

Использование методов криоконсервации при сохранении нейральных и нервных клеток с целью культивирования и трансплантации

Use of cryopreservation techniques while preserving neural stem cells and nerve cells for cultivation and transplantation

Нохова А.Р.

Студент, Кафедра микробиологии, иммунологии и общей биологии, Челябинский государственный университет, г. Челябинск
e-mail: Alina-nohova@mail.ru

Nokhova A.R.

Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk
e-mail: Alina-nohova@mail.ru

Аннотация

В данной статье проанализированы различные аспекты культивирования и криоконсервации нервной ткани человека, крыс и моллюсков. Разобраны достоинства и недостатки применения методов низкотемпературного хранения клеток в клинической практике и в научных исследованиях. Кроме того, рассмотрены известные на данный момент источники нейральных стволовых клеток. Представлены обзорные сведения об известных методах культивирования, криоконсервации нервной ткани и их эмпирических модификациях на сегодняшний день. Также в данном обзоре сопоставлены различные условия реализации низкотемпературного хранения и жизнеспособность клеток после оттаивания. Показано селективное влияние определенных методик криоконсервации на сохранность нейральных и нервных клеток.

Ключевые слова: витрификация нервной ткани, криоконсервирование нервной ткани, замораживание нервной ткани, нейральные стволовые клетки.

Abstract

In this article we analyzed various aspects of the cultivation and cryopreservation of human nervous tissue, rats and mollusks. The advantages and disadvantages of using the methods of low-temperature cell storage in clinical practice and in scientific research are provided. Also, the currently known sources of neural stem cells are reviewed and the overviews of the known methods of cultivation, cryopreservation of nervous tissue and their empirical modifications to date are presented. In addition, various conditions for the implementation of low-temperature storage and cell viability after thawing are compared and the selective effect of certain cryopreservation techniques on the safety of neural and nerve cells is shown.

Keywords: vitrification of nerve tissue; cryopreservation of nerve tissue; nerve tissue freezing; neural stem cells.

Введение

В настоящее время активно развивается такая область медицины как клеточная и тканевая терапия. Данные методы получили широкое распространение в последнее десятилетие, благодаря активному развитию и усовершенствованию биотехнологических процессов. Успешность применения клеточных технологий в клинической практике обусловлена наличием в трансплантате стволовых клеток, способных к дифференцировке, а также продукцией ими биологически активных веществ, способных влиять на метаболические процессы на молекулярном уровне.

Данные методы экспериментально применяются при лечении нейродегенеративных заболеваний. В качестве вводимого материала (трансплантата) используются нейральные стволовые и нервные клетки.

Один из важнейших этапов клеточной трансплантологии это культивирование (процесс выращивания клеток *in vitro*). Для каждого типа тканевой культуры или целых органов разрабатываются собственные протоколы культивирования, подобранные эмпирически. Нервная ткань из-за гетерогенного состава менее успешно поддается культивированию, однако результативные методики созданы и для нее.

Еще одним из этапов биотехнологического процесса применения клеточной терапии может являться метод низкотемпературного хранения биообъектов – **криоконсервация**. Криоконсервация позволяет уменьшить расходы клеток, расширяет возможности для использования донорского материала, а также применяется для научных целей. Существенный недостаток данного метода – влияние на жизнеспособность клеток (их механическая травматизация, токсический эффект, изменение метаболической активности). Из-за того, что криоконсервация оказывает многосторонний эффект на клетки важно установление наиболее оптимальных условий процедуры для обеспечения сохранности клеток.

Нейральные стволовые клетки и их источники

В двадцатом столетии считалось, что нервные клетки не способны делиться в постнатальном периоде. Впервые описал пролиферацию нейронов в зрелом мозге Джохева Альтман в 1962 [1]. Это было воспринято скептически. Позже Р. Eriksson и соавторы продемонстрировали образование новых нейронов в гиппокампе взрослого человека [2]. В дальнейшем сведения о пролиферации нейронов в постнатальном периоде только накапливались.

