

Влияние ДМСО на поведение нервных клеток новорожденных крыс в условиях культивирования *in vitro* после замораживания-отогрева

Т.Д. Ляшенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

DMSO Effect on Behavior of Nerve Cells of New-Born Rats During *In Vitro* Culturing after Freeze-Thawing

T.D. LYASHENKO

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

Целью исследования явилось изучение действия различных концентраций ДМСО, а также сыворотки крови на сохранение постнатальных нервных клеток (НК) после замораживания-отогрева.

Нервные клетки изолировали из ткани мозга новорожденных крыс. Жизнеспособность клеток оценивали по исключению 0,4% трипанового синего. Замораживание проводили в концентрации 20×10^6 млн клеток/мл под защитой 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5% ДМСО при наличии и отсутствии 10% сыворотки крыс со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -80°C . Далее клетки переносили в жидкий азот. 2×10^6 млн/мл НК культивировали в среде DMEM/F12 с 10% сыворотки крыс. Клетки окрашивали на β -тубулин III, нестин и виментин.

Замораживание-отогрев НК без ДМСО как при наличии, так и при отсутствии сыворотки приводит к падению жизнеспособности и гибели значительной части клеток. ДМСО предохраняет НК от повреждения в процессе их криоконсервирования, что выражается в увеличении сохранности клеток после отогрева. Максимальная сохранность НК наблюдалась при криоконсервировании их с 5 и 7,5% ДМСО. При этом наличие сыворотки в среде криоконсервирования на сохранность и жизнеспособность НК влияния не оказывало.

Культивирование НК, криоконсервированных с ДМСО при отсутствии сыворотки, а также при наличии сыворотки и 2,5% ДМСО, характеризуется формированием мелких, рыхлых и бесформенных агрегатов, которые к подложке не прикрепляются. При этом к подложке прикрепляется небольшое количество единичных клеток, однако их распластывания не наблюдалось.

Культивирование НК, криоконсервированных при наличии сыворотки и 5; 7,5; 10 и 12,5% ДМСО, приводило к формированию агрегатов, которые прикреплялись, а их клетки мигрировали, дифференцировались и пролиферировали. При этом вначале происходило формирование монослоя клеток глии, затем появлялись β -тубулин-III – положительные клетки с морфологией нейробластов и колонии нестин- и виментин-положительных клеток. Максимальное количество нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток появлялось при культивировании НК, криоконсервированных с 7,5 и 10% ДМСО. При культивировании НК, криоконсервированных с 5 и 12,5% ДМСО, нейробласты и колонии нервных стволовых/прогениторных клеток появлялись позже и количество их было значительно меньшим.

Таким образом, нервные стволовые/прогениторные клетки новорожденных крыс сохраняют способность к пролиферации и дифференциации после замораживания. При этом наилучшие результаты криоконсервирования НК новорожденных крыс достигаются при использовании 7,5 и 10% ДМСО и 10% сыворотки крови.

The research aim was to study the effect of various DMSO concentrations as well as blood serum on the preservation of post-natal nerve cells (NCs) after freeze-thawing.

Nerve cells were isolated from brain tissue of new-born rats. The viability of cells was estimated on the exclusion of 0.4% trypan blue. Freezing was performed for the concentration of 20×10^6 cells/ml under protection of 2.5, 5, 7.5, 10 and 12.5% DMSO in presence or absence of 10% rat blood serum with the rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ down to -80°C . Afterwards the cells were transferred into liquid nitrogen. NCs (2×10^6 cells/ml) were cultured in DMEM/F12 with 10% rat serum. The cells were stained to reveal beta-tubulin III, nestin and vimentin.

Freeze-thawing of NCs without DMSO both in presence and absence of the serum leads to the reduction of viability and death of significant amount of cells. DMSO prevents NCs from the damage during their cryopreservation, which is manifested by the increased viability of cells after thawing. Maximum integrity of NCs was observed after freeze-thawing with 5 or 7.5% DMSO. Herewith the presence of serum in cryopreservation medium had no effect on the integrity and viability of NCs.

Culturing of NCs cryopreserved with DMSO with no serum as well as in its presence and with 2.5% DMSO is characterized by the formation of small, loosen and shapeless aggregates, not adhered to the substrate. Herewith small amount of single cells adhered to the substrate, but their flattening was not observed.

Culturing of NCs cryopreserved in the presence of serum and 5, 7.5, 10 and 12.5% DMSO resulted in the formation of aggregates, which adhered, and their cells migrated, differentiated and proliferated. Herewith, initially the glial cell monolayer was formed, then beta-tubulin positive cells of neuroblast morphology and colonies of nestin and vimentin positive cells appeared. Maximum number of neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells appeared during culturing of NCs, frozen-thawed with 7.5 and 10% DMSO. During culturing of NCs frozen-thawed with 5 and 12.5% DMSO neuroblasts and colonies of nerve stem/progenitor cells appeared later and their number was significantly lower.

Thus nerve stem/progenitor cells of newborn rats preserve the ability to proliferation and differentiation after freeze-thawing. Herewith, the highest results of cryopreservation of newborn rat NCs are achieved when using 7.5 or 10% DMSO solutions supplemented with 10% blood serum.