

Влияние гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре

UDC 611.018.82.085.2: 615.014.41: 547.42

M.V. SHEVCHENKO¹, A.N. SUKACH^{2*}

Effect of Hypothermic Storage of Isolated Neural Cells of Newborn Rats in Media of Different Composition on Its Behavior in Culture

Изучали влияние гипотермического хранения в сахарозо-содержащей и солевой средах в присутствии и без 10% сыворотки на поведение в культуре изолированных нервных клеток новорожденных крыс. Показано, что гипотермическое хранение нервных клеток в солевой среде DMEM/F12 и сахарозо-солевом растворе позволяет сохранять популяции дифференцированных и стволовых/прогениторных клеток на протяжении 2-х суток. При этом гипотермическое хранение нервных клеток в течение одних суток в среде DMEM/F12 с сывороткой и без нее, а также в сахарозо-солевом растворе без сыворотки не влияет на структурно-функциональное состояние дифференцированных и стволовых/прогениторных нервных клеток новорожденных крыс.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, нервных клетки, новорожденные крысы, культивирование, многоклеточные агрегаты.

Вивчали вплив гіпотермічного зберігання в сахарозо-місткому та сольовому середовищах у присутності і без 10% сироватки на поведінку в культурі ізольованих нервових клітин новонароджених щурів. Показано, що гіпотермічне зберігання нервових клітин у сольовому середовищі DMEM/F12 та сахарозо-сольовому розчині дозволяє зберігати популяції диференційованих і стовбурових/прогеніторних клітин протягом 2-х діб. При цьому гіпотермічне зберігання нервових клітин упродовж однієї доби в середовищі DMEM/F12 з сироваткою та без неї, а також в сахарозо-сольовому розчині без сироватки не впливає на структурно-функціональний стан диференційованих і стовбурових/прогеніторних нервових клітин новонароджених щурів.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, нервові клітини, новонароджені щури, культивування, багатоклітинні агрегати.

The behavior of isolated neural cells of newborn rats in culture after hypothermic storage either in sucrose-based solution or saline medium supplemented with 10% serum or serum-free was studied. Hypothermic storage in both saline medium DMEM/F12 and sucrose-based solution was shown to be effective in preserving the populations of differentiated and stem/progenitor cells for 2 days. It was demonstrated that one day of hypothermic storage in medium DMEM/F12 either supplemented with serum or serum-free, as well as in serum-free sucrose-based solution did not effect the structural-functional state of differentiated and stem/progenitor neural cells of newborn rats.

Key words: hypothermic storage, neural cells, newborn rats, culturing, multicellular aggregates.

Исследование влияния гипотермии на нервные клетки (НК) новорожденных представляет интерес для криобиологии и медицины. Изолированные НК новорожденных могут потенциально использоваться для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний и повреждений ЦНС [8], что требует разработки эффективных способов хранения этих клеток. Чаще всего изолированные клетки хранят при низких температурах. Однако хранение в гипотермических условиях может дополнять или быть альтернативой замораживанию.

Кроме того, изолированные НК новорожденных используют в качестве модели для изучения влияния гипотермии на клетки нервной ткани. Гипотермия является перспективным методом уменьше-

Investigation of the effect of hypothermia on the neural cells (NCs) of newborns is of interest for cryobiology and medicine. Isolated NCs of newborns may be potentially used in cell therapy of neurodegenerative diseases and injuries of the central nervous system [8], which requires the development of effective ways of storage for these cells. Usually the isolated cells are being stored at low temperatures. However, keeping in hypothermic conditions can complement or even be an alternative to freezing.

In addition, the isolated NCs of newborns are used in model studies of the effects of hypothermia on the neural tissue cells. Hypothermia is a promising method in reducing the inflammation and activating the recovery of neural tissues resulted from hypoxia or inju-

¹Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: an_sukach@yahoo.com

¹G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University, Kharkov, Ukraine

²Institute 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: an_sukach@yahoo.com

ния воспаления и активации восстановления нервных тканей, возникающих вследствие гипоксии и травм [4, 11], в частности у новорожденных [6, 10], головной мозг которых может подвергаться действию гипоксии при рождении. Однако механизм нейропротекторного действия гипотермии, а также отдаленные последствия ее влияния на клетки нервной ткани новорожденных остаются не изученными. Исследование влияния условий гипотермии на поведение изолированных НК новорожденных в культуре *in vitro* позволит выяснить механизмы положительного влияния околонулевых температур на стволовые/прогениторные, нейрональные и глиальные клетки, а также установить возможные побочные ее эффекты, которые могут при этом возникать.

Цель работы – изучение влияния гипотермического хранения в средах различного состава на поведение в культуре *in vitro* изолированных нервных клеток мозга новорожденных крыс.

Материалы и методы

Нервные клетки выделяли из ткани головного мозга новорожденных крыс. Для этого ткань извлекали, промывали и механически дезагрегировали на единичные клетки в среде DMEM/F12 («Sigma», США). Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр, после чего клетки осаждали центрифугированием при 120 g в течение 3 мин. После удаления надосадочной жидкости к клеткам добавляли среду для гипотермического хранения (ГХ). Для ГХ использовали солевую среду DMEM/F12, обогащенную 0,6% глюкозы, 2 мМ глутамин, 3 мМ бикарбоната натрия и сахарозо-солевой раствор (ССР), содержащий 250 мМ сахарозы; 0,44 мМ KH_2PO_4 ; 5 мМ KCl; 0,5 мМ Na_2HPO_4 ; 1,5 мМ CaCl_2 ; 1 мМ MgSO_4 [2] с и без 10% сыворотки крови крыс.

Для получения сыворотки крови взрослых беспородных белых крыс декапитировали под эфирным наркозом. Собранную кровь помещали в холодильник (8°C) на 15 мин для активации процессов свертывания. Свернувшуюся кровь центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipor», США), аликвотировали и хранили при температуре –18°C.

Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем трипановым синим [9]. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Суспензию НК в концентрации 40–50 млн/мл хранили в условиях бытового холодильника при температуре 8°C в течение 1, 2, 3 и 4-х суток. Многоклеточные агрегаты перед определением жизнеспособности дезагрегировали на единичные клетки пипетированием.

ries [4, 11], particularly in newborns [6, 10], which brain that may be exposed to hypoxia at birth. However, the mechanism of neuroprotective effect of hypothermia, as well as long-term consequences of its action on the cells of the newborns nervous tissue are not clearly understood. Investigation of the effects of hypothermic conditions on behavior of isolated NCs of newborns during *in vitro* culturing would clarify the mechanisms of positive impact caused by near-zero temperatures on stem/progenitor, neuronal and glial cells, as well as to establish its possible side effects that may arise.

Our aim was to study the effect of hypothermic storage in media of different composition on the behavior of isolated neural cells of newborn rat brain during *in vitro* culture.

Materials and methods

Neural cells were isolated from brain tissue of newborn rats. The tissue was retrieved, washed and mechanically disaggregated into single cells in medium DMEM/F12 (Sigma, USA). The resulting suspension was passed through a nylon filter, thereafter the cells were sedimented by centrifugation at 120g for 3 min. After removal of the supernatant the cell sediment was resuspended in media for hypothermic storage (HS). For performing HS we used a saline medium DMEM/F12, supplemented with 0.6% glucose, 2 mM glutamine, 3 mM sodium bicarbonate and sucrose-based solution (SBS) containing 250 mM sucrose; 0.44 mM KH_2PO_4 ; 5 mM KCl; 0.5 mM Na_2HPO_4 ; 1.5 mM CaCl_2 ; 1 mM MgSO_4 [2], enriched with 10% serum of rats or serum-free.

To obtain the serum the adult breedless white rats were decapitated under ether anesthesia. The collected blood was placed into a refrigerator (8°C) for 15 minutes to activate the clotting process. Clotted blood was centrifuged at 1500g for 15 min. The resulting serum was sterilized by passing through a filter with a pore diameter of 0.22 μm (Millipor, USA), aliquoted and stored at –18°C.

Cell viability was assessed by staining with supravital dye Trypan blue. [9] The number of cells was counted in Goryaev's chamber. The NC suspension in a concentration of 40–50 million/ml was stored in a refrigerator at 8°C for 1, 2, 3, and 4 days. To determine the viability of cells in multicellular aggregates these were disaggregated into single cells by pipetting.

Freshly isolated neural cells and those after HS were cultured in a concentration of 2 million/ml in enriched medium DMEM/F12 in the presence of 10% rat blood serum. Culturing was carried-out in 24-well plates (Corning, USA) in a CO_2 incubator at 37°C, 5% CO_2 and 95% air. Half of the culture medium volume was replaced with fresh one every 3–4 days.

Microscopic analysis of cell cultures was performed with the light inverted microscope (AmScope MT3000, USA), morphometric analysis of aggregates and cell

Свежевыделенные НК, а также клетки после ГХ культивировали в концентрации 2 млн/мл в обогащенной среде DMEM/F12 в присутствии 10% сыворотки крови крыс. Культивирование проводили в 24-луночных планшетах («Corning», США) в CO₂ инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Половину объема среды культивирования заменяли на свежую каждые 3–4 суток.

Микроскопический анализ клеточных культур проводили на световом инвертированном микроскопе («AmScope MT3000», США), морфометрический анализ агрегатов и колоний клеток – с помощью программного обеспечения «AmScope» (США). Динамику образования монослоя оценивали по изменению размеров участков монослоя в процессе культивирования.

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

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Результаты и обсуждение

Свежевыделенные НК представляли собой гетерогенную популяцию клеток, жизнеспособность которых в среднем составляла 31%.

В течение первых суток гипотермического хранения в ССР наблюдалось резкое увеличение показателей жизнеспособности НК независимо от присутствия в среде сыворотки. При этом в присутствии сыворотки жизнеспособность клеток увеличивалась в среднем до 71,2%, а при отсутствии – до 57,0% (рис. 1). В процессе дальнейшего ГХ жизнеспособность клеток достоверно не изменялась.

В течение первых суток хранения НК в среде DMEM/F12 незначительно увеличивалась их жизнеспособность, что не зависело от присутствия в среде сыворотки (рис. 1). После 4-х суток хранения наблюдалось увеличение жизнеспособности НК до 61,7% в присутствии сыворотки и 46,7% без нее.

Как видно из рис. 2, в процессе ГХ снижалась концентрация НК во всех используемых средах, которая после 4-х суток хранения составляла 30% от исходной. В ССР наблюдали резкое уменьшение количества клеток после первых суток ГХ и незначительное изменение их концентрации в процессе дальнейшего хранения. На протяжении всего срока хранения НК в среде DMEM/F12 их количество интенсивно снижалось.

Анализ изменения количества только жизнеспособных клеток (клеток, которые не прокрашивались витальным красителем трипановым синим)

colonies was carried-out with AmScope software (USA). The dynamics of the monolayer formation was evaluated by changes in the dimensions of the monolayer sites during culturing.

Results were statistically processed by the Student's method using MS Excel software.

Experiments were performed in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the III National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Results and discussion

Freshly isolated NCs represented a heterogeneous population of cells, which viability was 31% in average.

During the first day of hypothermic storage in the SBS there was a sharp increase in the viability index of the NCs regardless of the presence of serum in the medium. In the presence of serum, the cell viability increased up to 71.2% in average, and in the serum-free medium it reached 57.0% (Fig. 1). During further HS the cell viability was not significantly changed.

