

## Влияние различных концентраций ДМСО и замораживания-отогрева на сохранность нервных клеток новорожденных крыс

UDC 547.569.2:57.043: 591.88.084

T.D. LYASHENKO<sup>1\*</sup>, A.N. SUKACH<sup>1,2</sup>

## The Effect of DMSO of Different Concentrations and Freeze-Thawing on Newborn Rat Neural Cell Survival

Изучали действие различных концентраций криопротектора ДМСО на способность к пролиферации изолированных нервных клеток новорожденных крыс и их окрашивание трипановым синим до и после криоконсервирования. Установлено, что 7,5 и 10% – оптимальные концентрации криопротектора, при которых нервные стволовые/прогениторные клетки новорожденных крыс сохраняют способность к пролиферации и дифференциации после криоконсервирования. Показано, что для сохранения функциональной активности нервных клеток новорожденных крыс присутствие сыворотки в среде замораживания обязательно. Показано, что жизнеспособность нервных клеток новорожденных крыс, определенная по исключению трипанового синего, лишь частично коррелирует с функциональной активностью клеток.

**Ключевые слова:** нервные клетки новорожденных крыс, криоконсервирование, жизнеспособность, культивирование.

Вивчали дію різних концентрацій криопротектора ДМСО на здатність до проліферації ізольованих нервових клітин новонароджених щурів та їх забарвлення трипановим синім до і після криоконсервування. Встановлено, що 7,5 і 10% – оптимальні концентрації криопротектора, при яких нервові стовбурові/прогеніторні клітини новонароджених щурів зберігають здатність до проліферації і диференціації після криоконсервування. Показано, що для збереження функціональної активності нервових клітин новонароджених щурів присутність сироватки в середовищі заморожування є обов'язковою. Показано, що життєздатність нервових клітин новонароджених щурів, визначена по виключенню трипанового синього, лише частково корелює з функціональною активністю клітин.

**Ключові слова:** нервові клітини новонароджених щурів, криоконсервування, життєздатність, культивування.

The effect of cryoprotectant dimethyl sulfoxide of different concentrations on the ability of isolated neural cells of newborn rats to proliferate and to be stained with trypan blue before and after freeze-thawing was studied. The cryoprotectant concentrations of 7.5 and 10% were established as the optimal ones, which preserved the ability of the neural stem/progenitor cells of newborn rats to proliferate and differentiate after freeze-thawing. Preservation of the functional activity of newborn rat neural cells demanded the presence of serum in freezing medium. It was demonstrated that the viability of newborn rat neural cells, assessed by trypan blue exclusion, only partially reflected the cell functional activity.

**Key words:** newborn rat neural cells, freeze-thawing, viability, culturing.

За последнее десятилетие достигнут огромный прогресс в изучении биологических свойств и характеристик нервных стволовых клеток [4, 6]. При этом основное внимание исследователей уделялось нервным стволовым/прогениторным клеткам эмбрионов, плодов, взрослых человека и животных. Постнатальные стволовые/прогениторные клетки до настоящего времени изучены недостаточно. Исследование ранних постнатальных нервных клеток (НК) животных и человека позволит объяснить клеточные механизмы активации нейрогенеза в постнатальном мозге, а также изучить возможный нейрогенный репаративный “ответ” нервных стволовых/прогениторных клеток при различных патологиях и повреждениях мозга, что имеет потенциальную клиническую важность.

In the past decade a huge progress in studying biological properties and characteristics of neural stem cells has been achieved [4, 6]. Herewith the researchers were focused on the neural stem/progenitor cells of human and animal embryos, fetuses and adult organisms. Postnatal stem/progenitor cells have remained poorly studied until now. The study of animal and human early postnatal neural cells (NCs) would enable to explain cell mechanisms of neurogenesis activation in a postnatal brain, as well as to study a possible neurogenic reparative “response” of neural stem/progenitor cells under different pathologies and brain injuries, that is of potential clinical importance.

The usage of isolated human and animal early postnatal NC culture enables to perform detailed investigations of mechanisms of neural differentiation, gene

<sup>1</sup>Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: ljashenko\_tanja@mail.ru

<sup>1</sup>G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>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 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: ljashenko\_tanja@mail.ru

Использование культуры изолированных ранних постнатальных НК человека и животных позволяет проводить детальные исследования механизмов нервного дифференцирования, экспрессии генов, а также влияния сигналов микроокружения, которые регулируют фенотипическую специализацию в нервных тканях млекопитающих. Поэтому актуально создание низкотемпературного банка ранних постнатальных НК, что требует разработки эффективных методов их криоконсервирования.

Наиболее часто для криоконсервирования ядерных клеток используется криопротектор ДМСО. Его защитное действие основано на высокой скорости проникновения через клеточную мембрану и образовании большого количества водородных связей с молекулами жидкой фазы клетки. Это приводит к уменьшению вероятности образования внутриклеточных кристаллов льда, а также к снижению эффекта концентрирования внутриклеточных солей при отрицательных температурах, что уменьшает степень криоповреждения клетки [3]. Однако, помимо криозащитных свойств, ДМСО обладает токсическим действием по отношению к замораживаемым биообъектам [9]. Поэтому актуальным является подбор оптимальной концентрации ДМСО, обеспечивающей максимальные криопротекторные свойства при минимальном повреждающем действии.

При низкотемпературном хранении постнатальных НК важно изучить роль сыворотки крови, которая часто используется в протоколах криоконсервирования различных ядерных клеток.

Цель работы – изучение влияния различных концентраций ДМСО, сыворотки и замораживания-отогрева на сохранность (концентрацию и жизнеспособность), а также поведение в условиях культивирования *in vitro* НК новорожденных крыс.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на беспородных белых новорожденных крысах. Нервные клетки выделяли из ткани мозга ферментативно-механическим методом. Для этого ткань мозга инкубировали 10 мин в 0,25%-м растворе трипсина при 37°C, затем дезагрегировали вибрацией [8] на единичные клетки, добавляя 2-кратный объем среды DMEM/F12 (“Sigma”, США) с 10% сыворотки крови крыс. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр, после чего отмывали от трипсина центрифугированием при 1500 об/мин. Диспергировали осадки клеток в средах с сывороткой и без нее.

