

Влияние факторов криоконсервирования на цитоморфологические и структурные характеристики фетальных нервных клеток

UDC 615.361.018.5.013.8.014.41:611.013.395.085.23

M.V. OSTANKOV, D.V. LEBEDINETS, E.A. POROZHAN, A.N. GOLTSEV*

Effect of Cryopreservation Factors on Cytomorphologic and Structural Characteristics of Fetal Nerve Cells

Представлены экспериментальные данные, полученные при сравнительной оценке влияния факторов криоконсервирования на сохранность и фенотипические характеристики фетальных нервных клеток (ФНК) 11 суток гестации. Показано, что криоконсервирование ФНК по разработанной программе обеспечивало высокую сохранность структурно-фенотипических характеристик ФНК. Более криоустойчивыми оказались нейро- и глиобласты с большим процентом сохранности при замораживании с 10% ДМСО. Эти данные коррелировали с показателями экспрессии в клетках нейроспецифических белков: нестина и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), а также одного из белков нейрофиламентов – β -тубулина. Так как нестин преимущественно является иммуноморфологическим маркером нейральных стволовых/прогениторных клеток, а GFAP “маркерным” белком клеток глии, можно считать, что выбранные режимы криоконсервирования могут быть использованы как “естественный” сортер, способствующий селекции нейральных стволовых/прогениторных или глиальных клеток.

Ключевые слова: криоконсервирование, криопротектор ДМСО, фетальные нервные клетки, нестин, GFAP, β -тубулин, пропидий йодид, МАТ, проточный цитофлуориметр.

Представлено експериментальні дані, одержані при порівняльній оцінці впливу факторів криоконсервування на схоронність і фенотипові характеристики фетальних нервових клітин (ФНК) 11 діб гестації. Показано, що криоконсервування ФНК за розробленою програмою забезпечувало високу схоронність структурних і фенотипових характеристик ФНК. Більш криостійкими виявилися нейро- і гліобласти з великим відсотком схоронності при заморожуванні з 10% ДМСО. Ці дані корелювали з показниками експресії в клітинах нейроспецифічних білків: нестину та гліально фібриллярного кислого білка (GFAP), а також одного з білків нейрофіламентів – β -тубуліну. Враховуючи, що нестин є імуноморфологічним маркером нейральних стовбурових/прогеніторних клітин, а GFAP “маркерним” білком клітин глії, можна вважати, що обрані режими криоконсервування можуть бути використані як “природний” сортер, який сприяє селекції нейральних стовбурових/прогеніторних або гліальних клітин.

Ключові слова: криоконсервування, криопротектор ДМСО, фетальні нервові клітини, нестин, GFAP, β -тубулін, пропідій йодид, МАТ, проточний цитофлуориметр.

The experimental data, obtained under comparative evaluation of the effect of cryopreservation factors on integrity and phenotypic characteristics of fetal nerve cells (FNCs) of 11 gestation days have been presented. It has been shown that FNC cryopreservation according to developed program provided the high integrity of structural-phenotypic characteristics of FNCs. Neuro- and glioblasts with higher percentage of integrity were more cryoresistant under freezing with 10% DMSO. These data correlated with the expression indices in cells of neurospecific proteins such as: nestin and glial fibrillar acid protein (GFAP) and also one of proteins of neurofilaments, β -tubulin. Whereas nestin is mainly immuno-morphological marker of neural stem/progenitor cells and GFAP is the “marker” protein of glial cells it is supposed that selected cryopreservation protocols may be used as a “natural” sorter, enabling the selection of neuronal stem/progenitor or glial cells.

Key words: cryopreservation, DMSO cryoprotectant, fetal nerve cells, nestin, GFAP, β -tubulin, propidium iodide, MAB, flow cytofluorimeter.

В настоящее время продукты фетоплацентарного комплекса применяются для лечения многих заболеваний и открыли новое направление в медицине, получившее название клеточная и тканевая терапия [2, 6, 8, 10, 20].

Применение трансплантации фетальных нервных клеток (ФНК) предусматривает низкотемпературное их консервирование и длительное хранение, обеспечивающее сохранность морфофунк-

Nowadays the products of fetoplacental complex have been used for the treatment of many diseases and proposed a new medical area called as cell and tissue therapy [2, 6, 8, 10, 20].

The application of transplantation of fetal nerve cells (FNCs) foresees their low temperature preservation and a long-term storage, providing the integrity of morpho-functional characteristics [3, 4, 17, 20]. The most important stage of preparing and successful FNC

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-57-91, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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 5791, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

циональных характеристик [3, 4, 17, 20]. Наиболее важный этап подготовки и успешного криоконсервирования ФНК, как и любого биологического объекта – выбор криопротектора, его концентрации и режима замораживания-оттаивания [18, 19, 21]. Успешное криоконсервирование и обеспечение сохранности морфофункциональных характеристик ФНК обуславливают перспективу и эффективность их использования в клинической практике и экспериментальных исследованиях [2, 7, 8, 10, 14, 20, 24].

