потенциал глиальных и нейрональных предшественников был оценен в системе *in vitro* при культивировании ФНК в чашках Петри, поверхность которых была покрыта определенной комбинацией белков внеклеточного матрикса. Это способствовало селективному прикреплению к культуральной подложке глиальных и нейрональных элементов за счет их взаимодействия с различными молекулами внеклеточного матрикса. Для прикрепления глиальных клеток использовали покрытие BioCoat Ламинин/Фибронектин (BD Pharmingen™, США), для нейрональных элементов – BioCoat Поли-D-лизин/Ламинин (BD Pharmingen™, США). Исходными компонентами для культивирования были: питательная среда DMEM «Serva» с добавлением 10% ЭТС, заменимых и незаменимых аминокислот, витаминов, раствора пирувата Na, L-глутамина, Нерес-буфера и бикарбоната Na (для стабилизации pH раствора). В среду добавлялись 0,5% глюкозы и 0,5 Ед/мл инсулина. Клетки культивировали при температуре 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Прижизненное наблюдение проводили в инвертированном микроскопе БИОЛАМ ПЗ («ЛОМО», Санкт-петербург). Через 3

суток культивирования проводили учет количества глиальных и нейрональных предшественников на см<sup>2</sup> культуральной поверхности.

Оценка межклеточного адгезивного потенциала клеток-предшественников ФНК. Способность клеток стволового компартамента к межклеточному взаимодействию оценивали в условиях суспензионной культуры в бессывороточной среде DMEM:F12 с добавлением 20 ng/ml основного фактора роста фибробластов (bFGF, Sigma) при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 7-9 суток при исходной концентрации 2x10<sup>6</sup> клеток/мл. С целью поддержания нейросфер в недифференцированном состоянии в среду культивирования каждые 2 дня дополнительно вносили bFGF. Каждые 4 суток производили 50%-ую замену среды. При образовании агрегатов культуру многократно пипетировали и рассеивали с концентрацией 100 000 клеток на 1 мл среды.

Фенотипические характеристики клеток в составе нейросфер оценивали на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, BD, США) с использованием моноклональных антител к nestin (BD Pharmingen™, США) и предварительной пермеабиллизацией клеток.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.

### Результаты исследований и их обсуждение.

Известно, что дифференцировка нервных и глиальных клеток, формирование и рост отростков начинаются только после их прикрепления к какому-либо субстрату [1]. Прикрепление клеток к компонентам внеклеточного матрикса (ламинин, фибронектин, витронектин и др.) осуществляется с помощью точечных (фокальных) адгезионных контактов, а прикрепление клеток друг к другу — межклеточных контактов [15,19].

Сохранность ФНК, криоконсервированных по P1, была на достаточно высоком уровне (72,8±5,8%) при незначительном снижении количества ядросодержащих элементов (не более 15%) (рис. 1). Количественная оценка глиальных элементов ФНК, криоконсервированных по этому режиму, которые прикреплялись к подложке с комбинированным

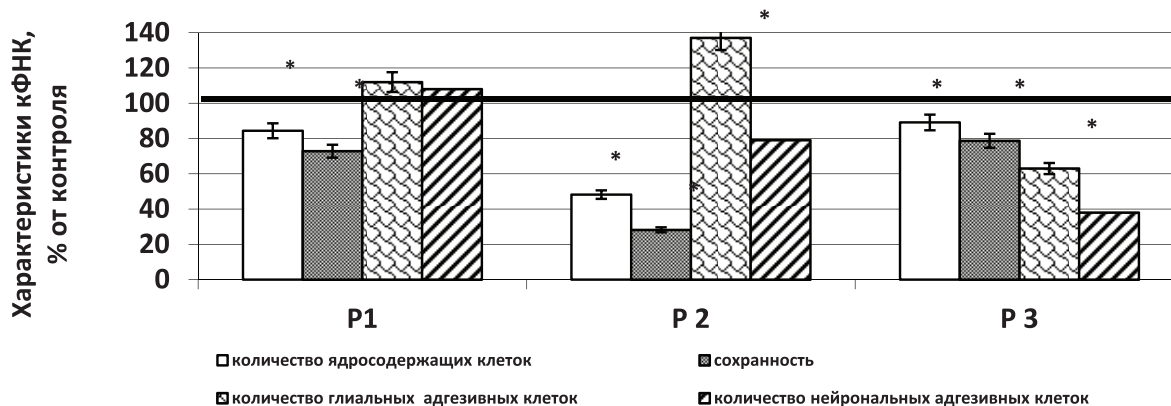


Рис. 1. Изменение показателей ФНК в зависимости от режима криоконсервирования.