Охлаждали клетки в среде DMEM/F12 с 10% сыворотки крови крыс и без нее со скоростью 1 град/мин до –80°C в криоконтейнерах (“Corning”, США). Перед замораживанием суспензию клеток

expression, as well as the effect of microenvironment signals, regulating phenotypical specialization in mammalian neural tissues. Proceeding from this fact of current interest is to establish the low temperature bank for early postnatal NCs, requiring the development of efficient methods for their cryopreservation.

The DMSO is the most often used cryoprotectant for cryopreservation of nucleated cells. Its protective effect is based on a high rate of penetration through cell membrane and formation of a large number of hydrogen bonds with molecules of cell liquid. This results in a decrease of intracellular ice crystal formation probability, as well in a reduction of the effect of intracellular salt concentrating under negative temperatures, thereby decreasing the cell cryoinjury degree [3]. However, in addition to cryoprotective properties, DMSO possesses a toxic effect towards processed bioobjects [9]. Therefore of relevance is to select the optimal DMSO concentrations, providing the maximum cryoprotective properties together with minimum damaging effect.

Under postnatal NC low temperature storage of importance is to study the role of blood serum, being frequently used in cryopreservation protocols for different nucleated cells.

The research was aimed to study the effect of DMSO of different concentrations, serum and freeze-thawing on survival (concentration and viability), as well as behavior during *in vitro* culturing of newborn rat NCs.

### Materials and methods

The experiments were carried-out in breadless white newborn rats. Neural cells were isolated from brain tissue using the enzymatic and mechanical method. For this purpose the brain tissue was incubated within 10 min in 0.25% trypsin solution at 37°C, then disaggregated by vibration [8] into single cells and suspended in two-fold volume of DMEM/F12 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% rat blood serum. The obtained suspension was filtered through nylon filter, then washed-out of trypsin with centrifugation at 1500 rpm. Cell sediments were dispersed in media with/without serum.

Cells were cooled in DMEM/F12 medium with or without 10% rat blood serum with 1 degree/min rate down to –80°C in cryocontainers (Corning, USA). Before freezing the cell suspension was mixed with cryoprotectant solution in 1:1 ratio. DMSO solution was added by drops up to 2.5; 5; 7.5; 10 and 12.5% concentrations. Herewith the cell final concentration was 20 mln/ml and the volume was 200 µl. An equal volume of culturing medium was added into the control cell samples. After adding the DMSO the NC suspension was incubated at 4°C for 15 min and then cooled down

смешивали с раствором криопротектора в соотношении 1:1. Раствор ДМСО добавляли по каплям до концентраций 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5%. При этом конечная концентрация клеток составляла 20 млн/мл, а объем – 200 мкл. В контрольные образцы клеток добавляли равный объем среды культивирования. После добавления ДМСО суспензию НК инкубировали при 4°C в течение 15 мин. Нервные клетки, замороженные до –80°C, через сутки помещали в жидкий азот. Размораживали клетки на водяной бане при 40°C.

После размораживания НК однократно отмывали от ДМСО средой DMEM/F12 с сывороткой или без нее с последующим центрифугированием на протяжении 3 мин при 100g. Осадок клеток диспергировали в среде отмывания.

Жизнеспособность НК оценивали по исключению витального красителя трипанового синего [10]. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Подсчет жизнеспособности и количества клеток проводили сразу после выделения, 15-минутной инкубации при 4°C в присутствии ДМСО, а также после отмывания деконсервированных суспензий НК от криопротектора.

Нервные клетки культивировали в 24-луночных планшетах (“Corning”) в обогащенной среде DMEM/F12 (“Sigma”) [1] в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха. Среду культивирования заменяли на свежую через 3–4 дня.

Культуры НК, предварительно зафиксированные в 4%-м параформальдегиде, иммуноцитохимически окрашивали [2] на маркерные белки нейронов ( $\beta$  tubulin III), нервных стволовых клеток (nestin) и нервных прогениторных клеток (vimentin). В качестве первичных антител использовали mouse monoclonal to  $\beta$  Tubulin III (“Sigma”), mouse monoclonal to Nestin (“Abcam”, Великобритания) и rabbit polyclonal to Vimentin (“Abcam”). В качестве вторичных антител использовали Chromeo 546 goat anti-mouse (“Abcam”), Chromeo 488 goat anti-rabbit (“Abcam”). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (“Sigma”).

Микроскопирование и микрофотосъемку культур проводили на микроскопе Observer Z1 (“Carl Zeiss”, Германия).

Результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента с использованием программы MS Excel.

Эксперименты были проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II конгрессом по биоэтике (20.09.07, Киев, Украина) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986).

to –80°C. One day after the cells were transferred into a liquid nitrogen. Cells were thawed in water bath at 40°C.

After thawing the NCs were once washed-out of DMSO with DMEM/F12 medium with/without serum with following centrifugation for 3 min at 100g. The cell sediment was dispersed in washing medium.

The NCs’ viability was assessed by trypan blue vital dye exclusion [10]. Cell number was calculated in Goryaev’s chamber. The viability and cell number were calculated right after isolation, after 15 minutes of incubation at 4°C in DMSO presence, as well as after cryoprotectant wash-out procedure of frozen-thawed NC suspension.

Neural cells were cultured in 24-well plates (Corning) in the enriched DMEM/F12 medium (Sigma) [1] in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air atmosphere. Culturing medium was replaced for a fresh one every 3–4 days.

The NC cultures, preliminarily fixed in 4% paraformaldehyde were immunocytochemically stained [2] for marker proteins: mouse monoclonal to  $\beta$  Tubulin III (Sigma) for neurons, monoclonal to Nestin (Abcam, Great Britain) for neural stem cells and rabbit polyclonal to Vimentin (Abcam) for neural progenitor cells. The Chromeo 546 goat anti-mouse (Abcam), Chromeo 488 goat anti-rabbit (Abcam) were used as secondary antibodies. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma).

Microscopy and microimaging of cultures were performed with Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany).

The results were statistically processed using the Student’s method with MS Excel Software.

The experiments were done in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 2<sup>nd</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

## Results and discussion

Since DMSO has a manifested toxic effect on cells under concentration higher than 12% [7, 11] in the research we used the cryoprotectant concentration not higher than 12.5%.

