

Влияние криоконсервирования на способность нервных клеток новорожденных крыс пролиферировать и дифференцироваться

Т.Д. Ляшенко

Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

Effect of Cryopreservation on Ability of Newborn Rat Nerve Cells to Proliferation and Differentiation

T.D. Lyashenko

G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University

Исследование влияния низких температур на жизнеспособность нервных клеток (НК) различной степени зрелости имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования на способность НК новорожденных крыс к пролиферации и дифференциации *in vitro*.

НК получали из мозга новорожденных крыс. Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха в среде DMEM/F12. Замораживали НК в присутствии 10% диметилсульфоксида (ДМСО) со скоростью 1°C/мин до –80°C. После этого НК переносили в жидкий азот. Размораживали НК при 40°C. Клетки иммуноцитохимически окрашивали на маркерный белок нейронов β-тубулин III. Микроскопирование и микрофото съемку культур выполняли на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Жизнеспособность свежeweделенных НК находилась в пределах 22–55%. Культивирование на протяжении суток приводило к прикреплению небольшого количества клеток, некоторые из которых распластывались. Значительная часть неприкрепленных НК формировала крупные и плотно упакованные агрегаты. После 1–3-х суток культивирования большинство агрегатов прикреплялись и их клетки интенсивно дифференцировались и мигрировали. При этом дифференцирование происходило преимущественно в направлении клеток с морфологией нейронов. Наблюдалось образование клетками агрегатов длинных отростков, по которым происходила миграция клеток; 5–7-е сутки культивирования характеризовались формированием небольших участков монослоя. На 7–9-е сутки на поверхности глиального монослоя появлялись клетки, морфологически похожие на нейробласты. На 11–15-е сутки культивирования эти клетки образовывали колонии, которые в процессе дальнейшего культивирования увеличивались в размерах.

Жизнеспособность деконсервированных НК составляла 15–65% при снижении концентрации клеток. Как и в контрольных клетках, наблюдались прикрепление и распластывание небольшой части единичных клеток и формирование агрегатов после 1–3-х суток культивирования. Однако эти агрегаты были мелкие и рыхло упакованные. Прикрепление агрегатов происходило на 3–4-е сутки, а начало формирования участков монослоя – на 6-е сутки культивирования. На 9-е сутки культивирования монослой составлял 80% поверхности лунок. Клетки, морфологически похожие на нейробласты, образовывались на 10-е сутки. Формирование колоний клеток наблюдалось лишь на 16-е сутки культивирования (на 5 суток позже по сравнению со свежeweделенными).

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении способности к дифференциации и пролиферации свежeweделенных НК новорожденных крыс после криоконсервирования.

Investigation of the effect of low temperatures on viability of nerve cells (NCs) of different maturity is both of fundamental and applied value.

The research aim is to study the effect of cryopreservation on the ability of NCs derived from newborn rats to *in vitro* proliferation and differentiation.

NCs were derived from brain of newborn rats. Cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM/F12 medium. NCs were frozen in 10% DMSO presence with the rate of 1°C/min down to –80°C. Afterwards NCs were transferred into liquid nitrogen. NCs were thawed at 40°C. The cells were immunocytochemically stained with neuronal marker protein β-tubulin III. The cultures were investigated and images were made using microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany).

Viability of freshly isolated NCs was within the limits of 22–55%. Culturing during 24 hrs resulted in the adhesion of small number of cells, some of them flattened. The majority of non-adhered NCs formed large and tightly packed aggregates. After 1–3 culturing days the majority of aggregates adhered and their cells intensively differentiated and migrated. Herewith differentiation took place predominantly towards the cells with morphology of neurons. Aggregates' cells were found to form long out-growings being the site of cell migration; the 5–7th culturing days were characterized with the formation of small sites of monolayer. To the 7–9th days on a surface of glial monolayer the cells morphologically similar to neuroblasts appeared. To the 11–15th culturing days these cells formed colonies which increased their dimensions in the process of further culturing.

Viability of frozen-thawed NCs made 15–65% with the reduction of cell concentration. Like in the control cells there was observed adherence and flattening of small number of single cells and formation of aggregates after 1–3 culturing days. However these aggregates were small and loosely packed. Adherence of aggregates took place to the 3–4th days, and the start of monolayer sites' formation was to the 6th culturing day. To the 9th culturing day the monolayer made 80% of the wells' surface. The formation of cells morphologically similar to neuroblasts occurred to the 10th day. Formation of cell colonies was observed only to the 16th culturing day (5 days later if compared with freshly isolated ones).

The findings testify to a preservation of ability to differentiation and proliferation of freshly isolated NCs of newborn rats after cryopreservation.