Возможность клеточного деления во взрослом мозге объясняется наличием резидентных стволовых клеток, которые являются полипотентными и способны образовывать нейроны, астроциты и олигодендроциты. Новообразование нейронов во взрослом мозге происходит в двух регионах: субгранулярной зоне гиппокампа и субэпендиме боковых желудочков в пределах так называемых «нейрогенных ниш». Нейральные стволовые клетки проходят несколько стадий: исходная нейральная стволовая клетка → транзиторный прогенитор → нейробласт → зрелый нейрон. Такая трансформация сопровождается не только пролиферацией, но и апоптозом новых клеток для обеспечения процесса селекции [3].

Число новых нейронов, образующихся ежемесячно, составляет 6% от общей популяции гранулярных клеток. Эти расчеты были проведены на основании экспериментов Н. Cameron и соавторов, которые впервые использовали высокие дозы BrdU [4].

Культивирование нейральных клеток

Для культивирования нервных клеток разработаны различные протоколы. Нервные клетки являются требовательными в выборе субстрата при культивировании.

Одна из схем культивирования, предложенная для монослойной культуры нейронов мозжечка Bernt Engelsten и Rolf Bjerkvig, Department of Cell Biology and Anatomy, University of Bergen, Zrstadveien 19, N-5009 Bergen, Norway, будет рассмотрена ниже.

Кусочки ткани, полученные из мозжечка 7-8 дневных крыс, трипсинизируют. В дальнейшем для ингибирования действия трипсина используют ростовую среду. Центрифугируют для получения суспензии клеток, сеют клетки на ростовой среде. Через 2-4 дня инкубируют культуру с добавлением арабинозида цитозина, чтобы предупредить рост не-нейрональных клеток. В качестве культуральной среды взята среда DMEM с добавками (глюкоза, L-глутамин, KCl, инсулин, р-аминиобензойная кислота, гентамицин, термоинактивированная фетальная сыворотка теленка). Суспензия единичных клеток может быть получена механическим продавливанием через нейлоновые сита или последовательной трипсинизацией. Для идентификации нейронов могут быть использованы нейронспецифические антитела к эналазе или тетанус-токсин [5].

В 2002 г. Репиным В.С. и соавторами была предложена схема культивирования для приготовления биотрансплантата с целью аллопересадки. Использовали фетальный абортный материал, полученный при искусственном прерывании беременности у женщин. Ткань головного мозга эмбрионов человека суспендировали, культивировали 12–16 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в бессывороточной среде. Культивирование проводили на среде DMEM/F12 (1:1)+N2 (Gibco BRL, USA) в присутствии ростовых факторов [6].

Также были получены успешные результаты при добавлении в бессывороточную среду DMEM фетальной бычьей сыворотки при культивировании нервной ткани больных эпилепсией [7]. Кроме того, при добавлении к культивируемым нейронам человека ретинола ацетата происходит стимуляция пролиферации клеток-предшественниц [8].

Методы криоконсервации нервных тканей и нейральных клеток

В настоящее время в медицине успешно применяется низкотемпературное хранение однородных суспензий клеток с возможностью восстановления их биологических функций после оттаивания. Однако ткани, в том числе нервная, плохо переносят криоконсервацию, а для целых органов методы криоконсервации пока не разработаны [9].

Криоконсервирование – способ сохранения жизнеспособного состояния биообъектов при температуре ниже 120°C. Криоконсервирование включает в себя ряд циклов, которые направлены на сохранение свойств и жизнеспособности биоструктур после размораживания – отогрева. К ним относятся: отбор клеток, подготовка к замораживанию (охлаждение и эквilibрация в защитных средах), замораживание, хранение, отогрев и восстановление [10].

На сегодняшний день существует две основные стратегии криоконсервации: медленная заморозка и витрификация. Одним из условий успешной криоконсервации является добавление криопротектора. **Витрификация** – форма быстрой заморозки, применяющая очень высокие концентрации криопротектора, в результате чего происходит отвердевание без формирования кристаллов льда.

Многочисленные протоколы замораживания различаются применением проникающих (**интрацеллюлярных**) и непроникающих (**экстрацеллюлярных**) **криопротекторов**, а также скоростью заморозки и разморозки.