The viability and concentration of freshly isolated NCs from newborn rats did not depend on serum presence in the medium and made  $54 \pm 4.6\%$  and  $20.9 \pm 1.4$  mln/ml in serum-free medium and  $56.2 \pm 4.2\%$  and  $21.6 \pm 0.8$  mln/ml in serum-enriched one.

The Fig. 1 shows that DMSO adding into NC suspension reduced the viability and a number of cells both in serum-free and serum-enriched media. Herewith a decrease in viability and cell concentration was ob-

## Результаты и обсуждение

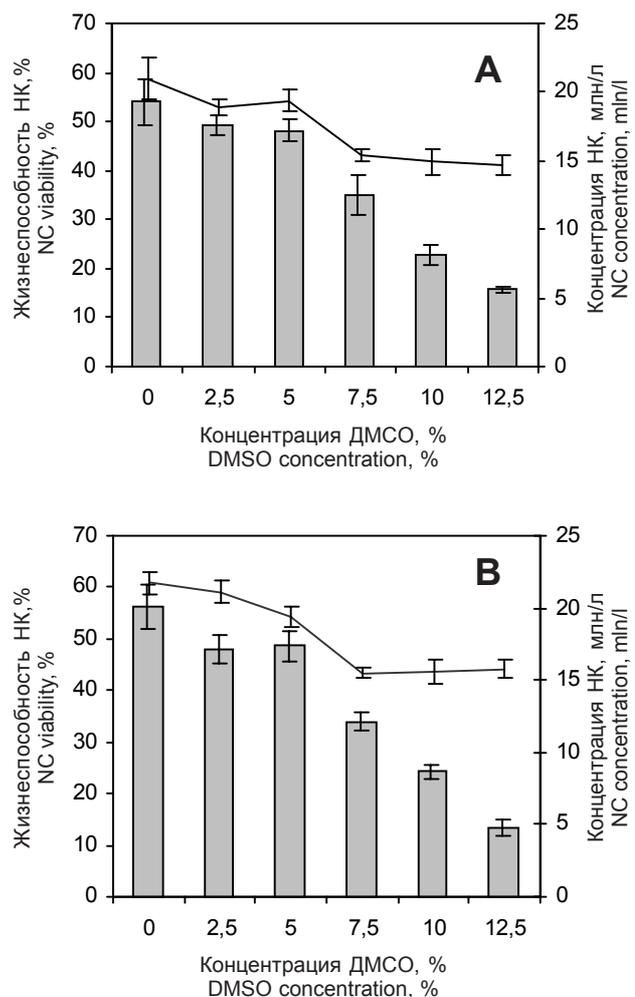
Поскольку ДМСО обладает выраженным токсическим действием на клетки при концентрации выше 12% [7, 11], в исследовании использовали концентрацию криопротектора не более 12,5%.

Жизнеспособность и концентрация свежely выделенных НК новорожденных крыс не зависели от наличия в среде сыворотки и составляли:  $54 \pm 4,6\%$  и  $20,9 \pm 1,4$  млн/мл в среде без сыворотки и  $56,2 \pm 4,2\%$  и  $21,6 \pm 0,8$  млн/мл в среде с сывороткой.

Как видно из рис. 1, добавление ДМСО к свежely выделенной суспензии НК снижало жизнеспособность и уменьшало их количество в среде как без сыворотки, так и с сывороткой. При этом снижение жизнеспособности и концентрации клеток наблюдалось уже после добавления 2,5% ДМСО. Повышение концентрации ДМСО до 5% достоверно не изменяло жизнеспособность и количество клеток по сравнению с 2,5% ДМСО (рис. 1), а при концентрации ДМСО 7,5% как в среде с сывороткой, так и без нее жизнеспособность и концентрация НК снижались на 30–35% и 29% соответственно по сравнению с образцами клеточных суспензий, не содержащими ДМСО. Повышение концентрации ДМСО до 10 и 12,5% в среде с сывороткой и без нее не приводило к изменению количества клеток, однако при этом наблюдалось существенное снижение жизнеспособности клеток: на 57% при 10% ДМСО и на 72–76% при 12,5% ДМСО (рис. 1).

После замораживания-отогрева НК без криопротектора жизнеспособность и концентрация клеток снижались на 60 и 67% по сравнению с исходными значениями (рис. 2, 3). При этом присутствие сыворотки в среде замораживания не влияло на жизнеспособность и концентрацию клеток. Присутствие в среде замораживания 2,5 и 5% ДМСО сохраняло 37 и 47% клеток в среде без сыворотки и 38 и 52% – с сывороткой. Жизнеспособность клеток при этом не зависела от присутствия сыворотки и составляла 32–37% (рис. 2). Повышение концентрации ДМСО в среде замораживания до 7,5; 10 и 12,5% как в присутствии сыворотки, так и без нее не оказывало влияния на изменение концентрации клеток, однако снижало жизнеспособность по сравнению со средой, содержащей 5% ДМСО (рис. 2, 3). При этом падение жизнеспособности пропорционально зависело от концентрации ДМСО в среде замораживания.

Поскольку ДМСО обладает токсичным действием на клетки [7, 11], мы изучали влияние отмывания криопротектора на концентрацию и жизнеспособность НК после замораживания-отогрева. Как видно из рис. 2, отмывание деконсервированных клеток от ДМСО фактически не приводит к повышению их жизнеспособности. Однако отмывание от ДМСО во всех случаях приводило к уменьшению количества клеток в 1,5–2 раза (рис. 3).