During the first days of NC storage in medium DMEM/F12 their viability index slightly increased and

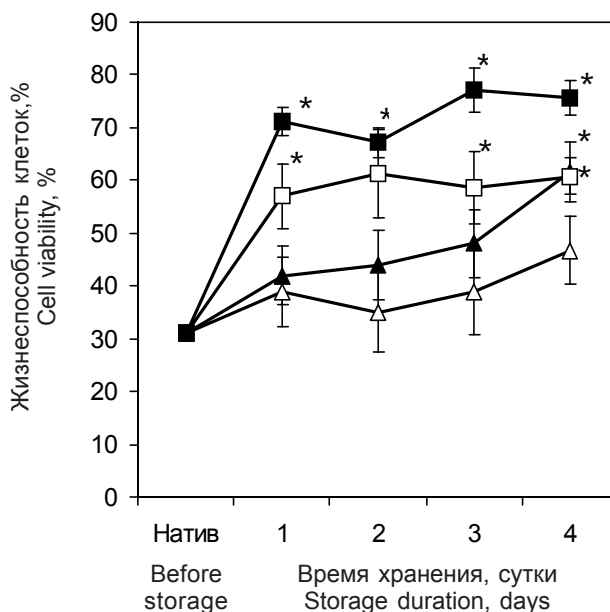


Рис. 1. Изменение жизнеспособности НК в процессе гипотермического хранения: △ – среда DMEM/F12 без сыворотки; ▲ – среда DMEM/F12 с сывороткой; □ – ССР без сыворотки; ■ – ССР с сывороткой; * – отличия статистически достоверны по сравнению со свежевыделенными НК, $p < 0,05$.

Fig. 1. The change in NC viability during hypothermic storage: △ – serum-free DMEM/F12 medium; ▲ – DMEM/F12 medium enriched with serum; □ – serum-free SBS; ■ – SBS with serum; * – statistically significant differences comparing to freshly isolated NCs, $p < 0.05$.

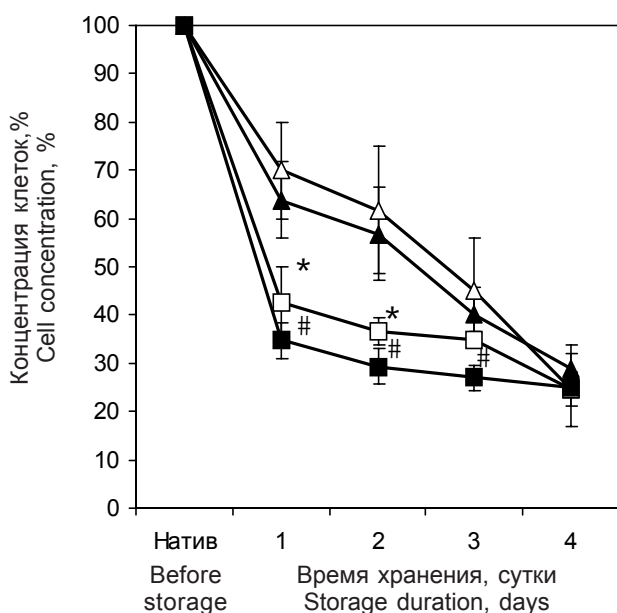


Рис. 2. Изменение концентрации НК в процессе гипотермического хранения: Δ – среда DMEM/F12 без сыворотки; \blacktriangle – среда DMEM/F12 с сывороткой; \square – ССР без сыворотки; \blacksquare – ССР с сывороткой; * – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F12 без сыворотки, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению со средой DMEM/F12 с сывороткой, $p < 0,05$.

Fig. 2. Change in NC concentration during hypothermic storage: Δ – serum-free DMEM/F12 medium; \blacktriangle – DMEM/F12 medium enriched with serum; \square – serum-free SBS; \blacksquare – SBS with serum; * – statistically significant differences comparing with data for serum-free DMEM/F12 medium, $p < 0.05$; # – statistically significant differences comparing with the data for medium DMEM/F12 enriched with serum, $p < 0.05$.

показал (рис. 3), что общее количество не прокрашенных клеток в процессе ГХ уменьшается. Так, ГХ на протяжении 1 суток приводит к уменьшению количества НК, которые не прокрашиваются трипановым синим, в 1,2 раза в среде DMEM/F12 и в 1,2–1,3 раза в ССР. Хранение в течение 2-х суток характеризуется уменьшением количества не прокрашенных клеток в 1,3–1,4 раза в среде DMEM/F12 и в 1,3–1,6 раза в ССР. При ГХ на протяжении 3-х суток уменьшается количество не прокрашенных НК в 1,6–1,7 раза в DMEM/F12 и в 1,5 раза – в ССР.

При этом, как видно из рис. 3, присутствие сыворотки оказывает небольшое положительное влияние на сохранение количества не прокрашенных клеток в процессе их хранения как в DMEM/F12, так и в ССР. Хранение НК на протяжении 4-х суток в DMEM/F12 и ССР, содержащих сыворотку, приводило к снижению количества не прокрашенных клеток в 1,7 и 1,6 раза соответственно. Отсутствие сыворотки в средах характеризовалось уменьшением количества не прокрашенных

it was independent on the presence of serum in the medium (Fig. 1). After 4 days of storage there was an increase of the NC viability index up to 61.7% in the presence of serum and 46.7% in serum-free medium.

As can be seen from Fig. 2, the NC concentration during HS decreased in all used media and after 4 days of storage made 30% of the initial value. After storage in SBS we observed a sharp decrease in the number of cells after the first day of HS and insignificant changes in their concentration during further storage. Through the whole period of storage of NCs in medium DMEM/F12 their number rapidly declined.