Цель работы – исследовать влияние условий криоконсервирования на цитоморфологические и структурные характеристики ФНК.

Материалы и методы

Работа выполнена на 6-месячных крысах линии Вистар массой 160–180 г ($n = 12$) в соответствии с правилами «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985 г.).

Фетальные нервные клетки получали из мягких тканей головного мозга плодов крыс 11 суток гестации гомогенизацией в среде Хэнкса с добавлением цитрата натрия по методу [2]. После гомогенизации суспензию ФНК разливали по 2 мл в пробирки, добавляли криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) в 7 или 10%-й конечной концентрации, экспонировали 10 мин. Замораживание ФНК с 7 (Крио-1) или 10% (Крио-2) ДМСО осуществляли по программе: охлаждение со скоростью 1°C/мин до температуры -5°C , стабилизация 5 мин, охлаждение со скоростью 2°C/мин до -60°C с последующим погружением в жидкий азот. Для реализации данной программы использовали программный замораживатель УООП-6 производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины [3]. Суспензию клеток размораживали на водяной бане (41°C) в течение 50–60 с до исчезновения твердой фазы. Для удаления криопротектора клеточную суспензию разводили равным объемом среды 199 с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин.

До и после криоконсервирования оценивали следующие показатели ФНК-11: сохранность определяли с помощью 2%-го раствора витального красителя трипанового синего в световом микроскопе ЛОМО и окрашивания пропидий йодидом методом цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием программы CellQuest 3.1; морфологический состав исследовали на мазках, окрашенных азур-II эозином по Романовскому-Гимза [15] в световом микроскопе. Для выявления внутриклеточных белков (специфических маркеров промежуточных филаментов цитоскелета ФНК)

cryopreservation like any other biological object is the selection of cryoprotective agent, its concentration and freeze-thawing regimen [18, 19, 21]. Successful cryopreservation and providing the integrity of morpho-functional characteristics of FNCs provide perspective and efficiency of their using in clinical practice and experimental researches [2, 7, 8, 10, 14, 20, 24].

The research aim was to study the effect of cryopreservation conditions on cytomorphological and structural characteristics of FNCs.

Materials and methods

The research was carried out in 160–180 g Wistar rats ($n = 12$) aged 6 months according to the rules of “European convention about protection of vertebral animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

Fetal nerve cells were derived from brain soft tissues of rat fetuses of 11 gestation days by homogenization in the Hanks' medium with adding sodium citrate according to the method [2]. After homogenization the FNC suspension was transferred into 2 ml tubes, DMSO cryoprotectant of 7 and 10% final concentration was added and exposed for 10 min. FNC freezing with 7 (Cryo-1) and 10% (Cryo-2) DMSO was carried out according to the following program: cooling with 1°C/min rate down to -5°C , 5 min stabilization, cooling with 2°C/min rate down to -60°C with further plunging into liquid nitrogen. For performing this program the UOP-6 programmed freezer (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) was used [3]. Cell suspension was thawed on water bath (41°C) for 50–60 sec to dissolve the solid mass. For removal of cryoprotectant the cell suspension was diluted with equal volume of medium 199 with further centrifugation at 1500 rpm for 5 min.

Prior to and after cryopreservation the FNC-11 integrity was assessed with 2% Trypan blue vital dye using LOMO light microscope and with propidium iodide staining by means of cytofluorimetry (FACS Calibur, BD, USA) using the CellQuest 3.1 software; morphological composition of FNC-11 was studied in smears, stained with Azur-II – eosin by Romanovsky-Giemsa [15] using light microscope. To reveal intracellular proteins (specific markers of intermediate filaments of FNC cytoskeleton) there was performed a preliminary permeabilization of cells using the reagents Cytofix/Cytoperm and Perm/Wash Duffer (BD Pharmingen). To reveal the expressed antigens the cells were incubated with FITC-labeled monoclonal antibodies (MAB) (BD, USA) for 30 min at 37°C according to the method [9]. The amount of nestin⁺, GFAP⁺ and β -tubulin⁺ cells was assessed by the method of flow cytometry. Microphotos were obtained using digital

проводили предварительную пермеабиллизацию клеток с помощью реактивов Cytofix/Cytoperm и Perm/Wash Duffer фирмы BD Pharmingen. Для определения экспресс-антигенов клетки инкубировали с FITC-мечеными моноклональными антителами (МАТ) (BD, США) в течение 30 мин при 37°C по методу [9]. Количество нестин⁺, GFAP⁺ и β-тубулин⁺ – клеток оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Микрофотографии получены цифровой фотокамерой Canon Power Shot A640 в световом микроскопе Primo Star (Carl Zeiss, Германия).