Подготовка к замораживанию. Биоматериалы могут быть эквilibрированы в различных и сложных криоконсервантах, содержащих несколько видов криопротекторов и различные мембранные стабилизаторы, ингибиторы метаболизма и т.д. [10]. Применение сильных, проникающих в клетку криопротекторов ограничено их токсичностью. Поэтому обычно используют смеси криозащитных растворов, так как в них токсичность одного из веществ снижается за счет присутствия другого [11]. Кроме того, сам процесс добавления криопротектора может вызывать повреждения в клетках из-за осмотического шока, поэтому данный этап требует постепенного прибавления криозащитного раствора.

Перед замораживанием чаще всего биоматериалы предварительно охлаждают. Затем производится сам процесс замораживания по определенной программе (медленные, быстрые или многоступенчатые режимы). Когда скорость охлаждения изменяется в различных температурных зонах, осуществляются температурные остановки, при необходимости – искусственная инициация кристаллизации [10].

Хранение. Наиболее надежно замороженные биоматериалы могут храниться при температуре, близкой к -196°C (жидкий азот), при которой подавляются метаболические и биофизические процессы. Сухой лед (-80°C) или механические морозильные камеры (-80°C) пригодны для хранения в масштабах месяцев, но при этих температурах могут происходить некоторые биохимические изменения [12].

Размораживание проводится с привлечением в основном метода теплопроводности (нагрев в водяной бане) и реже – метода СВЧ [10]. Размораживание следует проводить как можно быстрее. Микроволновое нагревание, как правило, не используется, поскольку теплая вода имеет тенденцию поглощать больше микроволнового излучения и, следовательно, становится еще теплее, что приводит к локальному появлению горячих точек. Лучший способ оттаивания – это погружение в водяную баню при 37°C [12].

Если мембраны клеток после размораживания оказываются сильно поврежденными, то часто применяют восстанавливающие среды, которые содержат биологически активные соединения, активирующие биоэнергетический цикл клеток. Это стабилизаторы мембран и соединения, подавляющие перекисное окисление липидов и аутолиз клетки [10].

Определение жизнеспособности клеток в зависимости от условий криоконсервации

Важным этапом процесса криоконсервирования клеток является оценка жизнеспособности после размораживания. Для этого применяют морфологические, электрофизиологические, биохимические и другие методы.

В работах по криоконсервации нервных клеток используются разные условия культивирования, замораживания, оттаивания и восстановления с последующим анализом жизнеспособности клеток. Однако можно выделить следующие сходства в методиках: в качестве криопротекторных агентов используются ДМСО или глицерин, криоконсервация проводится в парах жидкого азота, оттаивание на водяной бане, инкубирование в физиологическом растворе для восстановления метаболической активности.

О жизнеспособности нейронов после криоконсервации можно судить по сохранению их изначальной морфологии и ультраструктурной организации, электрической активности, синтетической (функциональной) активности,

поведению клеток в культуре ткани *in vitro*. Для оценки этих параметров используют следующие методы: световая и электронная микроскопия [13,14], проточная цитофлуорометрия [15], люминесцентная микроскопия [13], витальное окрашивание [14], метод микроэлектродного отведения [13,14], культивирование *in vitro* [13] и др.

Для анализа сохранности криоконсервированных нейронов ниже будут рассмотрены эксперименты по криоконсервации ганглиев *Lymnaea stagnalis L.*, проводившиеся при следующих условиях: замораживание в парах жидкого азота до -196°C со скоростью $380\text{--}450^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, криопротектор ДМСО 1,8-2,1 М, оттаивание на водяной бане при $22\text{--}24^{\circ}\text{C}$ со скоростью $380\text{--}500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, физиологический раствор (мМ): 80 NaCl, 1,6 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 7,5 рН (инкубация $4\text{--}6^{\circ}\text{C}$ до 15–18 ч, но не менее 1,5-2 ч) [13, 14].