Analysis of changes only in the number of viable cells (cells not stained with vital dye Trypan blue) showed (Fig. 3), that the total number of non-stained cells during HS decreased. More specifically, the HS during 1 day led to a decrease in number of NC non-stained by Trypan blue for 1.2 times in DMEM/F12 medium and 1.2–1.3 times in the SBS. Storage during 2 days was characterized by a decreasing number of non-stained cells for 1.3–1.4 times in the medium DMEM/F12, and 1.3–1.6 times in SBS. Storage during 3 days resulted in reduction of NC number by 1.6–1.7 times in DMEM/F12 and by 1.5 times in the SBS.

Moreover, as it can be seen from Fig. 3, the presence of serum has a slight positive effect on the

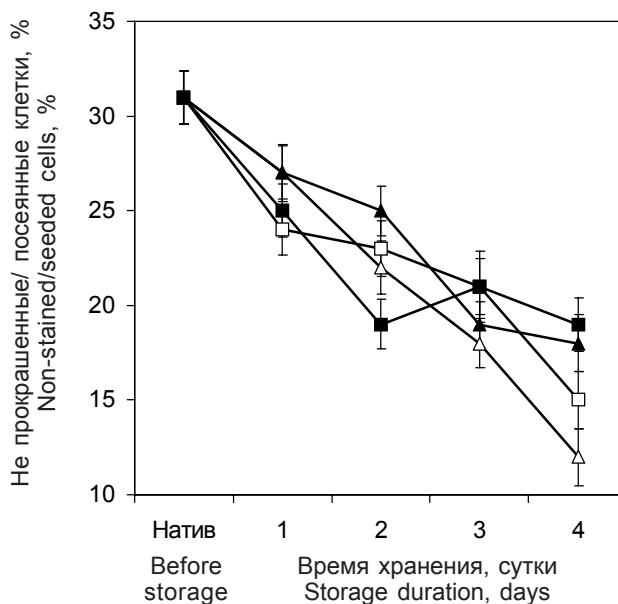


Рис. 3. Влияние ГХ в DMEM/F12 и ССР с сывороткой и без нее на количество нервных клеток, которые не прокрашивались витальным красителем трипановым синим: Δ – среда DMEM/F12 без сыворотки; \blacktriangle – среда DMEM/F12 с сывороткой; \square – ССР без сыворотки; \blacksquare – ССР с сывороткой.

Fig. 3. Effect of HS in DMEM/F12 and SBS media enriched with serum or serum-free on number of neural cells non stained with Trypan blue: Δ – serum-free DMEM/F12 medium; \blacktriangle – DMEM/F12 medium enriched with serum; \square – serum-free SBS; \blacksquare – SBS with serum.

клеток в 2,6 раза при хранении в DMEM/F12 и в 2 раза – в ССР.

Таким образом, увеличение жизнеспособности НК в процессе ГХ происходит за счет интенсивной гибели клеток, очевидно летально поврежденных при их выделении. Причем процесс гибели наиболее интенсивен в первые сутки хранения и не зависит от используемой среды и присутствия в ней сыворотки. Количество клеток, которые не прокрашиваются трипановым синим, также уменьшается в течение ГХ. Это достаточно медленный и равномерный процесс, который практически не зависит от среды хранения. На протяжении 3 суток за сутки хранения количество не прокрашенных клеток в среднем уменьшается на 17%. При этом присутствие сыворотки оказывает незначительное положительное влияние на сохранность клеток. Присутствие сыворотки в среде при ГХ клеток на протяжении 4 суток как в DMEM/F12, так и в ССР оказывает выраженное положительное влияние на способность клеток исключать трипановый синий.

Поскольку определение жизнеспособности НК по трипановому тесту в полной мере не отражает их структурно-функциональное состояние, мы проводили культивирование клеток.

Свежевыделенные НК уже через несколько часов культивирования формировали многоклеточные агрегаты. В процессе дальнейшего культивирования происходило постепенное уплотнение упаковки клеток в агрегатах. Некоторые агрегаты увеличивались в размере. На 2-е сутки они начали активно прикрепляться к подложке. На 4-е сутки культивирования к подложке прикреплялись практически все агрегаты (таблица). После прикрепления агрегатов клетки, входящие в их состав, формировали отростки, мигрировали, распластывались и формировали участки монослоя (рис. 4, А). На 4–6-е сутки культивирования на монослое, состоящем из клеток глии, появлялись β -тубулин III – положительные клетки, которые имели морфологию нейробластов (таблица).

Поведение в культуре НК, подвергнутых ГХ на протяжении одних суток в среде DMEM/F12 с сывороткой и без нее, а также в ССР без сыворотки незначительно отличалось от свежевыделенных клеток (таблица, рис. 4, В). Начало прикрепления агрегатов наблюдалось на 3-и сутки культивирования, а прикрепление всех агрегатов – на 6-е сутки. При этом в культурах клеток, подвергнутых ГХ в среде DMEM/F12 с сывороткой и без нее, а также в ССР без сыворотки, скорость формирования монослоя была выше по сравнению с контролем (таблица). На 4–5-е сутки культивирования на монослое, сформированном этими клетками, как и в контроле, появлялись β -тубулин III – положительные клетки с морфологией нейробластов.

preserving the number of non-stained cells during storage in both DMEM/F12 and SBS. Storage of NCs for 4 days in DMEM/F12 and SBS supplemented with serum led to a drop in the number of non-stained cells in 1.7 and 1.6 times, respectively. The absence of serum in media was accompanied by reduction in the number of non-stained cells by 2.6 times during storage in DMEM/F12 and by 2 times in case of SBS.

Thus, the increase of NC viability index during HS is caused by intensive death of cells, apparently lethally damaged during isolation procedure. Moreover, the process of death is mostly pronounced during the first day of storage and does not depend on the type of medium used as well as the presence of serum in it. The number of cells non-stained by Trypan blue decreases during HS too. This is fairly slow and steady process that is virtually independent on the type of storage medium. During 3 days of storage the average daily decrease in number of non-stained cells was 17%. Moreover, the presence of serum had little positive impact on the cell preservation. The presence of serum in medium during 4 days of HS both in DMEM/F12 and SBS had a strong positive effect on the ability of cells to exclude Trypan blue.