покрытием Ламинин/Фибронектин, показала наименьшее отклонение данного показателя от контрольного. Это можно объяснить тем, что P1 обеспечивал максимальное снятие переохлаждения перед началом кристаллизации [8]. Данный факт особенно важен, учитывая то, что критическим этапом при криоконсервировании биоматериала является область фазовых переходов, когда вероятность возникновения глубоких криоповреждений консервированного материала наибольшая [6].

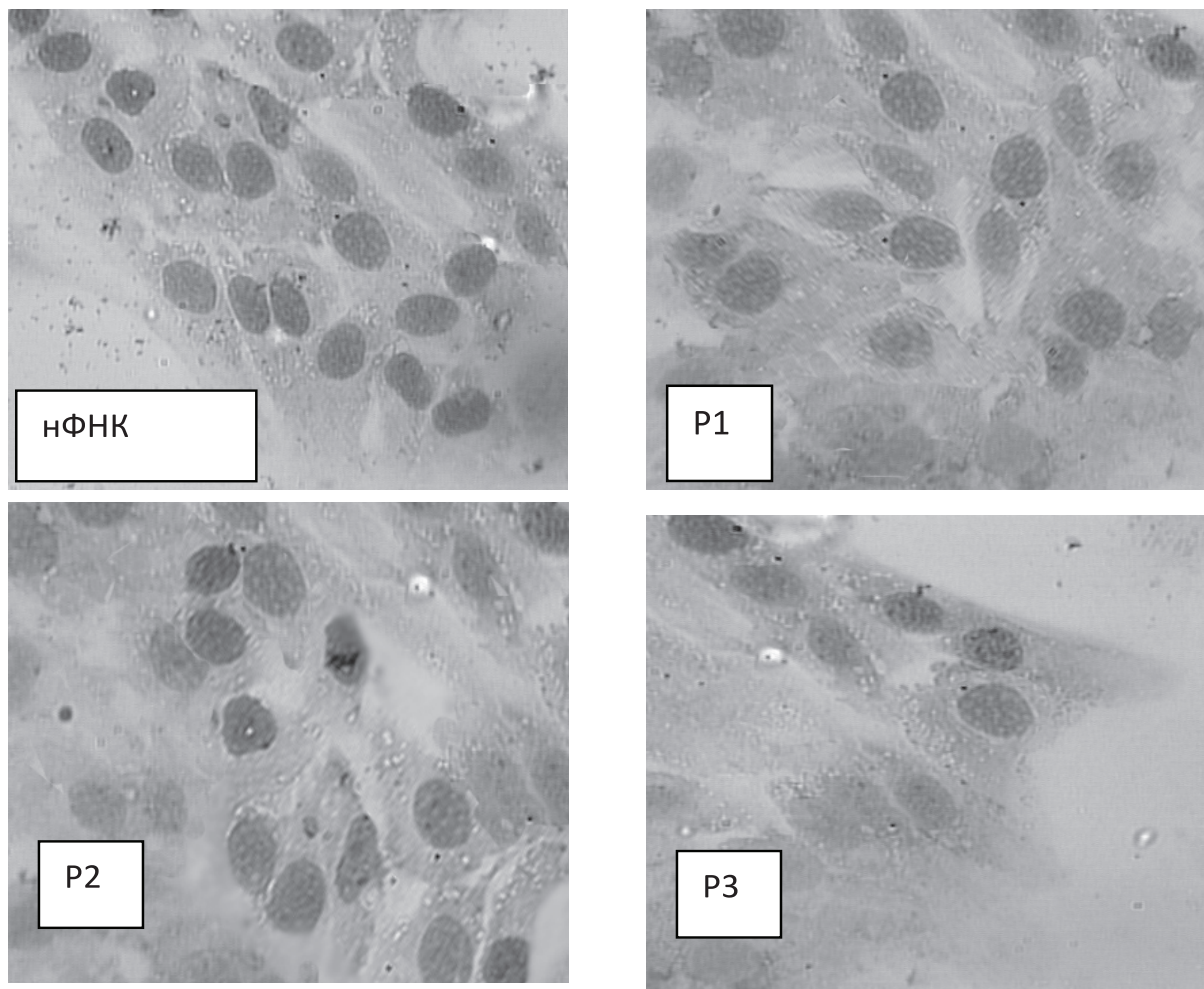
При криоконсервировании по P2 наблюдали минимальную сохранность ФНК (28,2%) с одновременным снижением в 2 раза количества ядросодержащих клеток, что может быть связано с повреждением мембран клеток вследствие механического напряжения, вызванного избыточной дегидратацией и последующим уменьшением объема клетки до критического [6,7,14]. Установлено, что замораживание по P2 приводило почти к 50% возрастанию содержания глиальных элементов. Такого рода изменения могут быть обусловлены перераспределением субпопуляций ФНК в сторону увеличения содержания клеток глии на фоне двукратного