В работах по криоконсервации ганглиев прудовика установлено, что функциональная активность оттаивших нейронов восстанавливается через 5-8 часов до исходного значения после инкубации в физиологическом растворе [9,13]. При проверке электрической активности показано, что сразу после размораживания и отмывания криозащитного раствора нейроны имеют низкое значение мембранного потенциала (МП) и не генерируют потенциал действия (ПД). После нескольких часов инкубации в физиологическом растворе значения МП и ПД восстанавливались до контрольных значений [13]. Поведение криоконсервированных нейронов в культуре *in vitro* характеризуется адгезией к подложке, интенсивным ветвлением отростков и образованием контактов между ними, сохранением регенераторной способности [14]. У нейронов сохраняется рецепторная активность (регистрация ответов на аппликацию серотонина). Однако синаптических связей между нейронами, локализованными в разных ганглиях, обнаружено не было [9]. Срок жизни культуры 10-11 суток, что сравнимо со сроком жизни нативной культуры [13].

Таким образом, можно сделать вывод, что криоконсервированные нейроны сохраняют жизнеспособность, восстанавливают структуру и электрическую активность при соблюдении вышеперечисленных условий замораживания. Однако функциональные связи между нейронами разных ганглиев не восстанавливаются.

В экспериментах по криоконсервации ганглиев мозга взрослого моллюска *Lymnaea stagnalis L.* было показано, что одним из условий успешного криоконсервирования является наличие криопротекторного агента – ДМСО (2М) [13,14]. Было установлено, что при концентрации ДМСО равной 1М и 3М нейроны после криоконсервации обладали малой сохранностью (38 и 3% соответственно при $p < 0,001$), в то время как при концентрации ДМСО в 2М живыми оставались 78% нейронов при $p < 0,001$ [14]. Однако в работе по криоконсервации нервной ткани человека сообщается о достижении лучших результатов при концентрации ДМСО в 8% (1,13М) из протестированных трех: 6% (0,85М), 8% (1,13М) и 10% (1,41М) [7].

В исследовании по витрификации срезов гиппокампа крыс сообщается о серьезных структурных повреждениях клеток при замораживании до -79°C с использованием 10% глицерина в качестве криопротектора. Также авторами было установлено, что после замораживания до -79°C с использованием 30% глицерина, более 50% клеток не восстанавливают исходное соотношение K^+/Na^+ , которое является важным условием нормального функционирования. Однако замораживание до -130°C с использованием в качестве витрифицирующего раствора VM3 (22.3% ДМСО, 12.86% формамид, 16.84% этиленгликоль, 7% поливинилпирролидон K12, 1% “Supercool X-1000”, 1% “Supercool Z-1000”)

дало хорошие результаты с восстановлением соотношения K^+/Na^+ более чем у 90% клеток.

Следовательно, использование VM3 в качестве криопротектора дает результаты лучше, чем использование раствора глицерина. Также в исследовании сообщается о протекторном действии аскорбиновой кислоты в концентрации 0,8 мМ при добавлении в среду для отмывания [16].

В экспериментах по криоконсервации фетальных нервных клеток наиболее успешными режимами криоконсервации оказались следующие совокупности условий: 1. ДМСО 7% (экспозиция 10 мин при 4°C), охлаждение со скоростью 1 °C /мин до -5°C с последующей инициацией кристаллообразования, затем охлаждение со скоростью 2 °C /мин до -60°C и погружение в жидкий азот; 2. ДМСО 10% (экспозиция 10 мин при 4°C), охлаждение со скоростью 1 °C /мин до -9°C, остановка в течение 10 мин, затем охлаждение со скоростью 1 °C /мин до -25°C, 10 °C /мин до -60°C и погружение в жидкий азот. В обоих случаях отогревание проводилось на водяной бане 37°C в течение 50 с; для отмывания использовался раствор Хенкса. Сохранность клеток составила $72,8 \pm 6,1\%$ и $78,7 \pm 1,9\%$ при $p < 0,05$ (метод суправитального окрашивания трипановым синим) соответственно режимам 1 и 2 [15].

Из вышеописанного следует, что для фетальных нервных клеток более медленный режим замораживания в совокупности с большей концентрацией криопротектора ведут к большей доли сохранных клеток.