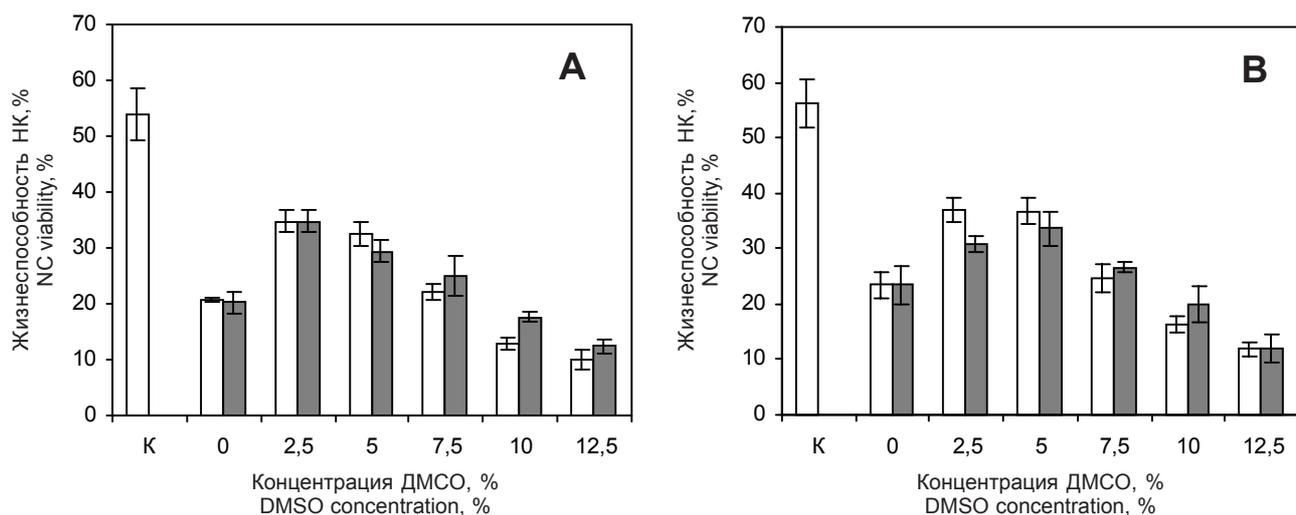


**Рис. 1.** Влияние ДМСО и сыворотки на жизнеспособность (■) и концентрацию (—) изолированных НК крыс: А – без сыворотки; В – с сывороткой.

**Fig. 1.** DMSO and serum effects on viability (■) and concentration (—) of rat isolated NCs: A – serum-free; B – serum-enriched media.

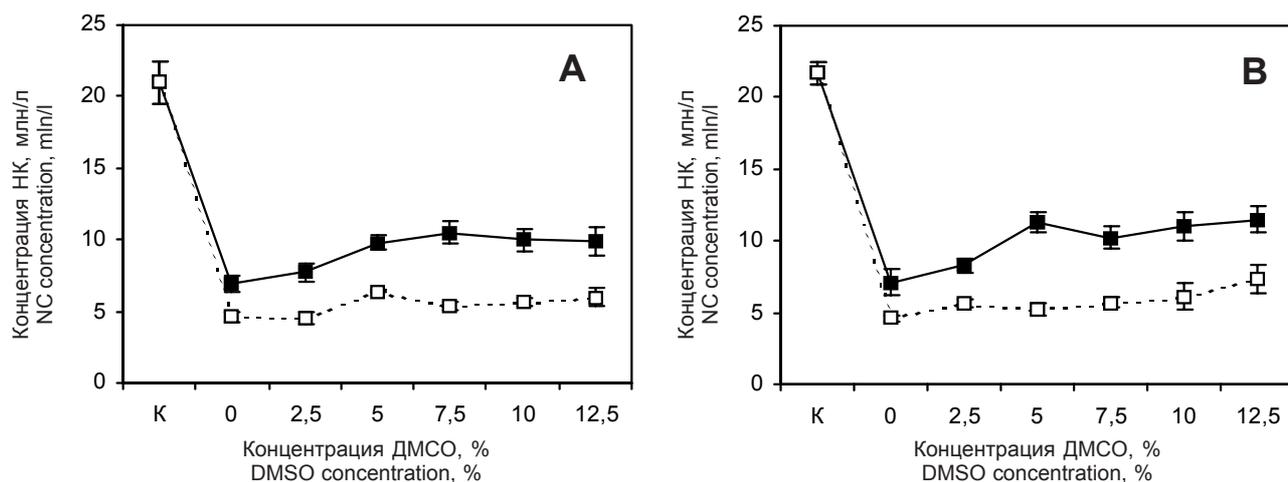
served even after adding 2.5% DMSO. Increasing the DMSO concentration up to 5% did not statistically and significantly change the cell viability and number if compared to the case of 2.5% DMSO (Fig. 1). An increase in DMSO concentration up to 7.5% both in serum-free and serum-enriched media resulted in a fall of NCs' viability by 30–35% and a decrease in cell concentration by 29% as compared to DMSO-free cell suspension samples. An increase in DMSO concentration up to 10 and 12.5% in serum-free and serum-enriched media did not change the cell number, but at the same time there was observed a considerable reduction in cell viability by 57, 72–76% at 10 and 12.5% DMSO, correspondingly (Fig. 1).

After freeze-thawing of NCs without cryoprotectant the cell viability and concentration reduced by 60 and 67% if compared to the initial values (Fig. 2, 3). Here-with the presence of serum in freezing medium did not



**Рис. 2.** Влияние отмывания криопротектора на жизнеспособность изолированных НК, криоконсервированных с различными концентрациями ДМСО без сыворотки (А) и с сывороткой (В); К – жизнеспособность свежeweделенных НК; □ – жизнеспособность НК до отмывания ДМСО; ■ – жизнеспособность НК после отмывания ДМСО.

**Fig. 2.** Effect of cryoprotectant washing-out on viability of isolated NCs, frozen-thawed in the presence of different concentrations of DMSO in serum-free (A) and serum-enriched media (B); K denotes the viability of freshly isolated NCs; □ – NCs' viability prior to DMSO washing-out; ■ – NCs' viability after DMSO washing-out.



**Рис. 3.** Влияние отмывания криопротектора на концентрацию изолированных НК, криоконсервированных с различными концентрациями ДМСО без сыворотки (А) и с сывороткой (В); К – исходная концентрация НК; ■ – концентрация НК до отмывания ДМСО; □ – концентрация НК после отмывания ДМСО.

**Fig. 3.** The effect of cryoprotectant washing-out on concentration of isolated NCs, frozen-thawed in the presence of with different concentrations of DMSO in serum-free (A) and serum-enriched media (B); K denotes NCs' initial concentration; ■ – NCs concentration prior to DMSO washing-out; □ – NCs' concentration after DMSO washing-out.