Полученные результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента-Фишера с использованием программы Statistika 7.0.

Результаты и обсуждение

Исходное состояние биообъекта во многом определяет его устойчивость к действию физико-химических факторов криоконсервирования [12], в частности гиперконцентрированных растворов солей и внутриклеточной кристаллизации [22].

Ключевым фактором, определяющим сохранность нервной ткани при криоконсервировании, является изменение формы клеточной сомы в процессе гистогенеза, а следовательно и исходного уровня ФНК.

Анализ состояния нативных ФНК-11 (нФНК-11) показал, что уже на этапе выделения нервные клетки очень чувствительны к диссоциации. Их сохранность составляла при окрашивании трипановым синим $75,7 \pm 8,0\%$ и $71,0 \pm 6,8\%$ при использовании пропидий йодида. После криоконсервирования с 10% ДМСО показатели сохранности и количества ядросодержащих клеток были выше, чем с 7% (рис. 1).

При цитологическом исследовании ФНК-11 до и после криоконсервирования определяли морфологический состав клеток исходя из особенностей их структуры: величины клеточного тела, наличия ядрышка в ядре, количества и степени разветвленности отростков [2].

Установлено, что после диссоциации головного мозга плодов крыс нейроэпителиальные клетки составили $13,0 \pm 1,0\%$ от всех клеток в суспензии ФНК (рис. 2).

Эти клетки были больших размеров (22–24 мкм) с крупным округлым ядром, содержащим гетерохроматин, с 1–3 компактными ядрышками и узким ободком цитоплазмы (рис. 3, отм. 1). Около 50% составляли недифференцированные нейробласты, клетки округлой формы несколько меньших размеров (18–20 мкм), чем нейроэпителиальные клетки с узким ободком базофильной цитоплазмы, гиперхромным ядром и светлой перинуклеарной зоной (рис. 3, отм. 2). Недифференциро-

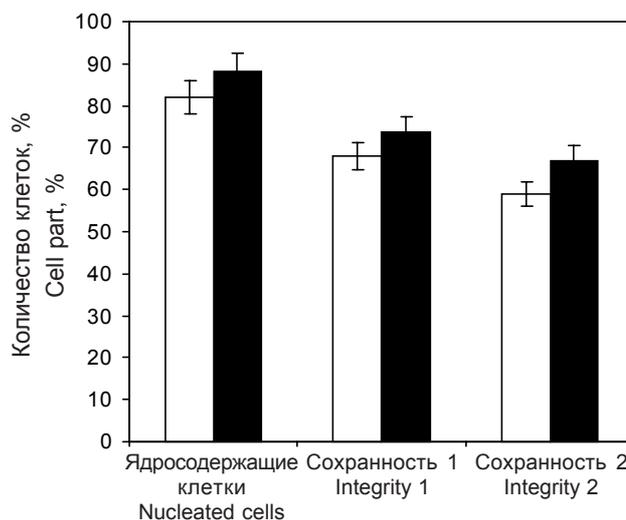


Рис. 1. Сохранность ФНК-11 после криоконсервирования: сохранность 1 – сохранность по исключению трипанового синего; сохранность 2 – сохранность по исключению пропидий йодида; □ – консервирование с 7% ДМСО; ■ – с 10% ДМСО. За 100% были приняты показатели нФНК-11.

Fig. 1. Integrity of FNC-11 after cryopreservation: □ – 7% DMSO; ■ – 10% DMSO; Integrity 1 – integrity by excluding trypan blue; Integrity 2 – integrity by excluding propidium iodide. nFNCs indices were assumed as 100%

camera Canon Power Shot A 640 and light microscope Primo Star (Carl Zeiss).

The results were statistically processed with Student-Fisher's test using the Statistika 7.0 software.

Results and discussion

Initial state of bioobject in many ways determines its resistance to the effect of cryopreservation physical and chemical factors [12] particularly of hyperconcentrated salines and intracellular crystallization [22].

The key factor, determining integrity of nerve tissue during cryopreservation is the change of cell soma shape during histogenesis and consequently initial level of FNC.

The analysis of the state of native FNCs of 11 gestation day (nFNC-11) has shown that even at the isolation stage nerve cells are very sensitive to dissociation. Their preservation rate made $75.7 \pm 8.0\%$ according to Trypan blue staining and $71.0 \pm 6.8\%$ when propidium iodide was used. After cryopreservation with 10% DMSO the integrity indices and those of nucleated cells were higher *versus* the ones with 7% DMSO (Fig. 1).