Since the assessment of NCs viability by Trypan blue test does not fully reflect their structural and functional state, we performed the cell culturing.

Freshly isolated NC after few hours of culture formed multicellular aggregates. Cell packing in aggregates gradually became more dense during further culturing. Some aggregates increased their dimensions. On the 2nd day they began to adhere actively to the substrate. On the 4th day of culture almost all aggregates were attached to the substrate (Table). After the aggregates attached, their cells formed processes, migrated and formed the monolayer areas (Fig. 4A). On the 4–6th day of culture on the monolayer formed by glial cells appeared β -tubulin III positive cells that had the neuroblast morphology (Table).

Behavior in culture of NCs subjected to one day of HS in DMEM/F12 medium both enriched with serum and serum-free, as well as in serum-free SBS, had no significant differences comparing to freshly isolated cells (Table, Fig. 4B). Aggregates started to attach on the 3rd day of culture, and the attachment of all aggregates was observed on the 6th day. Thereat the monolayer formation rate was higher in the cell cultures exposed to the HS in DMEM/F12 medium with or without serum, and in serum-free SBS if compared with the control (Table). Appearance of β -tubulin III positive cells with the neuroblast morphology on the monolayer formed by these cells was observed on the 4–5th day of culture like in the control culture.

In cultures of NCs subjected to HS in SBS enriched with serum we observed the formation of small loose aggregates. Their structure did not change during

Влияние ГХ в различных средах на стадии культивирования агрегатов НК
Effect of HS in various media on the timings in NC aggregates culture

Время ГХ, сутки HS duration, days	Среда хранения Storage medium	Стадии культивирования НК, сутки NC culture stages, days				
		Начало прикрепления агрегатов Start of aggregates attachment	Прикрепление всех агрегатов Attachment of all aggregates	Формирование участков монослоя Monolayer sites formation	Появление нейробластов Appearance of neuroblasta	Формирование колоний НК NC colonies formation
0	Контроль (исходные клетки) Control (initial cell suspension)	1–2	4	3–6	4–6	9–13
1	DMEM/F12	3	6	4–5	4–5	9–15
	DMEM/F12 + сыворотка/serum	3	6	4–5	4–5	9–13
	ССР SBS	3	6	4–5	4–5	9–15
	ССР + сыворотка SBS + serum	–	–	–	–	–
2	DMEM/F12	–	–	7	–	–
	DMEM/F12 + сыворотка/serum	3	7	5	5	9–10
	ССР SBS	3	10	5	5	12
	ССР + сыворотка SBS + serum	–	–	–	–	–
3	Все среды All media	–	–	–	–	–
4	Все среды All media	–	–	–	–	–

В культурах НК, которые подвергались ГХ в ССР с сывороткой, формировались мелкие и рыхлые агрегаты. В процессе культивирования их структура не изменялась и к подложке они не прикреплялись. При этом наблюдали прикрепление и распластывание единичных клеток, характеризующихся глиальной морфологией, однако в процессе дальнейшего культивирования их количество не увеличивалось и формирования монослоя не происходило.

Нервные клетки после хранения в гипотермических условиях на протяжении 2-х суток в среде DMEM/F12 с сывороткой и в ССР без нее, как и свежесывороточные, формировали агрегаты в первые сутки культивирования. Но к подложке они прикреплялись значительно позже по сравнению с агрегатами свежесывороточных НК (таблица). При этом около 25% агрегатов НК, которые хранились в ССР без сыворотки, к подложке не прикреплялись и в дальнейшем клетки этих агрегатов погибали. После прикрепления клетки агрегатов мигрировали и формировали монослой, однако скорость его образования была ниже по сравнению с контролем (таблица). Так, в культурах НК, которые

culturing and they had not attached to substrate. Moreover, several cells attached and spreaded, these were of glial morphology, but during further culture their number did not increase and no monolayer formation occurred.

After the storage in hypothermic conditions during 2 days in DMEM/F12 medium with and without serum and in serum-free SBS the neural cells formed aggregates in the first day of cultivation like freshly isolated did. But they attached to the substrate much later than the freshly isolated NCs (Table). Moreover, about 25% of NC aggregates, stored in the serum-free SBS, were not attached to the substrate and later the cells of these aggregates died. After the attachment the cells of aggregates migrated and formed monolayer, but the rate of its formation was lower comparing to the control (Table). Namely in cultures of NCs, which were kept in DMEM/F12 medium enriched with serum and in serum-free SBS, on the 6th day of culture the monolayer occupied 45 and 30% of the well surface, respectively. After 12 days of culture the monolayer area if culture of NCs, which were stored in DMEM/F12 medium enriched with serum, increased up to 60%, and