Таким образом, наибольшее количество НК, исключаяющих витальный краситель трипановый синий, сохраняется при использовании для криоконсервирования 5%-го ДМСО. Наличие сыворотки в среде замораживания существенного влияния на жизнеспособность и количество клеток не оказывает. Использование центрифугирования для отмывания деконсервированных НК от ДМСО не приводит к повышению жизнеспособности клеток, однако сопровождается значительной их потерей.

affect the cell viability and concentration. The presence of 2.5 and 5% DMSO in freezing medium preserved 37 and 47% cells in serum-free medium and 38 and 52% in serum-enriched one. The cell viability did not thereby depend on serum presence and made 32–37% (Fig. 2). An increase in DMSO concentration in freezing medium up to 7.5, 10 and 12.5% both with and without serum did not change cell concentration, but resulted in a significant fall in their viability if compared to the medium, containing 5% DMSO (Fig. 2,

Следует отметить, что определение жизнеспособности по исключению трипанового синего клетками – достаточно грубый метод, который в большей мере является тестом физической целостности клеток и не отражает их функциональную и метаболическую сохранность. Наиболее “строгим” тестом жизнеспособности клеток является их способность к росту (пролиферации и дифференцировке) в культуре. Поэтому следующим этапом нашей работы было определение влияния замораживания-отогрева в средах с различными концентрациями ДМСО с сывороткой и без нее на способность НК формировать агрегаты, прикрепляться к поверхности пластика, пролиферировать и дифференцироваться. Для этого свежeweделенные и деконсервированные НК сеяли в 24-луночные планшеты в концентрации 2 млн/мл. При этом суспензию деконсервированных НК перед посевом разводили до конечной концентрации ДМСО в среде культивирования 0,25%.

Свежеизолированные НК формировали агрегаты уже через сутки культивирования (рис. 4, А). На протяжении 1–3 суток культивирования большинство агрегатов прикреплялось, их составляющие клетки начинали интенсивно мигрировать и дифференцироваться, формируя участки монослоя (рис. 4, В). При этом наблюдалось значительное количество клеток с морфологией нейронов. Через 2–4 суток культивирования формировались небольшие участки клеточного монослоя, морфологически состоящего преимущественно из клеток глии. На 5–7-е сутки культивирования на поверхности глиального монослоя появлялись клетки, морфологически похожие на нейробласты (рис. 4, С), количество которых при дальнейшем культивировании увеличивалось. На 6–9-е сутки культивирования образовывались колонии недифференцированных  $\beta$ -тубулин-III положительных (данные по окрашиванию не представлены) клеток (рис. 4, D), которые в процессе культивирования увеличивались в размерах и формировали контакты с соседними колониями.

Культивирование НК, замороженных-отогрeтых со всеми используемыми нами концентрациями ДМСО без сыворотки, приводило к формированию мелких, рыхлых и бесформенных агрегатов, которые при дальнейшем культивировании к подложке не прикреплялись. При этом в лунках наблюдалось небольшое количество плавающих единичных клеток, некоторые из них прикреплялись и расплывались.

При культивировании НК, замороженных-отогрeтых с сывороткой без ДМСО или с 2,5% ДМСО, отмечалось большое количество плавающих единичных клеток, а также формирование мелких,

3). At the same time the viability fall proportionally to DMSO concentration in freezing medium.

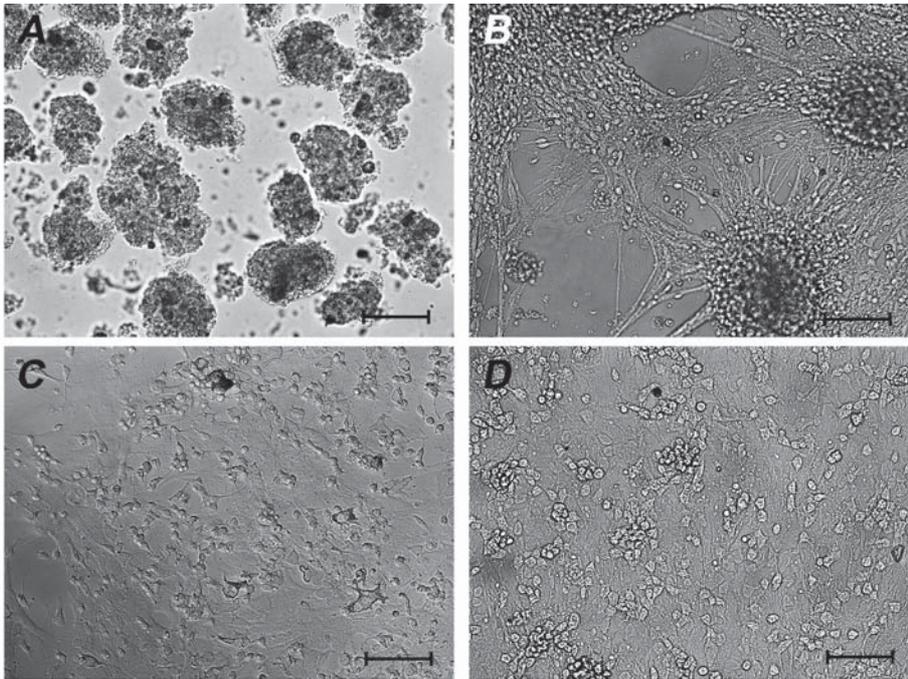
Since DMSO has a toxic effect on cells [7, 11] we studied the effect of cryoprotectant washing-out on NCs concentration and viability after their freeze-thawing. The Fig. 2 shows the frozen-thawed cell washing-out of DMSO as actually not resulting in their viability increase. However, the washing-out of DMSO in the all the cases resulted in cell number decrease in 1.5–2 times (Fig. 3).

Thus, the highest number of NCs, excluding trypan blue vital dye is preserved when using 5% DMSO during cryopreservation. The serum presence in freezing medium does not significantly affect the cell viability and number. The usage of centrifugation for frozen-thawed NCs washing-out of DMSO does not augment the cell viability, but is accompanied with their high loss.