During cytological study of FNC-11 prior to and after cryopreservation the morphological composition of cells as for their structure: value of cell body, presence of nucleolus in nucleus, amount and degree of banishing rate of out-growings [2].

It has been established that after dissociation of rat's fetuses brain the neuroepithelial cells made $13.0 \pm 1.0\%$ of all the cells in FNC suspension (Fig. 2).

ванные глиобласты – мелкие клетки с гиперхромным ядром без ядрышка и с темной базофильной цитоплазмой (рис. 3, отм. 3) составляли $36,2 \pm 2,0\%$ (рис. 2). Нейроны составляли $0,87 \pm 0,02\%$. Это клетки с округлым или овальным телом, окруженным плотным нейропилем. В центре клеточного тела располагалось ядро округлой формы с темным ядрышком и одним коротким отростком (униполярный нейрон) [16] (рис. 3, отм. 4).

При анализе состава ФНК-11 после криоконсервирования было установлено, что наиболее лабильными оказались нейроэпителиальные клетки, количество которых при замораживании с 7% ДМСО снизилось с $13,0 \pm 1,0$ до $2,0 \pm 0,02\%$ (Крио-1) и до $4,4 \pm 1,0$ – с 10% ДМСО (Крио-2) (см. рис. 2). Немногочисленное для этого срока гестации количество созревающих нейронов сократилось вдвое ($0,87 \pm 0,02$ и $0,42 \pm 0,01\%$ соответственно) при замораживании с 10% и не обнаруживалось при замораживании с 7% ДМСО. Наиболее криоустойчивыми оказались недифференцированные глиобласты, относительное количество которых с 7% ДМСО увеличилось до $70,4 \pm 5,8\%$ и с 10% ДМСО до $57,8 \pm 2,0\%$. Такое перераспределение клеточных популяций в сторону значительного увеличения глиальных клеток свидетельствует о высокой их устойчивости к факторам криоконсервирования по сравнению с нейрональными (рис. 2), что соответствует данным [24].

Проведенные иммунологические исследования позволили получить качественные характеристики, свидетельствующие о сохранности фенотипических признаков криоконсервированных ФНК-11. Установлена прямая связь между сохранностью клеток (недифференцированные нейробласты и незрелые глиобласты) и количеством специфических белков промежуточных филаментов (нестин и GFAP) в них.

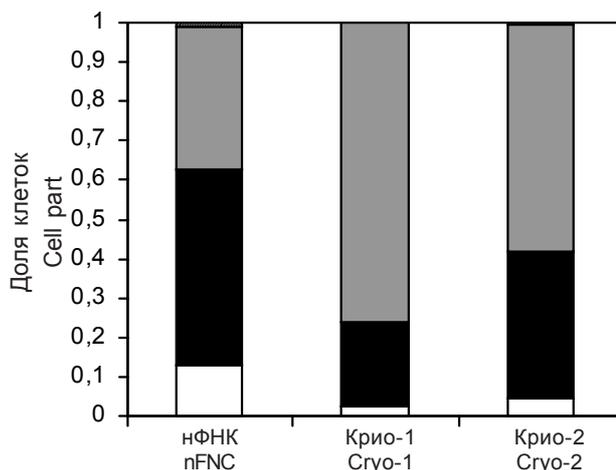


Рис. 2. клеточный состав ФНК-11 до и после криоконсервирования: □ – нейроэпителиальные клетки; ■ – недифференцированные нейробласты; ▒ – недифференцированные глиобласты; ▨ – нейроны.

Fig. 2. Cell composition of FNC-11 prior to and after cryopreservation: □ – Neuroepithelial cells; ■ – Non-differentiated neuroblasts; ▒ – Non-differentiated glioblasts; ▨ – Neurons.

These cells were of large sizes ($22\text{--}24\ \mu\text{m}$) with big rounded nucleus, containing heterochromatin with 1–3 compact nucleoli and narrow cytoplasm limb (Fig. 3, label 1). Close to 50% made non-differentiated neuroblasts being the rounded cells of sizes ($18\text{--}20\ \mu\text{m}$) smaller than neuroepithelial cells with narrow limb of basophilic cytoplasm, hyperchromic nucleus and light perinuclear zone (Fig. 3, label 2). Non-differentiated glioblasts (small cells with hyperchromic nucleus without nucleolus and with dark basophilic cytoplasm) made $36.2 \pm 2.0\%$ (Fig. 2). Neurons made $0.87 \pm 0.02\%$. These was cells with rounded and oval body, surrounded by solid neuropil, (Fig. 3, label 3). There was rounded nucleus with dark nucleolus and one short out-growing (unipolar neuron) in the center of cell body [16] (Fig. 3, label 4).