снижения общего количества клеток после криоконсервирования по P2. Действительно, известен факт большей криостабильности глиальных клеток по сравнению с нейрональными [3,5], что может быть связано с различной белок-липидной организацией мембран этих клеток.

Замораживание ФНК по режиму P3 способствовало сохранению максимального количества ядросодержащих клеток ( $89,1 \pm 7,8\%$ ) при их высокой сохранности ( $78,7 \pm 6,9\%$ ). При этом наблюдали достоверное снижение содержания глиальных адгезивных клеток (**рис. 1**), что вероятно, связано с модификацией клеточной мембраны, в частности, шеддингом рецепторов адгезии под действием факторов криоконсервирования.

– Различия показателей достоверны по сравнению с нФНК после экспозиции с криопротектором,  $p < 0,05$ , за 100% приняты соответствующие характеристики ФНК после этапа эквilibрации с криопротектором.

Криоконсервирование в первую очередь вызывает изменения в мембранных структурах клетки [6,12], что может оказывать влияние на адгезивный



**Рис.2.** Адгезия предшественников нейронов в культуре нативных и криоконсервированных по разным режимам ФНК (окраска по Романовскому-Гимзе, x400).



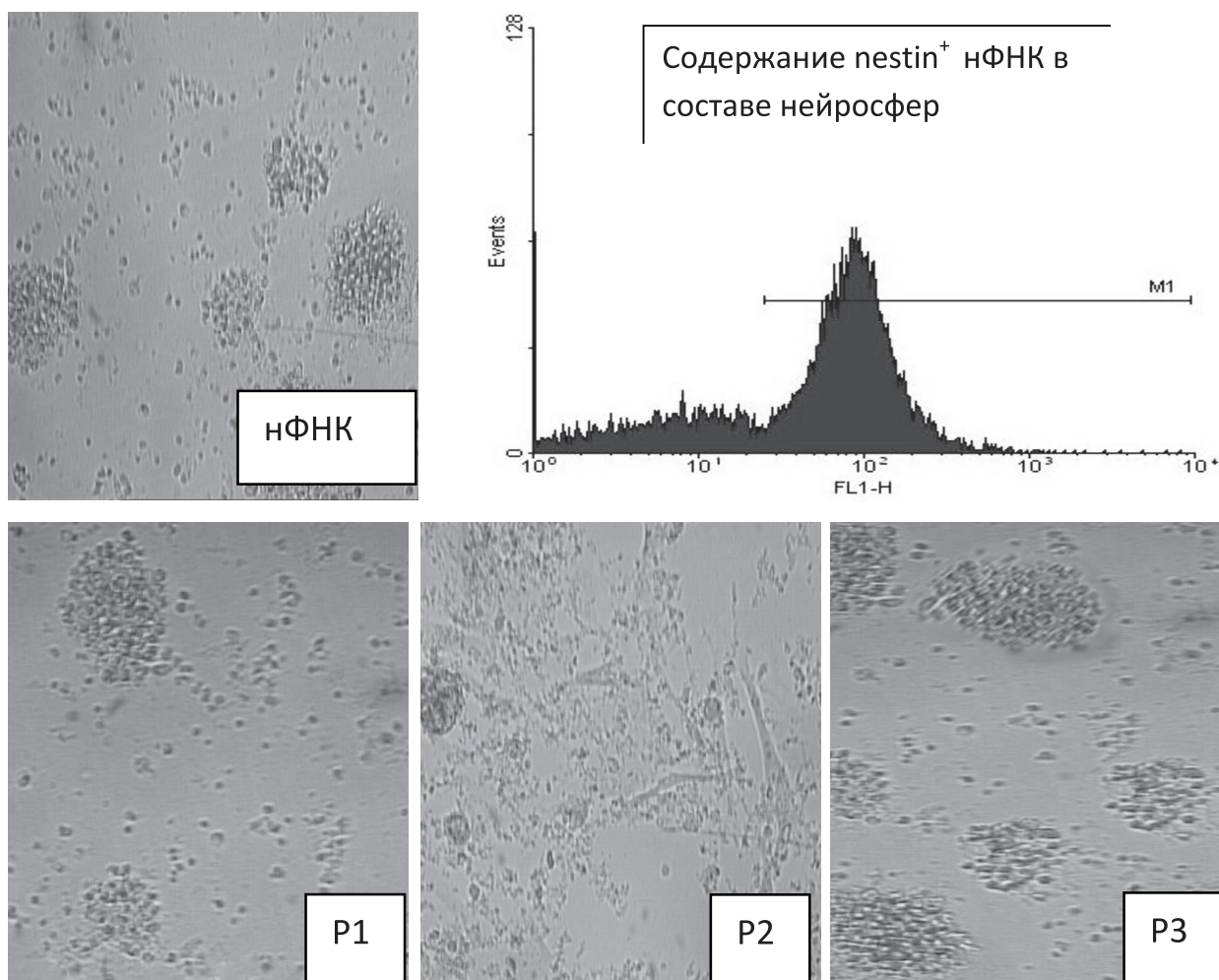


Рис.3. Формирование нейросфер в культуре ФНК, криоконсервированных по разным режимам (прижизненное фото, x100).

потенциал ФНК. Известно, что клеточные молекулы адгезии представляют собой трансмембранные или связанные с мембраной гликопротеины, которые во многом гомологичны постоянным доменам иммуноглобулинов (Ig) и фибронектина 3 типа [19]. Представителями надсемейства этих Ig являются клеточные молекулы адгезии (N-CAM) – PSA-NCAM, D2-CAM и BSP-2, L1, нейрофасцин, молекулы адгезии нейроглии CAM (NgCAM), TAG-1, MAG, и DCC83 [10]. Эти молекулы обеспечивают адгезию клеток друг к другу посредством гетерофильных связей между различными надсемействами иммуноглобулинов (например, связь между NrCAM и TAG-1) [15].

Молекулы адгезии внеклеточного матрикса, включая ламинин, фибронектин, тенаascin, перлеcan, являются благоприятным субстратом для роста нервных отростков [1]. Белки внеклеточного матрикса взаимодействуют с клетками через семейство интегринов [10]. Интегрины обеспечивают структурные связи между белками внеклеточного матрикса и внутриклеточным актиновым цитоскелетом, регулируя форму клетки и ее миграцию [19]. Кроме того, они активируют внутриклеточные

