

# Чувствительность фетальных и неонатальных нервных клеток крыс к гипотермическому хранению

М.В.ШЕВЧЕНКО<sup>1</sup>, А.Н.СУКАЧ<sup>2</sup>

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

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

## Sensitivity of Rat Fetal and Neonatal Neuronal Cells to Hypothermic Storage

M.V. SHEVCHENKO<sup>1</sup>, A.N. SUKACH<sup>2</sup>

<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

Изучение влияния гипотермических условий на жизнеспособность изолированных нервных клеток (НК) различного уровня развития актуально для криобиологии, трансплантологии и медицины. Цель работы – изучение влияния гипотермического хранения (ГХ) изолированных НК фетального и неонатального мозга крыс в средах различного состава на их поведение в культуре *in vitro*.

Нервные клетки получали из тканей мозга эмбрионов крыс 15–16-х суток гестации и новорожденных крыс. Клетки хранили в течение 1, 2, 3, 4 и 5-и суток при температуре 8°C в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки крови крыс. Культивировали их в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной 10%-й сывороткой. Жизнеспособность клеток оценивали по трипановому тесту. Клетки окрашивали на маркер нейронов  $\beta$ -тубулин III.

В течение 1-х суток ГХ наблюдалось увеличение жизнеспособности всех изучаемых клеток в 1,5–2 раза, которая при дальнейшем хранении практически не изменялась. Количество клеток при этом уменьшалось.

Гипотермическое хранение эмбриональных НК до 3-х суток не приводило к изменению поведения клеток в культуре по сравнению с контролем. Нервные клетки формировали агрегаты, от которых после прикрепления мигрировали нейроны и клетки глии. После формирования глиального монослоя появлялись нейробласты и колонии клеток; в течение 4-х суток ГХ характеризовалось уменьшением количества клеток с нейрональной морфологией и более низкой скоростью формирования монослоя глии. После 5 суток ГХ нервные клетки формировали мелкие рыхлые агрегаты со слабой способностью к прикреплению. При этом мигрирующие от них клетки в основном были представлены клетками глии, которые характеризовались низким уровнем пролиферации. Площадь монослоя не превышала 20% площади лунки. Поведение неонатальных НК в культуре после ГХ на протяжении 2-х суток не отличалось от поведения исходных клеток. Происходило формирование многоклеточных агрегатов, которые прикреплялись к подложке, после чего от них мигрировали нейроны и клетки глии. Формировался монослой клеток глии, на котором появлялись нейробласты и колонии клеток. Культивирование неонатальных НК после 3-х суток ГХ характеризовалось прикреплением и распластыванием единичных клеток глии, а также формированием мелких рыхлых агрегатов, которые к подложке не прикреплялись, в дальнейшем распадались на единичные клетки и погибали.

Таким образом, неонатальные НК более чувствительны к условиям ГХ по сравнению с эмбриональными клетками. При этом нейрональные клетки более чувствительны к условиям гипотермического хранения в сравнении с клетками глии.

Studying the influence of hypothermic conditions on the viability of isolated neuronal cells (NCs) of different developmental level has been actual for cryobiology, transplantology and medicine. This research aim was to study the effect of hypothermic storage (HS) of isolated NCs of fetal and neonatal rat brain in the media of different composition on their behavior *in vitro*.

Neuronal cells were procured from brain tissues of rat embryos of 15–16 gestation days and newborn ones. The cells were stored for 1, 2, 3, 4 and 5 days at 8°C in DMEM/F12 medium supplemented with rat blood serum. They were cultured in  $2 \times 10^6$  cells/ml concentration in DMEM/F12 medium, enriched with 10% serum. The cell viability was assessed by trypan blue test. Cells were stained for neuronal marker  $\beta$ -tubulin III.

During the 1<sup>st</sup> day of HS there was observed an increase in viability of all studied cells by 1.5–2 times, which remained almost unchanged during following storage. In this case a number of cells was reduced.

Hypothermic storage of embryonic NCs up to 3 days did not change the cell behavior in culture as compared with the control. Neuronal cells formed the aggregates, from which the neurons and glial cells migrated after attaching. After glial monolayer formation there were appeared the neuroblasts and cell colonies, during 4 days the HS was characterized by a decreased number of cells with neuronal morphology and a lower rate of glial monolayer formation. After 5 days of HS the neuronal cells formed small loose aggregates with a low ability for adherence. In this case the migrating cells were mainly presented by glial cells, characterized by low proliferation. The monolayer area did not exceed 20% of the well bottom surface. The neonatal NCs behavior in culture after HS for up to 2 days did not differ from that of initial cells. There were formed the multi-cell aggregates, attached to the substrate, after that there was the migration of neurons and glial cells. The monolayer of glial cells was formed, where neuroblasts and cell colonies appeared. The culturing of neonatal NCs after 3 days of HS was characterized by the attachment and flattening of single glial cells, as well as by formation of small loose aggregates, not attached to the substrate, then dissociated into single cells and died.

Thus, the neonatal NCs are more sensitive to HS conditions as compared to embryonic cells. Thereat the neuronal cells are more sensitive to hypothermic storage conditions compared to glial ones.