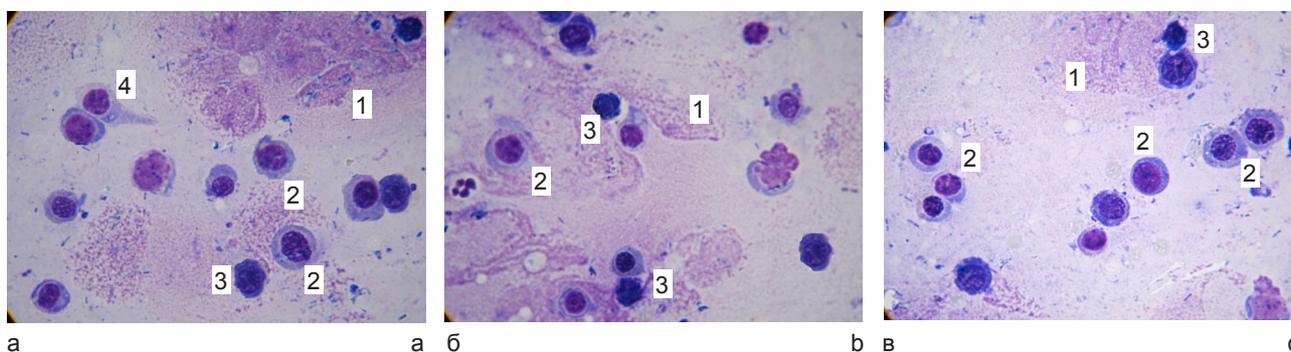


Рис. 3. Морфологический состав ФНК (окраска азур-II эозином, $\times 900$): а – нативные; б – криоконсервированные с 7% ДМСО; в – криоконсервированные с 10% ДМСО; 1 – нейроэпителиальная клетка; 2 – недифференцированный нейробласт; 3 – незрелый глиобласт; 4 – созревающий нейрон.

Fig. 3. Morphological composition of FNCs (azur-II eosin dye, $\times 900$): a – native; b – cryopreserved with 7% DMSO; c – cryopreserved with 10% DMSO; 1 – neuroepithelial cell; 2 – non-differentiated neuroblast; 3 – immature glioblast; 4 – maturing neuron.

Известно [1, 11], что нестин является иммуно-морфологическим маркером нейральных стволовых/прогениторных клеток, который активно экспрессируется в клетках головного мозга млекопитающих в эмбриональном онтогенезе и почти не экспрессируется у взрослых особей. По мере дифференцировки нервной ткани синтез нестина подавляется, а в дифференцирующихся клетках (астроцитах и нейронах) начинает экспрессироваться GFAP. Данный белок специфичен только для клеток центральной нервной системы, а в периферической нервной системе в физиологических условиях он не обнаруживается [16]. Синтез GFAP совпадает с периодом миелинизации и дифференцировкой астроцитов [11]. Глиальная локализация GFAP позволяет использовать его как “маркерный” белок для клеток глии, хотя его функция окончательно не исследована.

Полученные данные показали, что после криоконсервирования ФНК с 7% ДМСО (Крио-1) в суспензии действительно повышалась в 2 раза по сравнению с контролем концентрация клеток, экспрессирующих GFAP, белок, характерный для глиобластов [11]. В суспензии ФНК, криоконсервированных под защитой 10% ДМСО, концентрация GFAP⁺-клеток существенно не изменялась по сравнению с нативным контролем, однако отмечалось повышение почти в 2 раза концентрации нестин⁺-клеток (рис. 4). Было проведено исследование влияния факторов криоконсервирования на белок β-тубулина, являющийся также кислым

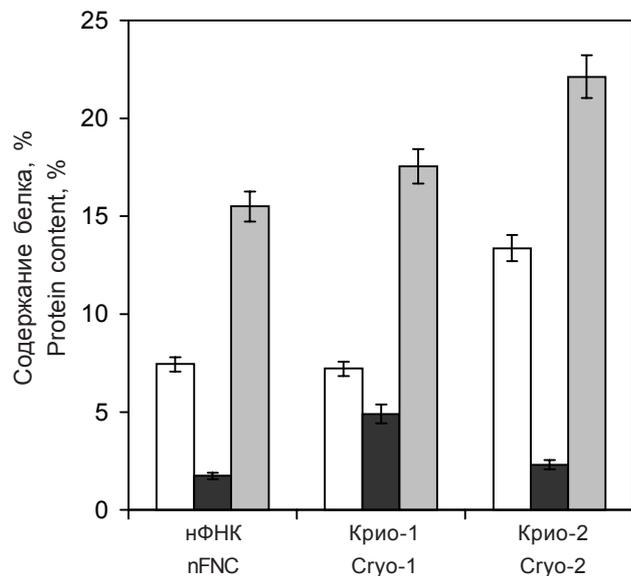


Рис. 4. Содержание нейро- и неспецифических белков ФНК-11 до и после криоконсервирования: □ – нестин; ■ – GFAP; ▒ – β-тубулина.

