

## Влияние криоконсервирования на поведение нервных клеток плодов крыс в условиях культивирования *in vitro*

А.Н. СУКАЧ, О.В. ОЧЕНАШКО, А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryopreservation Effect on Behaviour of Neuronal Cells of Rat Fetuses During *In Vitro* Culturing

A.N. SUKACH, O.V. OCHENASHKO, A.S. LEBEDINSKY, A.YU. PETRENKO

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

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

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования на поведение изолированных НК плодов крыс в культуре *in vitro*.

Нервные клетки получали из тканей мозга плодов крыс 15–16 суток гестации. Замораживание проводили в концентрациях 20–50 млн клеток/мл под защитой 10% ДМСО в присутствии 10% сыворотки крыс со скоростью 1 град/мин до  $-80^{\circ}\text{C}$ , после чего контейнеры помещали в жидкий азот. Размороженные клетки отмывали от ДМСО центрифугированием.

В процессе культивирования деконсервированных НК важным показателем явилось формирование многоклеточных агрегатов, которое зависело как от концентрации посеянных клеток, так и от их жизнеспособности, определенной по трипановому синему. Так, при культивировании деконсервированных НК с жизнеспособностью менее 30% в концентрациях ниже 1 млн/мл формирования агрегатов не происходило, клетки с нейрональной морфологией отсутствовали, монослой не формировался, хотя единичные клетки прикреплялись и распластывались. Увеличение посевной концентрации этих клеток до 2–4 млн/мл характеризовалось образованием мелких агрегатов, клетки которых после прикрепления мигрировали и распластывались. Большинство клеток характеризовалось глиальной морфологией, однако присутствовали и клетки с морфологией нейронов.

При культивировании деконсервированных НК с жизнеспособностью 40–60% в концентрации 1 млн/мл формировалось значительное количество средних и мелких агрегатов, которые прикреплялись к подложке, после чего их клетки мигрировали и распластывались. При этом значительное количество мигрировавших клеток характеризовалось морфологией нейронов.

При культивировании деконсервированных НК с жизнеспособностью выше 70% агрегаты формировались при посевной концентрации 0,5 млн/мл. При этом в агрегаты объединялись около 70% клеток. После прикрепления от агрегатов мигрировало большое количество клеток с нейрональной морфологией. Также происходило быстрое образование монослоя клеток глии.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении жизнеспособности дифференцированных НК плодов крыс после их криоконсервирования. При этом клетки глии являются более криоустойчивыми по сравнению с нейронами. Для восстановления повреждений и эффективного функционирования нейронов необходимо восстановление клеточного микроокружения, подобного интактной ткани, что достигается при образовании многоклеточных агрегатов.

Investigation of low temperature effect on viability of isolated neuronal cells (NCs) has both fundamental and practical value.

The research aim was to study the cryopreservation effect on behaviour of isolated NCs of rat fetuses in culture *in vitro*.

Neuronal cells were obtained from the brain tissues of rat fetuses of 15–16 gestation days. Freezing was performed in a concentration of 20–50 mln cells/ml under protection of 10% DMSO in the presence of 10% rat blood serum with the rate of 1 deg/min down to  $-80^{\circ}\text{C}$ , then the containers were placed into liquid nitrogen. Thawed cells were washed out by centrifugation with DMSO.

During culturing frozen-thawed NCs an important index was the formation of multicellular aggregates, which depended both on concentration of plated cells and their viability determined by trypan blue. So during culturing of frozen-thawed NCs with viability less than 30% in concentrations less than 1 mln/ml the formation of aggregates did not occur, the cells with neuronal morphology were absent, monolayer was not formed, although single cells were attached and flattened. The increase of plating concentration of these cells up to 2–4 mln/ml was characterized by the formation of small aggregates, the cells of which migrated and flattened after attachment. Most cells were characterized with glial morphology, but the cells with the morphology of neurons were present.

During culturing of frozen-thawed NCs with viability of 40–60% in 1 mln/ml concentration a significant number of medium and small aggregates attached to the substrate was formed, afterwards their cells migrated and flattened. Most cells were characterized with the morphology of neurons.

When culturing frozen-thawed NCs with more than 70% viability the aggregates were formed at plating concentration of 0.5 mln/ml. Moreover about 70% of cells were joined into aggregates. After attaching the aggregates a great number of cells with neuronal morphology migrated. Also a rapid formation of glial cells monolayer occurred.

The results attest the preservation of viability of differentiated rat fetal NCs after their cryopreservation. Furthermore glial cells are more cryoresistant than neurons. To restore the damages and the effective functioning of neurons the recovery of the similar to intact tissue cell microenvironment is necessary, that is achieved by the formation of multi-cellular aggregates.