Of note is the fact, that the viability assessment from data of trypan blue exclusion by cells is quite a rough method, and is more likely the test for physical integrity of cells and does not reflect their functional and metabolic state preservation. The most “rigorous” test for cell viability is their capability to proliferate and differentiate under *in vitro* culture. Therefore the next step in our research was to determine the effect of freeze-thawing in media with different concentrations of DMSO with and without serum on the NCs’ capability to form aggregates, attach to plastic surface, proliferate and differentiate. For this purpose the freshly isolated and frozen-thawed NCs were inoculated into 24-well plates in 2 mln/ml concentration. Herewith the suspension of frozen-thawed NCs before inoculation was diluted to the 0.25% final DMSO concentration in culturing medium.

The freshly isolated NCs formed aggregates even after one day of culturing (Fig. 4A). Within 1–3 days of culturing the most aggregates attached, their composing cells began an intensive migration and differentiation, forming monolayer sites (Fig. 4B). At the same time there was observed a great number of cells with neuron morphology. Following 2–4 culturing days the small sites of cell monolayer, being composed morphologically of most glial cells, were formed. To the 5<sup>th</sup>–7<sup>th</sup> culturing days on the surface of glial monolayer the cells, being morphologically similar to neuroblasts, appeared (Fig. 4C), and their number increased under following culturing. To the 6<sup>th</sup>–9<sup>th</sup> culturing days there were formed the colonies of non-differentiated  $\beta$  tubulin III positive cells (no data on staining presented) (Fig. 4D), which during culturing increased in size and formed contacts with nearby colonies.

Culturing of NCs, frozen-thawed in the presence of all studied DMSO concentrations in serum-free media, resulted in formation of small, loose and formless aggregates, which did not attach to the substrate



**Рис. 4.** Формирование свежезолированными НК новорожденных крыс агрегатов (А), которые в процессе дальнейшего культивирования прикреплялись, их клетки мигрировали, дифференцировались и пролиферировали (В), формируя монослой, на котором образовывались нейробластоподобные клетки (С) и колонии недифференцированных клеток (D). Масштаб 100 мкм.

**Fig. 4.** Freshly isolated newborn rat NCs formed the aggregates (A), which attached under following culturing, their cells migrated, differentiated and proliferated (B), forming the monolayer, where the neuroblast-like cells (C) and colonies of non-differentiated cells (D) were formed. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .

рыхлых и бесформенных агрегатов. В процессе дальнейшего культивирования прикрепления и распластывания единичных клеток и агрегатов не наблюдалось.

В первые сутки культивирования НК, криоконсервированных с сывороткой и 5; 7,5; 10; 12,5% ДМСО, формировались агрегаты среднего размера. Некоторые из них в процессе культивирования сливались, уплотнялись и прикреплялись к подложке. На 3–4-е сутки культивирования прикреплялось 90% агрегатов. Клетки прикрепленных агрегатов мигрировали, дифференцировались и пролиферировали. Первоначально происходила дифференциация преимущественно в направлении клеток с глиальной морфологией. На 4–6-е сутки культивирования наблюдалось формирование участков монослоя, состоящих из клеток глии. На 7–10-е сутки культивирования на этом монослое появлялись клетки, морфологически похожие на нейробласты (рис. 5, А). На 10–16-е сутки культивирования образовывались колонии нестин- и виментин-положительных клеток (рис. 5, В, С). Колонии в процессе дальнейшего культивирования увеличивались в размерах.

Максимальное количество нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток образовывалось из НК, криоконсервированных с 7,5 и 10% ДМСО. При культивировании НК, замороженных-отогретых с 5 и 12,5% ДМСО, нейробласты и колонии стволовых/прогениторных клеток появлялись на 2–4 суток позже по сравнению с клетками, криоконсервированными с 7,5 и 10% ДМСО, и их количество было меньше.

during further culturing. At the same time a small number of floating single cells was observed in wells, and only some of them were attached and flattened.

When culturing the NCs, frozen-thawed in serum-enriched media without or with 2.5% DMSO, there was observed a big number of floating single cells, as well as the small, loose and amorphous aggregates were formed. During following culturing no attachment and flattening of single cells and aggregates were observed.

Within first culturing days of NCs, frozen-thawed in serum-enriched media and in the presence of 5, 7.5, 10, and 12.5% DMSO the middle-sized aggregates were formed. Some of them fused, become condensed and attached to the substrate during culturing. To the 3<sup>rd</sup>–4<sup>th</sup> culturing days 90% of aggregates were attached. Cells of attached aggregates migrated, differentiated and proliferated. Initially the differentiation occurred mostly towards cells with glial morphology. To the 4<sup>th</sup>–6<sup>th</sup> culturing days there was noted the formation of monolayer sites, consisting of glial cells. To the 7<sup>th</sup>–10<sup>th</sup> culturing days the cells, being morphologically similar to neuroblasts appeared on this monolayer (Fig. 5A). To the 10<sup>th</sup>–16<sup>th</sup> days of culturing there were formed the colonies of nestin- and vimentin-positive cells (Fig. 5B and C). Within further culturing the colonies increased in size.

Maximum number of neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells was formed from NCs, frozen-thawed in the presence of 7.5 and 10% DMSO. During culturing of NCs, frozen-thawed in the presence of 5 and 12.5% DMSO the neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells appeared to the 2<sup>nd</sup>–4<sup>th</sup> days later

Таким образом, проведенные исследования показали, что присутствие ДМСО даже в невысоких концентрациях в среде как с сывороткой, так и без нее оказывает токсическое действие на НК.

Замораживание-отогрев НК в среде без ДМСО как с сывороткой, так и без нее приводит к падению жизнеспособности и гибели значительной части клеток (количество клеток уменьшилось в два раза).

ДМСО в концентрации 5–12,5% предохраняет НК от разрушения в процессе замораживания-отогрева, что выражается в сохранении большего их количества. При этом максимальное количество НК, исключая витальный краситель трипановый синий, отмечалось при использовании 5% ДМСО. Присутствие сыворотки в среде криоконсервирования на сохранность количества и жизнеспособности НК влияния не оказывало.

Культивирование деконсервированных НК *in vitro* выявило, что жизнеспособность, определенная по исключению клетками трипанового синего, не вполне согласуется со способностью клеток прикрепляться, расплываться и расти в культуре. Культивирование, в отличие от экспериментов по определению жизнеспособности НК с использованием трипанового синего, показало, что 7,5 и 10% – оптимальные концентрации ДМСО, при которых максимально сохраняются функциональные способности НК. При этом присутствие сыворотки в среде криоконсервирования обязательно.