Fig. 4. Content of neuro- and non-specific proteins FNCs-11 prior to and after cryopreservation: □ – Nestin; ■ – GFAP; ▒ – β-tubulin

During analysis of FNC-11 composition after cryopreservation it was established that the most labile were the neuroepithelial cells, number of which during freezing with 7% DMSO reduced from 13.0 ± 1.0 down to $2.0 \pm 0.02\%$ (Cryo-1) and down to 4.4 ± 1.0 with 10% DMSO (Cryo-2) (see Fig. 2). The number of maturing neurons not numerous for this gestation period was reduced twice (0.87 ± 0.02 and $0.42 \pm 0.01\%$ accordingly) during freezing with 10% and was not revealed with 7% DMSO. The most cryoresistant were the non-differentiated glioblasts, which relative number with 7% DMSO increased up to $70.4 \pm 5.8\%$ and with 10% DMSO up to $57.8 \pm 2.0\%$. This distribution of cell populations to significant increase of glial cells testifies to their high resistance to cryopreservation factors if compared with neuronal ones (Fig. 2) that corresponds to the published data [24].

The carried out immunological researches enabled to obtain the qualitative characteristics testifying to the integrity of phenotypic characters of cryopreserved FNC-11. It has been established the direct relationship between cell integrity (non-differentiated neuroblasts and immature glioblasts) and the number of specific proteins of intermediate filaments (nestin and GFAP) in them.

Nestin is known as a immunological marker of neuronal stem/progenitor cells, actively expressed in mammalian brain cells during embryonic ontogenesis and negligibly expressed in adults. While differentiation of nerve tissue the nestin synthesis is suppressed, but in non-differentiated cells (astrocytes and neurons) GFAP starts to be expressed. This protein is specific only for central nervous system cells, but in peripheral nervous system under physiological conditions is not found [16]. GFAP synthesis coincides with period of myelination and differentiation of astrocytes [11].

Glial localization of GFAP enables the use it as “marker” protein for glia cells, though its function has not been completely studied.

Our findings have shown that after cryopreservation of FNCs with 7% DMSO (Cryo-1) there was actually twice (versus the control) increased the concentration of the cells expressing GFAP, protein characteristic for glioblasts in the suspension [11]. In the suspension of FNCs cryopreserved under protection of 10% DMSO the concentration of GFAP⁺ cells significantly did not change if compared with the native control, however there was found a duplication of the concentration of nestin⁺ cells (Fig. 4). There was studied the effect of the cryopreservation factors on β-tubulin protein, being also acid protein, comprising about 20% glutamine and asparagine acids. Neurotubulin has phosphokinase and protein kinase activity and along with γ-protein participates in the assembling of microtubules of neuron cytoskeleton, forming cross-linking [11]. Microtubules, built from α- and β-tubulins imple-

белком, в составе которого содержится около 20% глутаминовой и аспарагиновой кислот. Нейротубулин обладает фосфокиназной и протеинкиназной активностью и вместе с τ -белком участвует в “сборке” микротрубочек цитоскелета нейронов, образуя поперечные шивки [11]. Построенные из α - и β -тубулинов микротрубочки осуществляют внутриклеточный аксонный транспорт. Показано, что тубулины не обладают специфичностью и в эволюционном плане они относительно стабильные белки [11]. Тем не менее после криоконсервирования ФНК-11 с 10% ДМСО количество клеток, в которых МАТ были способны его идентифицировать с рецептором, повышалось в 1,5 раза по сравнению с интактным контролем (рис. 4).

Выводы

Установлено, что криоконсервированные по выбранным программам ФНК сохраняют структурные и фенотипические характеристики. Вместе с тем очевидно, что режимы Крио-1 и Крио-2 обладают различной “тропностью” в отношении субпопуляционного состава ФНК-11. Результаты морфологического анализа показали, что Крио-1 (7% ДМСО) в большей степени обеспечивает сохранность незрелых глиобластов, тогда как при Крио-2 (10% ДМСО) более криоустойчивыми оказались недифференцированные нейробласты. Эти данные коррелировали с показателями экспрессии нейроспецифических белков нестина и GFAP, а также неспецифического белка нейрофиламентов – β -тубулина. Поскольку нестин – иммуноморфологический маркер нейральных стволовых/прогениторных клеток, а локализация GFAP в клетках микроглии также является маркерным белком астроцитов, можно считать выбранные режимы криоконсервирования “естественным сортером” – модификатором, селективно обеспечивающим преимущество нейральных стволовых/прогениторных или глиальных клеток.