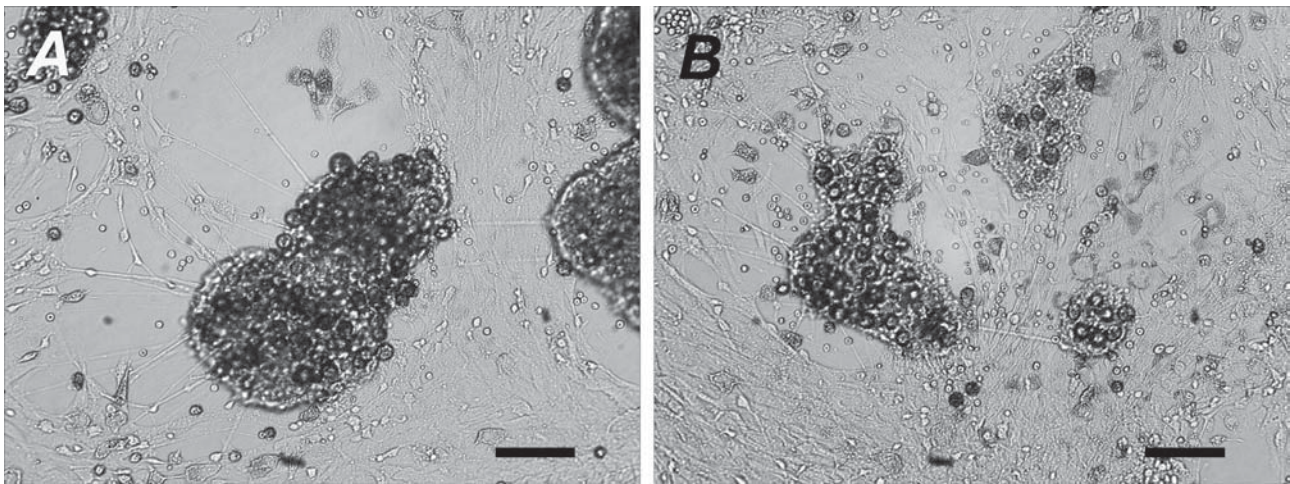


Рис. 4. Прикрепление агрегатов, сформированных свежевыделенными НК (А) и после ГХ на протяжении 2-х суток в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки (В). Масштаб: 100 мкм.

Fig. 4. Attaching aggregates formed freshly isolated NC (A) and after HS for 2 days in DMEM/F12 medium in the presence of serum (B). Scale: 100 μ m.

хранились в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки и в ССР без нее, на 6-е сутки культивирования монослой занимал 45 и 30% площади лунки соответственно. Через 12 суток культивирования площадь монослоя в культуре НК, которые хранились в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки, увеличивалась до 60%, а в ССР без сыворотки – до 50%. В процессе дальнейшего культивирования площадь монослоя не увеличивалась. В культуре НК, которые хранились в среде DMEM/F12 без добавления сыворотки, формировались небольшие участки монослоя, состоящие из клеток глии. На 7-е сутки культивирования этот монослой занимал около 20% поверхности лунки и при дальнейшем культивировании его площадь не увеличивалась. На 4–6-е сутки культивирования клеток, которые хранились в среде DMEM/F12 с сывороткой и в ССР без сыворотки, на глиальном монослое появлялись β -тубулин III – положительные клетки с морфологией нейробластов (таблица).

Нервные клетки, которые хранились на протяжении 2-х суток в среде DMEM/F12 без сыворотки и в ССР с сывороткой, в процессе культивирования формировали мелкие рыхлые агрегаты, которые к подложке не прикреплялись и в процессе культивирования погибали. Прикрепившиеся к подложке единичные клетки в течение нескольких суток культивирования погибали.

Как было показано ранее [1] на 9–15-е сутки культивирования на монослое глии, образованном свежевыделенными НК, появлялись колонии недифференцированных β -тубулин III – положительных клеток, большинство которых являлись нестин- и виментин-положительными.

Время появления колоний в культурах НК, подвигавшихся ГХ в течение 1 и 2-х суток, не отли-

in serum-free SBS risen up to 50%. During further culturing the monolayer area did not increase. In the culture of NCs, which were kept in serum-free DMEM/F12 medium, only small monolayer sites consisted of glial cells were formed. On the 7th day of culture this monolayer occupied about 20% of the well's surface and further culturing did not increase its area. On the 4–6th day of culturing the cells, stored in serum-enriched DMEM/F12 medium and serum-free SBS, β -tubulin III positive cells of neuroblast morphology appeared on the glial monolayer (Table).

Neural cells that have been stored for 2 days in serum-free DMEM/F12 medium and in serum-enriched SBS formed small loose aggregates during culturing that had not attached to the substrate and died during further culturing. Several single cells attached to the substrate died after few days of culturing.

As it was previously shown [1] on the 9–15th day of culturing the colonies of undifferentiated β -tubulin III positive cells appeared on a glia monolayer formed by freshly isolated NCs, and most of the appeared cells were nestin- and vimentin-positive.

The timepoint for appearance of colonies in cultures of NCs subjected to HS for 1 and 2 days, did not differ from the control (Table). Moreover, the colonies were formed by NCs, stored during one day in serum-enriched and serum-free DMEM/F12 medium, as well as in serum-free SBS. After 2 days of HS the colonies were formed only by NCs, kept in serum-enriched DMEM/F12 medium and in serum-free SBS. During culture the number and size of the colonies increased. As can be seen from Fig. 5, the size of colonies formed by cells stored during one day in serum-enriched DMEM/F12 medium was bigger than in the control. Size of colonies of cells that were kept in serum-free DMEM/F12 medium and SBS did not differ from the control (Fig. 5).

чалось от контроля (таблица). При этом колонии были сформированы НК, которые хранились на протяжении первых суток в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки и без нее, и в ССР – без сыворотки. После 2-х суток ГХ колонии формировались культурами НК, которые хранили в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки и в ССР без нее. В процессе культивирования количество и размер колоний увеличивались. Как видно из рис. 5, размер колоний, образованных клетками, которые хранились в течение первых суток в среде DMEM/F12 с сывороткой, был больше по сравнению с контролем. Размер колоний клеток, хранившихся в среде DMEM/F12 и в ССР без добавления сыворотки, не отличался от контроля (рис. 5).

В культурах клеток, которые подвергались ГХ в течение 2-х суток, количество колоний увеличивалось незначительно, при этом их площадь была меньше по сравнению с контролем (рис. 6).

При культивировании НК, которые находились в гипотермических условиях в течение 3 и 4-х суток независимо от среды хранения, образовывались мелкие рыхлые агрегаты, которые к подложке не прикреплялись, а их клетки в процессе культивирования погибали. Единичные клетки прикреплялись, но не распластывались.