Заключение

Таким образом, можно еще раз подчеркнуть, что криоконсервация нервных клеток является перспективным методом как в клинической практике, так и в научных исследованиях. Разные условия замораживания обуславливают различия в сохранности клеток. В большинстве случаев производится культивирование выделенного биообъекта в среде DMEM с добавками, затем ткань подвергается воздействию криопротекторного раствора (чаще всего ДМСО), охлаждается в парах жидкого азота и хранится неограниченное время. При оттаивании применяется водяная баня с последующим отмыванием криопротектора и помещением биообъекта в физиологический раствор. Существующие протоколы позволяют получать жизнеспособные нейроны, но требуют доработок для увеличения выхода сохранных клеток.

Литература

1. Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? [Text] / J. Altman // Science - 1962. - №135. - Pp. 1127-1128.
2. Eriksson, P. S. Neurogenesis in the adult human hippocampus [Text] / P.S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, F.N. Gage // Nat Med. - 1998. - №4. - Pp. 1313-1317.
3. Гомазков О.А. Нейрогенез как адаптивная функция мозга [Текст] / О.А. Гомазков – М.: НИИ биомедицинской химии, 2014. – 85 с.
4. Cameron H.A, McKay R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus [Text] / H.A. Cameron, R.D. McKay // J Comp Neurol. – 2001. № 435. – Pp. 406-417.
5. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток : практическое руководство [Текст] / Р.Я. Фрешни. – пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
6. Ретин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Патент РФ № 2001134051/14, 20.10.2002.. Культура нервных стволовых клеток, биотрансплантат для аллопересадки и способ его приготовления // Патент России № 2191388. 2002. Бюл. № 29.

7. Cryopreservation of human brain tissue allowing timely production of viable adult human brain cells for autologous transplantation [Text] / J-F. Brunet, L. Pellerin, P. Magistretti, J-G. Villemure // *Cryobiology*. – 2003. №47. – Pp. 179-183.
8. Длительное культивирование *in vitro* криоконсервированных и нативных нейроцитов эмбрионов человека [Текст] / Ю.А. Зозуля, Н.И. Лисяный, Л.Д. Любич [и др.] // Украинский нейрохирургический журнал. – 2003. №2. – С. 11-14.
9. *Ивличева Н.А., Чистопольский И.А, Крамарова Л.И., Гахова Э.Н.* Электрофизиологическая активность мозга моллюска *Lymnaea Stagnalis L.* после криоконсервации в жидком азоте (-196°C) [Текст] // Биологические мембраны. – 2014. Т.5, №5. – С. 342–351.
10. *Белоус А.М.* Криобиология : монография [Текст] / А.М. Белоус, Грищенко В.И. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
11. *Егорова, Т.А.* Основы биотехнологии: учебное пособие [Текст] / Т.А. Егорова, Е.А. Живухина – М. : Академия, 2003 – 208 с.
12. Procedures for Cryopreserving Cells // *Cryobiology – A Short Course* [Website] / K. Muldrew, E. McGann. – URL: https://web.archive.org/web/20090929120818/http://www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo_course/cryo_chap8_3.html (Accessed: 20.09.2019).
13. *Дмитриева Е.В.* Структурно-функциональные изменения нейронов моллюска после криоконсервации: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Пущино, 2004. – 24 с.
14. *Ивличева Н.А.* Функциональная и регенеративная активность нейронов после криоконсервации изолированного мозга моллюска *Lymnaea Stagnalis L.*: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Пущино, 2013 – 23 с.
15. *Порожан Е.А., Останков М.В., Бабенко Н.Н., Гольцев А.Н.* Оценка фенотипических характеристик фетальных нервных клеток после криоконсервирования с использованием различных режимов замораживания [Текст] // Проблемы криобиологии. – 2012. Т.22, №1. – С. 39–48.
16. Pichugin, Y. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification [Text] / Y. Pichugin, G.M. Fahy, R. Morin // *Cryobiology*. – 2006. №52. – Pp. 228-240.