При культивировании НК, замороженных-отогретых с различными концентрациями ДМСО, их жизнеспособность, определенная по исключению

if compared to cells, frozen-thawed in the presence of 7.5 and 10% DMSO, and their number was lower.

Thus, the performed research demonstrated the DMSO presence even in low concentrations in both serum-free and serum-enriched media as causing a toxic effect on NCs.

Freeze-thawing of NCs without DMSO in both serum-free and serum-enriched media resulted in a fall of viability and death of a great part of cells (cell number reduced twice).

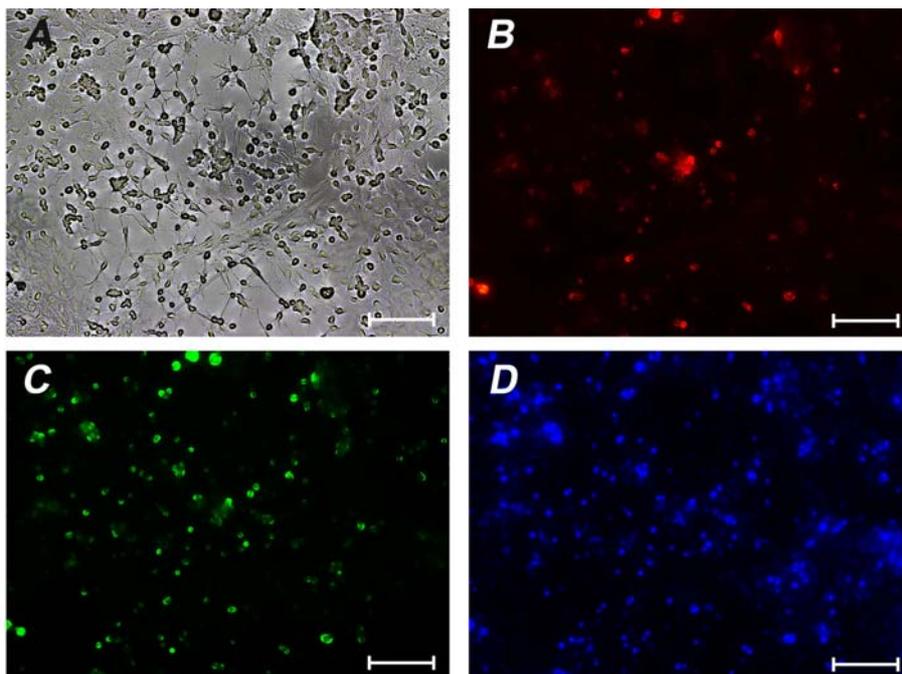
DMSO in concentration of 5–12,5% protects NCs against damages during freeze-thawing, that manifests in preservation of their greater number after thawing. Moreover the maximum number of NCs, excluding trypan blue vital dye was noted after freeze-thawing in presence of 5% DMSO. The serum in cryopreservation medium had no effect on the preservation of NCs' number and viability at that.

*In vitro* culturing of frozen-thawed NCs revealed the viability, determined by trypan blue exclusion by cells, as not completely correlating to cell capability to attach, flatten and grow in culture. In contrast to the experiments on assessment of NCs viability with trypan blue application, the culturing demonstrated the 7.5 and 10% DMSO concentrations as the optimal ones, when NCs' functional capabilities were maximally preserved. Herewith the serum presence in cryopreservation medium was obligatory.

The comparison of culturing results for NCs, frozen-thawed in the presence of different concentrations of DMSO with their viability, determined by trypan blue exclusion, indicates to the fact, that cell staining with trypan blue after freeze-thawing in DMSO presence

**Рис. 5.** Иммуноцитохимическое окрашивание криоконсервированных НК новорожденных крыс после 14 суток культивирования. Первичная культура пролиферирующих клеток (А) демонстрирует высокий уровень нестин- (В) и виментин-положительных (С) клеток. Ядра клеток были окрашены красителем Hoechst (D). Масштаб 100 мкм.

**Fig. 5.** Immunocytochemical staining of cryopreserved newborn rat NCs after 14 days of culturing. Primary culture of proliferating cells (A) demonstrates a high level of nestin (B) and vimentin (C) positive cells. Cell nuclei were stained with Hoechst dye (D). Scale bar 100  $\mu$ m.



трипанового синего, указывает на то, что окрашивание клеток трипановым синим в присутствии ДМСО скорее отражает изменение степени проницаемости клеточной мембраны для красителя, чем их жизнеспособность. Действительно, снижение жизнеспособности НК, определяемое по исключению трипанового синего клетками в присутствии ДМСО, может определяться двумя факторами: увеличением проницаемости клеточной мембраны для красителя с повышением концентрации ДМСО [12] и падением жизнеспособности НК вследствие токсического действия высоких концентраций криопротектора. Повышение проницаемости клеточной мембраны для трипанового синего и токсический эффект являются следствием изменения структуры мембраны в присутствии ДМСО [5, 13]. Степень таких изменений зависит от концентрации ДМСО, вследствие которых нарушается гомеостаз клеток и изменяются межмембранные взаимодействия, что, в свою очередь, может индуцировать апоптоз клеток. Однако, если проницаемость клеток изменяется сразу после добавления ДМСО к клеткам, то для проявления токсического действия ДМСО необходимы время и условия *in vivo* или *in vitro*. Поэтому увеличение количества НК, прокрашенных трипановым синим с повышением концентрации ДМСО в среде, вероятнее всего, происходит вследствие изменения проницаемости клеточных мембран для красителя. С этой точки зрения использование трипанового синего для определения жизнеспособности НК в присутствии ДМСО в среде не целесообразно.

### Выводы

Нервные стволовые/прогениторные клетки новорожденных крыс сохраняют способность к пролиферации и дифференциации после замораживания-отогрева. При этом наибольшее количество функционально активных клеток сохраняется при использовании 7,5 и 10% ДМСО.

Для сохранения функциональной активности НК новорожденных крыс присутствие сыворотки в среде замораживания обязательно.