Таким образом, проведенные исследования показали, что максимальным временем ГХ, в течение которого НК, изолированные из ткани мозга новорожденных крыс, сохраняют свои свойства на уровне свежеевыделенных, является 2-е суток: дифференцированные НК прикрепляются и распластываются, а стволовые/прогениторные НК пролиферируют и дифференцируются. При этом оптимальной средой хранения является DMEM/F12 с сывороткой, что можно объяснить сходством ее состава с внутриклеточной средой организма.

Потерю способности НК, подвергнутых ГХ в ССР с сывороткой, формировать агрегаты, клетки которых пролиферируют и прикрепляются к подложке в условиях *in vitro*, можно объяснить сочетанным действием на плазматическую мембрану сахарозы и белков сыворотки. Известно, что в сахарозном микроокружении увеличивается отрицательный поверхностный заряд плазматической мембраны [3], что повышает степень связывания белков с мембраной. При этом адсорбция изолированных белков вызывает локальные перемещения липидов в мембране, их концентрирование в местах связывания белков и формирование доменов [5], что, в свою очередь, приводит к нестабильности плазматической мембраны и может быть причиной латерального фазового разделения мембраны [7], в результате которого нарушаются барьерные свойства мембран и клетки погибают. Кроме того, изменение локализации липидов в

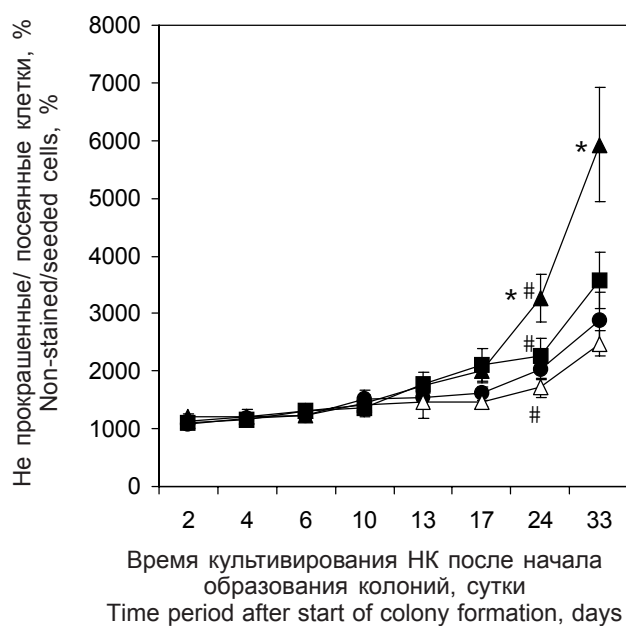


Рис. 5. Размер колоний, образованных в процессе культивирования НК после первых суток ГХ: ● – контроль; △ – среда DMEM/F12 без сыворотки; ▲ – среда DMEM/F12 с сывороткой; □ – ССР без сыворотки; * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с 33-ми сутками культивирования, $p < 0,05$.

Fig. 5. The size of the colonies formed during culturing of NC after one day of HS: ● – control; △ – serum-free DMEM/F12 medium; ▲ – DMEM/F12 medium enriched with serum; □ – serum-free SBS; * – statistically significant differences comparing with data for control, $p < 0.05$; # – statistically significant differences comparing with the the data for the 33rd day of culture, $p < 0.05$.

In cell cultures, which were subjected to HS for 2 days, the number of colonies increased insignificantly, and their area was smaller than the control (Fig. 6).

When culturing NCs kept in hypothermic conditions for 3 or 4 days, regardless of the storage medium, we observed the formation of small loose aggregates that were not attached to the substrate, and their cells died during culture. Several single cells attached, but did not spread.

Thus, our investigations have shown that the maximum time for HS, which allow to preserve the peculiarities of NCs isolated from brain tissue of newborn rats at the level of freshly isolated ones, is 2 days: differentiated NCs are attached and spreaded, and stem/progenitor NCs proliferate and differentiate. The optimal storage medium for this case is DMEM/F12 enriched with serum, that can be attributed to the similarity of its content and intracellular environment of an organism.

The loss of ability of NCs subjected to HS in serum-enriched SBS to form aggregates, which cells proliferate and attach to the substrate *in vitro*, can be

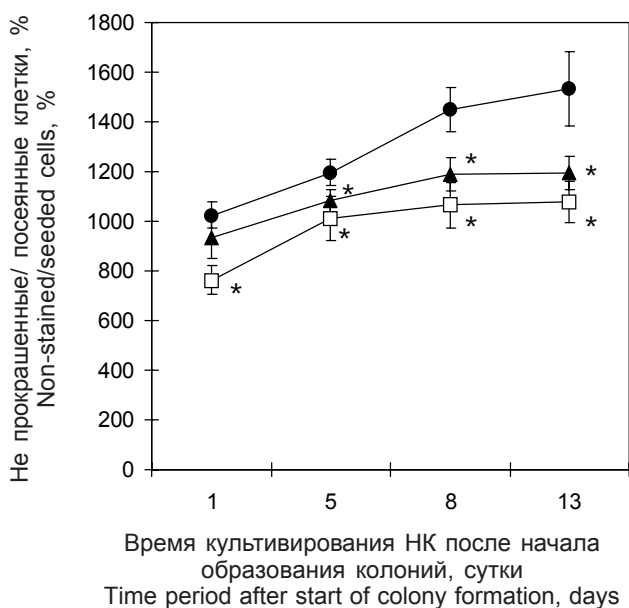


Рис. 6. Размер колоний, образованных в процессе культивирования НК после 2-х суток ГХ: ● – контроль; ▲ – среда DMEM/F12 с сывороткой; □ – ССР без сыворотки; * – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 6. The size of the colonies formed during culturing of NC after one day of HS: ● – control; ▲ – DMEM/F12 medium enriched with serum; □ – serum-free SBS; * – statistically significant differences comparing with data for the control, $p < 0.05$.