Литература

1. Гиларов А.В. Нестин в клетках центральной нервной системы // Морфология.– 2007.–Т. 131, №1.– С. 85–90.
2. Гольцев А.М., Бабенко Н.М., Останкова Л.В. и др. Застосування криоконсервованих продуктів ембріофетоплацентарного комплексу (ПЕФПК) як коректорів аутоімунних захворювань на моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 207–209.
3. Гольцев А.М., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1.– С. 46–50.
4. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Останкова Л.В. и др. Особенности влияния криоконсервирования на функциональ-

ment intracellular axon transport. It has been shown that tubulins have no specificity and evolutionally they are quite stable proteins [11]. Nevertheless after cryopreservation of FNCs-11 with 10% DMSO the number of cells, wherein AMT were able to identify it with the receptor, increased in 1.5 times if compared with intact control (Fig. 4).

Conclusions

FNCs cryopreserved according to the selected protocols have been established to preserve structural and phenotypic characteristics. Along with this it is evident that regimens Cryo-1 and Cryo-2 have different “tropicity” in respect of sub-populational composition of FNCs-11. The results of morphological analysis have shown that Cryo-1 (7% DMSO) in a greater extent provides the preservation of immature glioblasts, meanwhile at Cryo-2 (10% DMSO) non-differentiated neuroblast occurred to be more cryoresistant. These data correlated with the expression indices of neurospecific proteins of nestin and GFAP, as well as nonspecific protein of neurofilaments, β -tubulin. Since nestin is an immune morphological marker of neural/progenitor cells, and GFAP localization in microglia cells is a marker protein of astrocytes, one may consider the chosen cryopreservation protocols as “natural sorter”, *i. e.* modifier, selectively providing the advantage of neural stem/progenitor or glial cells.

References

1. Gilyarov A.V. Nestin in cells of central nervous system// Morphologiya.– 2007.– Vol. 131, N1.– P. 85–90.
2. Goltsev A.M., Babenko N.M., Ostankova L.V. et al. Application of cryopreserved products of embryofetoplacental complex (PEFPC) as the correcting agents of autoimmune diseases in model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE)// Transplantologiya.– 2003.– Vol. 4, N1.– P. 207–209.
3. Goltsev A.N., Gurina T.M., Babenko N.N. 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., Ostankova L.V. Peculiarities of cryopreservation effect on functional potential of fetal liver hemopoietic stem cells of various gestation terms// Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N2.– P. 186–199.
5. Gosheva A.E., Buravlev V.M. Culturing of human and animal nerve tissue and its use when studying some diseases of central nervous system // Zhurn. Nevropatologii i Psikhatrii im. S.S. Korsakova.– 1972.– Vol. 72, Issue 7.– P. 1091–1097.
6. Grischenko V.I. The role of cryobiology in creation of biotechnologies for cellular and tissue transplantation// Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 7–9.
7. Grischenko V.I., Goltsev A.M. Modification of lympho-hemopoietic state of organism when using the products of fetoplacental complex // Transplantologiya.– 2001.– Vol. 2, N1.– P. 32–42.
8. Grischenko V.I., Sandomirsky B.P. Conception of cell therapy // Problems of Cryobiology.– 2000.– N1.– P. 3–7.
9. Immunology: Laboratory Manual// E.U. Paster, V.V. Ovod, V.K. Pozur, N.E. Vyhot.– Kiev: Vysscha shkola, 1989.– 304 p.