Жизнеспособность НК новорожденных крыс, определенная по исключению трипанового синего, лишь частично отражает функциональную активность клеток.

Использование центрифугирования для удаления ДМСО из суспензии НК не целесообразно вследствие значительной потери количества клеток при незначительном повышении их жизнеспособности.

*Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Коваленко И.Ф. и канд. биол. наук Холодному В.С. за помощь в проведении микрофотосъемки.*

reflects a change in cell membrane permeability for a dye rather than their viability. Really, a decrease in NCs' viability, determined by trypan blue exclusion by the cells after freeze-thawing in DMSO presence may be specified by two factors such as: an increase in cell membrane permeability for a dye with a rise of DMSO concentration [12] and a fall of NC viability due to a toxic effect of high concentrations of cryoprotectant. The augmentation of cell membrane permeability for trypan blue and a toxic effect result from a change in membrane structure in DMSO presence [5, 13]. The degree of such changes depends on DMSO concentration, resulting in disordered cell homeostasis and changed membrane-membrane interactions, that in its turn may induce cell apoptosis. However, if cell permeability changes right after DMSO adding to cell suspension, time and *in vivo* or *in vitro* conditions are necessary for DMSO toxic effect manifestation. Therefore, the augmentation of NCs' number, stained with trypan blue following DMSO concentration rise in the medium, most probably occurs due to a changed cell membrane permeability for a dye. In this aspect the application of trypan blue for determining NCs viability after freeze-thawing in presence of DMSO in medium is not adequate.

### Conclusions

Neural stem/progenitor cells of newborn rats preserve the capability to proliferate and differentiate after freeze-thawing. Herewith the highest number of functionally active cells is preserved when using 7.5 and 10% DMSO.

To preserve the functional activity of newborn rat NCs the presence of serum in freezing medium is obligatory.

The viability of newborn rat NCs, determined by trypan blue exclusion, coincides only partially with cell functional activity.

It is not expedient to use centrifugation to remove DMSO from NCs suspension due to a great loss of cell number and only a slight increase in their viability.

*The authors thank Dr. Kovalenko I.F. and Dr. Kholodnyy V.S. for the assistance with microimaging.*

### References

1. Lyashenko T.D., Sukach O.M. Characteristics of isolated newborn rat's neural cells // *Patologiya*.– 2009.– Vol. 6, N1.– P. 55–58.
2. Sukach A.N. Characteristics of human embryonic neural cells, derived with non-enzymatic way // *Tsitologiya*.– 2005.– Vol. 47, N3.– P. 207–213.
3. Fuller B., Lane N., Benson E. Life in the frozen state.– London: CRC Press, 2004.– 672 p.

## Литература

1. *Ляшенко Т.Д., Сукач О.М.* Характеристика ізольованих нервових клітин новонароджених щурів // Патологія.– 2009.– Т. 6, №1.– С. 55–58.
2. *Сукач А.Н.* Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология.– 2005.– Т. 47, №3.– С. 207–213.
3. *Fuller B., Lane N., Benson E.* Life in the frozen state.– London: CRC Press, 2004.– 672 p.
4. *Gage F.H.* Mammalian neural stem cells // Science.– 2000.– Vol. 287, N545.– P. 1433–1438.
5. *Gordeliy V.I., Kiselev M.A., Lesieur P. et al.* Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures // Biophys. J.– 1998.– Vol. 75, N5.– P. 2343–2351.
6. *Kornblum H. I.* Introduction to Neural Stem Cells // Stroke.– 2007.– Vol. 38 (part 2).– P. 810–816.
7. *Malinin T.I., Perry V.P.* Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells // Cryobiology.– 1967.– Vol. 4, N2.– P. 90–96.
8. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Anal. Biochem.– 1991.– Vol. 194, N2.– P. 326–329.
9. *Rowley S.D., Anderson G.L.* Effect of DMSO exposure without cryopreservation on haemopoietic progenitor cells // Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N5.– P. 389–393.
10. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol.– 1976.– Vol. 13.– P. 29–83.
11. *Tomford W.W., Fredericks G.R., Mankin H.J.* Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes // J. Bone Joint Surg. Am.– 1984.– Vol. 66, N2.– P. 253–259.
12. *Wood D.C., Wood J.* Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide // Ann. N.Y. Acad. Sci.– 1975.– Vol. 243.– P. 7–19.
13. *Yu Z.-W., Quinn P.J.* Phase stability of phosphatidylcholines in dimethylsulfoxide solutions // Biophys. J.– 1995.– Vol. 69, N4.– P. 1456–1463
4. *Gage F.H.* Mammalian neural stem cells // Science.– 2000.– Vol. 287, N545.– P. 1433–1438.
5. *Gordeliy V.I., Kiselev M.A., Lesieur P. et al.* Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures // Biophys. J.– 1998.– Vol. 75, N5.– P. 2343–2351.
6. *Kornblum H. I.* Introduction to Neural Stem Cells // Stroke.– 2007.– Vol. 38 (part 2).– P. 810–816.
7. *Malinin T.I., Perry V.P.* Toxicity of dimethyl sulfoxide on HeLa cells // Cryobiology.– 1967.– Vol. 4, N2.– P. 90–96.
8. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Anal. Biochem.– 1991.– Vol. 194, N2.– P. 326–329.
9. *Rowley S.D., Anderson G.L.* Effect of DMSO exposure without cryopreservation on haemopoietic progenitor cells // Bone Marrow Transplant.– 1993.– Vol. 11, N5.– P. 389–393.
10. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol.– 1976.– Vol. 13.– P. 29–83.
11. *Tomford W.W., Fredericks G.R., Mankin H.J.* Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes // J. Bone Joint Surg. Am.– 1984.– Vol. 66, N2.– P. 253–259.
12. *Wood D.C., Wood J.* Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide // Ann. N.Y. Acad. Sci.– 1975.– Vol. 243.– P. 7–19.
13. *Yu Z.-W., Quinn P.J.* Phase stability of phosphatidylcholines in dimethylsulfoxide solutions // Biophys. J.– 1995.– Vol. 69, N4.– P. 1456–1463

Accepted 11.07.2011

Поступила 11.07.2011  
Рецензент Г.А. Божок