сигнальные пути, которые управляют ростом клетки, пролиферацией и дифференцировкой [2].

Использование в качестве дополнительного субстрата, несущего на своей поверхности положительный заряд [17], а именно молекулярных пленок полиаминокислот (полиорнитина, полилизина), позволяет в системе *in vitro* оценить [15] количественное содержание и адгезивный потенциал нейрональных предшественников в суспензии кФНК. Действительно, было установлено, что к обработанной комбинацией Поли-D-лизин/Ламинин подложке в основном крепились нейрональные элементы ФНК (рис.2), а при пролонгации срока культивирования наблюдали формирование зрелых, морфологически идентифицируемых типов нейронов (пирамидальных, звездчатых) и развитой системы нейрита (данные не приводятся).

Отмечена зависимость интенсивности реализации адгезивного потенциала нейрональных предшественников от режима замораживания-оттаивания. Существенных отличий в сравнении с нативным материалом не было выявлено при криоконсервировании ФНК по P1. Снижение адгезивных свойств

нейрональных клеток наблюдали после криоконсервирования по P2 и еще в большей степени – по P3. Это может быть связано как с изменением метаболизма ФНК, вызывающего модификацию белок-липидного состава мембран нейрональных клеток, так и криоселекцией из суспензии тех клеток, которые обуславливают дальнейший процесс нейрогенеза [13].

Таким образом, были оценены адгезивные контакты, которые осуществляются при помощи нейрональных молекул клеточной адгезии [15].

Адгезия клеток, с помощью которой осуществляется прочная механическая связь двух типов клеток, является исключительно важной в процессах формирования и развития нервной системы [1].

Взаимосвязь между клетками стволового компартмента и их прогениторами осуществляется с помощью кальцийзависимых молекул – кадхеринов [19]. Большинство кадхеринов, такие как E-, N-, P-кадхерины, функционируют в качестве трансмембранных линкерных белков, опосредующих взаимодействия между актиновыми цитоскелетами клеток. Они являются адгезивными белками, вокруг которых формируются межклеточные адгезивные контакты [1].