- ный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации // Пробл. криобиологии.– 2009.– Т. 19, №2.– С.186–199.
5. *Гошева А.Е., Буравлев В.М.* Культивирование нервной ткани человека и животных и использование ее при изучении некоторых заболеваний центральной нервной системы // Журн. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.– 1972.– Т. 72, Вып. 7.– С. 1091–1097.
 6. *Грищенко В.И.* Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С.7–9.
 7. *Грищенко В.И., Гольцев А.М.* Модифікація стану лімфогемопоетичного комплексу організму в умовах застосування продуктів фетоплацентарного комплексу // Трансплантологія.– 2001.– Т. 2, №1.– С. 32–42.
 8. *Грищенко В.И., Сандомирский Б.П.* Концепция клеточной терапии // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 3–7.
 9. *Иммунология. Практикум* / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть.– Киев: Вища школа, 1989.– 304 с.
 10. *Кріоконсервування ембріональної нервової тканини для клінічного використання: Методичні рекомендації* / В.І. Грищенко, О.С. Снурніков, О.Ю.Петренко.– Харків, 1999.– 21 с.
 11. *Коржевский Д.Э., Гиляров А.В, Кирик О.В.* Белки промежуточных филаментов в клетках нервной ткани // Морфология.– 2008.– Т. 133, №2.– С. 66–70.
 12. *Кріоконсервування клітинних суспензій* / Под ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук, думка, 1983.– 240 с.
 13. *Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник* / Под ред. В.В. Миньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 365 с.
 14. *Лебединец Д.В., Гольцев А.Н.* Кріоконсервовані ембріональні нервові клітини в терапії гострого періоду ішемічного інсульту // Пробл. криобиологии.– 2008.– Т. 18, №1.– С. 27–33.
 15. *Меркулов Г.А.* Курс патологоанатомической техники.– Л.: Медгиз, 1980.– 340 с.
 16. *Улумбеков Э.Г., Челышев Ю.А.* Гистология (введение в патологию).– М.: ГЭОТАР, 2007.– 947 с.
 17. *Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И.* Кріоконсервування для створення банку клітин: сучасні концепції на рубежі ХХІ століття // Пробл. криобиологии.– 2003.– №2.– С. 62–83.
 18. *Cai R.S., Xue D.L., Jiang X.H.* Cryopreservation and culture of the human fetal brain tissues // J. Tongji Med. Univ.– 1993.– Vol.13, N3.– P. 138–142.
 19. *Collier T.J., Gallagher M.J., Sladek C.D.* Cryopreservation and storage of embryonic rat mesencephalic dopamine neurons for one year: comparison to fresh tissue in culture and neural grafts // Brain Res.– 1993.– Vol. 623, N2.– P. 249–256.
 20. *Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirov 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.
 21. *Fang J., Zhang Z.X.* Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 267–273.
 22. *Mazur P.* Freezing of living cells: mechanism and implication // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol. 247, N3, Pt. 1.– P. 125–142.
 23. *Nebe-von-Caron G., Stephens P.J., Hewitt C.J. et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting // J. Microbiol. Methods.– 2000.– Vol. 42, N4.– P. 97–114.
 24. *Redmond D.E.Jr., Naftolin F., Collier T.J. et al.* Cryopreservation, culture and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into monkeys // Science.– 1988.– Vol. 242, N4879.– P. 768–771.
 10. *Cryopreservation of embryonic nerve tissue for clinical using: Methodical recommendations*/ V.I. Grischenko, O.S. Snurnikov, O.Yu. Petrenko.– Kharkov, 1999.– 21 p.
 11. *Korzhevskiy D.E., Gilyarov A.V., Kirik O.V.* Proteins of intermediate filaments in nerve tissue cells // Morphologiya.– 2008.– Vol. 133, N2.– P.66-70.
 12. *Cryopreservation of cell suspensions*/ Ed. by A.A. Tsutsaeva.– Kiev: Naukova Dumka, 1983.– 240 p.
 13. *Laboratory methods of investigations in clinic.* Reference book / Ed. by V.V. Menshikov.– Moscow: Meditsina, 1987.– 365 p.
 14. *Lebedinets D.V., Goltsev A.N.* Cryopreserved embryonic nerve cells in therapy of ischemic insult period// Problems of Cryobiology.– 2008.– Vol. 18, N1.– P. 27–33.
 15. *Merkulov G.A.* Course of pathoanatomical technique.– Leninograd: Medgiz, 1980.– 340 p.
 16. *Ulumbekov E.G., Chelyshev Yu.A.* Histology (introduction into pathology).– Moscow: GEOTAR, 2007.– 947 p.
 17. *Fuller B., Green C., Grischenko V.I.* Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century // Problems of Cryobiology.– 2003.– N2.– P. 62–83.
 18. *Cai R.S., Xue D.L., Jiang X.H.* Cryopreservation and culture of the human fetal brain tissues // J. Tongji Med. Univ.– 1993.– Vol.13, N3.– P. 138–142.
 19. *Collier T.J., Gallagher M.J., Sladek C.D.* Cryopreservation and storage of embryonic rat mesencephalic dopamine neurons for one year: comparison to fresh tissue in culture and neural grafts // Brain Res.– 1993.– Vol. 623, N2.– P. 249–256.
 20. *Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirov 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.
 21. *Fang J., Zhang Z.X.* Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N2.– P. 267–273.
 22. *Mazur P.* Freezing of living cells: mechanism and implication // Am. J. Physiol.– 1984.– Vol. 247, N3, Pt. 1.– P. 125–142.
 23. *Nebe-von-Caron G., Stephens P.J., Hewitt C.J. et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting // J. Microbiol. Methods.– 2000.– Vol. 42, N4.– P. 97–114.
 24. *Redmond D.E.Jr., Naftolin F., Collier T.J. et al.* Cryopreservation, culture and transplantation of human fetal mesencephalic tissue into monkeys // Science.– 1988.– Vol. 242, N4879.– P. 768–771.

Accepted in 10.11.2009

Поступила 10.11.2009
Рецензент Н.А. Волкова