Эти контакты наиболее ярко можно проследить в культуре при формировании нейросфер, которые являются гетерогенной популяцией митотически активных, самовосстанавливающихся и мультипотентных клеток в развивающемся фетальном мозге [11]. Формирование типичных нейросфер наблюдали через 7 суток культивирования нФНК (рис. 3).

Криоконсервирование приводило к некоторой временной задержке образования нейросфер (в среднем на 2 суток), причем этот показатель не зависел от режима криоконсервирования. Количество же сформированных нейросфер на 9 сутки культивирования определялось режимом замораживания

и было максимальным в культуре ФНК, криоконсервированных по P3. Во всех случаях  $90 \pm 1,4\%$  диссоциированных клеток в составе нейросфер окрашивались МАТ к nestin, что доказывает их принадлежность к нервным стволовым/прогениторным клеткам.

**Выводы.** Таким образом, было установлено, что различные режимы замораживания могут индуцировать экспансию различных молекул адгезии, от стимуляции до ингибции. Установлено, что при использовании определенных режимов криоконсервирования, в частности P1, существует возможность сохранения функционального потенциала кФНК подобно нативному материалу. P2 способствовал обогащению популяции фетального мозга глиальными элементами. Особую значимость имеет факт обогащения пула ФНК стволовоклеточными элементами после их криоконсервирования по P3. Это является важным в терапевтическом плане, поскольку именно стволовоклеточные элементы могут достигать органа-мишени и дифференцироваться в определенном направлении, а также реконструировать трехмерную архитектуру мозга и увеличивать число полноценно функционирующих клеток [3].

Итак, учитывая тот факт, что качественные и количественные различия в экспрессии адгезивных молекул играют центральную роль в формировании тканей, то изменение адгезивных свойств ФНК после криоконсервирования непосредственно определяет функциональный потенциал этих клеток.

### **Перспективы дальнейших исследований.**

Полученные данные в дальнейшем должны быть дополнены исследованиями *in vivo* на модельных патологиях центральной нервной системы для оценки их терапевтического потенциала до и после криоконсервирования.

## Список литературы

1. Березин, В.А. Молекулы клеточной адгезии нервной ткани / В.А. Березин // Успехи соврем. биологии. - 1986. - Т.101. - С. 54-68.
2. Божкова В.П. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. / В.П. Божкова, П.Д. Брежестовский, В.П. Буравлев [и др.] // Москва : Наука. - 1988. - 318с.
3. Гольцев А.М. Вивчення функціональної активності криоконсервованих ембріональних нервових клітин шурів в системі *in vitro* та *in vivo* / А.М.Гольцев, Н.М.Бабенко, Л.В.Останкова [и др.] // Трансплантологія. - 2004. - Т.6, №2. - С. 46-56.
4. Гольцев А.Н. Криобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний / А.Н.Гольцев, Т.Г.Дубрава, Ю.А.Гаевская [и др.] // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. - 2009. - №1-2 (20-21). - С. 46-51.
5. Гольцев, А.Н. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток / А.Н. Гольцев, Т.М. Гурина, Н.Н. Бабенко // Пробл. криобиологии. - 2003. - №1. - С. 46-50.
6. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. Цуцаевой А.А. - Киев : Наукова думка, 1983. - 240 с.
7. Останков М.В. Влияние факторов криоконсервирования на цитоморфологические и структурные характеристики фетальных нервных клеток / М.В.Останков, Д. В. Лебединец, Е.А. Порожан [и др.] // Проблемы криобиологии. - 2009. -Т.19, №4. - С. 431-438.
8. Патент №4523, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування суспензії клітин ембріональної нервової тканини / Грищенко В.І., Гольцев А.М., Гурина Т.М., Бабенко Н.М.; Заявник: ІПКіК НАН України – Заявл. 24.05.2004; опубл. 17.01.2005, бюл. №1.
9. Патент №59206, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / Гольцев А.М., Порожан Е.О., Бабенко Н.М., Останков М.В.; Заявник: ІПКіК НАН України – Заявл. 04.10.2010; опубл. 10.05.2011, бюл. №9.
10. Eggers K. Polysialic acid controls NCAM signals at cell-cell contacts to regulate focal adhesion independent from FGF receptor activity / K.Eggers, Werneburg S., Schertzinger A. [et al.] // Cell Sci. - 2011. -V.124(Pt 19). -P. 3279-3291.

11. Ferrari D. Isolation of neural stem cells from neural tissues using the neurosphere technique / Ferrari D., Binda E., De Filippis L. [et al.] // *Curr Protoc Stem Cell Biol.* - 2010.-Chapter 2:Unit2D.6.
12. Fu Y. Cryopreservation and resuscitation of neural stem cells from fetal rat / Y. Fu, S. Pan, Q. Liu, S. Gong // *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* - 2010. - V.24, №7. - P. 311-314.
13. Goltsev A.N. Cryopreservation as selective method of enrichment with stem elements of embryonic neuronal cell population / A.N.Goltsev, N.N. Babenko, T.G.Dubrava, T.M.Gurina // *Word congress of cryobiology and cryomedicine, Cryo-2006, Hamburg, Germany, abstract book.* - P. 137
14. Goltsev A.N. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products / A.N. Goltsev, V.I.Grischenko, M.A.Sirous [et al.] // *Biopreservation and biobanking.* - 2009. - V.7, №1. - P. 29-38.
15. Kim S.Y. Quantitative control of neuron adhesion at a neural interface using a conducting polymer composite with low electrical impedance. / S.Y.Kim, K.M. Kim, D. Hoffman-Kim [et al.] // *ACS Appl Mater Interfaces.* - 2011. -V.3, №1. - P. 16-21.
16. Petros T.J. Pluripotent stem cells for the study of CNS development / T.J.Petros, J.A. Tyson, S.A. Anderson // *Front Mol Neurosci.* - 2011. - V.4. -P. 30-39.
17. Royce Hynes S. Photopolymerized poly(ethylene glycol)/poly(L-lysine) hydrogels for the delivery of neural progenitor cells / S. Royce Hynes, L.M. McGregor, M. Ford Rauch, E.B. Lavik // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* -2007. - V.18, №8. - P. 1017-1030.
18. Taupin P. Cryopreservation of early postmitotic neuronal cells in culture / P. Taupin // *Expert Opin Ther Pat.* - 2009.-Vol.19, №2. - P. 265-268.
19. Wojcik-Stanaszek L. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins / L. Wojcik-Stanaszek, A. Gregor, T. Zalewska // *Acta Neurobiol. Exp (Wars).* - 2011. - V.71, №1. - P.103-112.

**УДК 612.647.014.3.08:615.014.41**

### **АДГЕЗИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФЕТАЛЬНИХ НЕРВНИХ КЛІТИН ЯК КРИТЕРІЙ ЇХ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ПОВНОЦІННОСТІ**

**Порожан Е.А., Бабенко Н.Н., Дубрава Т.Г., Гольцев А.Н.**

**Резюме.** В представленній роботі проаналізовано вплив різних режимів кріоконсервування на адгезивний потенціал фетальних нервових клітин 11 днів гестації (ФНК-11). Використані режими заморожування в різній ступені модифікують експансію молекул адгезії на ФНК 11. Низькотемпературне консервування розглядається як метод модифікації структурно-функціонального стану біоб'єкта.

**Ключові слова:** фетальні нервові клітини, кріоконсервування, адгезія.

**УДК 612.647.014.3.08:615.014.41**

### **АДГЕЗИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФЕТАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН ЯК КРИТЕРІЙ ЇХ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ПОВНОЦІННОСТІ**

**Порожан Є.О., Бабенко Н.М., Дубрава Т.Г., Гольцев А.М.**

**Резюме.** В представленній роботі проаналізовано вплив різних режимів кріоконсервування на адгезивний потенціал фетальних нервових клітин 11 днів гестації (ФНК-11). Використані режими заморожування по-різному модифікують експансію молекул адгезії на ФНК-11. Низькотемпературне консервування розглядається як метод модифікації структурно-функціонального стану біоб'єкту.

**Ключові слова:** фетальні нервові клітини, кріоконсервування, адгезія.

**UDC 612.647.014.3.08:615.014.41**

### **The Adhesive Potential Of Cryopreserved Fetal Neural Cells As A Criterion For Their Functional Usefulness**

**Porozhan Ye.A., Babenko N.N., Dubrava T.G., Goltsev A.N.**

**Summary.** In the present work an influence of different cryopreservation regimens on adhesive potential of fetal neural cells of the 11<sup>th</sup> day of gestation (FNC-11) was analyzed. Freezing regimes which are used in various ways modify the expansion of adhesion molecules on the FNC-11. Low-temperature preservation is seen as a method of modifying the structural and functional state of biological object.

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

Стаття надійшла 15.05.2012 р.

Рецензент – проф. Весніна Л.Е.