мембране может приводить к трансформации ее архитектуры и затруднять связывание регуляторных белков с рецепторами, а также препятствовать прикреплению клеток к подложке.

Проведенные исследования также показали, что ГХ на протяжении одних суток, несмотря на снижение количества не прокрашенных клеток, не приводит к существенному ухудшению поведения НК в процессе их культивирования. При этом лишь замедляется прикрепление агрегатов, сформированных этими клетками. Это можно объяснить, с одной стороны, тем, что жизнеспособность НК, определенная по трипановому тесту, лишь частично коррелирует с их функциональной активностью, а с другой – развитием в процессе ГХ нелетальных повреждений клеток, восстановление которых требует определенного времени в процессе их культивирования. При хранении НК на протяжении 2-х суток количество нелетальных повреждений повышается, что проявляется в увеличении времени прикрепления агрегатов к подложке и снижении скорости формирования монослоя. Появление нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток в те же сроки, что и у контрольных клеток, указывает на их сохранность при хранении в гипотермических условиях на протяжении 2-х суток.

Гипотермическое хранение НК новорожденных крыс в исследованных средах на протяжении 3-х и более суток приводит к их гибели: клетки утрачивают способность к формированию агрегатов, прикреплению и распластыванию.

Выводы

Гипотермическое хранение нервных клеток в среде DMEM/F12 и ССР на протяжении 2-х суток позволяет сохранять популяции дифференцирован-

explained by the combined effect of sucrose and serum proteins on the plasma membrane. The negative surface charge of the plasma membrane is known to increase in sucrose microenvironment [3], that in its turn increases the binding of proteins to the membrane. Moreover the adsorption of isolated proteins causes local transposition of lipids in the membrane, their concentrating in protein binding sites and formation of domains [5], that subsequently leads to instability of plasma membrane and can cause lateral phase separation of the membrane [7] with following disturbance of membrane barrier properties and cell death. In addition, the changes in location of lipids in the membrane can lead to the structural transformations, obstacles in the binding of regulatory proteins and receptors and restricted attachment of cells to the substrate.

The conducted studies also showed that the HS during one day did not lead to significant changes in behavior of NCs during their culturing despite the decrease in the number of non-stained cells. Herewith the attachment of aggregates formed by these cells was slower. This can be explained, on the one hand, by the fact that the viability of NCs, assessed by Trypan blue test, correlates only partially with their functional activity, and on the other, that HS is accompanied with development of non-lethal cell damages, which reparation requires some time during their culturing. Storage of NCs during 2 days led to the increase in number of non-lethal damages, and this fact was manifested in the increasing of time period for aggregates' attaching to the substrate and reduced rate of monolayer formation. The appearance of neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells in the same terms like for the control cells indicates their survival during storage in hypothermic conditions for 2 days.

ных и стволовых/прогениторных нервных клеток новорожденных крыс.

Присутствие сыворотки в среде DMEM/F12 улучшает, а в ССР ухудшает жизнеспособность НК в процессе ГХ.

Литература

1. Сукач А.Н., Ляшенко Т.Д. Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №4. – С. 395–405.
2. Патент № 16946 України, МПК 5 С 12 N 5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Л.П. Кравченко, А.М. Андрієнко, О.А. Семенченко, А.М. Білоус. – № 4684421/SU; Заявлено 20.02.89; Опубл. 29.08.97, Бюл. №4.
3. Bernhardt I., Hall A.C., Ellory J.C. Effects of low ionic strength media on passive human red cell monovalent cation transport // J. Physiol. – 1991. – Vol. 434. – P. 489–506.
4. Deng H., Han H. S., Cheng D. et al. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation // Stroke. – 2003. – Vol. 34, №10. – P. 2495–2501.
5. Hinderliter A., Biltonen R.L., Almeida P.F. Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43, №22. – P. 7102–7110.
6. Kanagawa T., Fukuda H., Tsubouchi H. et al. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat // Brain Res. – 2006. – Vol. 1111, №1. – P. 36–40.
7. Mbamala E. C., Ben-Shaul A., May S. Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 88, №3. – P. 1702–1714.
8. Palmer T.D., Schwartz P.H., Taupin P. et al. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death // Nature. – 2001. – Vol. 411, №3. – P. 42–43.
9. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol. – 1976. – Vol. 13, №1. – P. 29–83.
10. Xiong M., Cheng G.Q., Ma S.M. et al. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain // Neurochem. Int. – 2011. – Vol. 58, №6. – P. 625–633.
11. Zhang R.L., Zhang Z.G., Zhang L., Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia // Neuroscience. – 2001. – Vol. 105, №1. – P. 33–41.

Поступила 25.06.2012

Hypothermic storage of NCs of newborn rats in the studied media during 3 days and more results in their death: cells lose their ability to form aggregates, to attach and spread.

Conclusion

Hypothermic storage of neural cells in the medium DMEM/F12 and SBS for 2 days allows to preserve the populations of differentiated and stem/progenitor neural cells of newborn rats.

The presence of serum in the medium DMEM/F12 improves the viability of NCs during HS and in the case of SBS *vice versa* deteriorates it.

References

1. Sukach A.N., Lyashenko T.D. The effect of DMSO of different concentrations and freeze-thawing on newborn rat neural cell survival // Problems of Cryobiology. – 2011. – Vol. 21, N4. – P. 395–405.
2. Patent of Ukraine Nr. 16946, IPC 5 C 12 N 5/00. Solution for hypothermic storage of isolated hepatocytes / L.P. Kravchenko, A.M. Andrienko, O.A. Semenchenko, A.M. Belous. – Nr. 4684421/SU; Filed 20.02.89; Publ. 29.08.97, Bul. Nr. 4.
3. Bernhardt I., Hall A.C., Ellory J.C. Effects of low ionic strength media on passive human red cell monovalent cation transport // J. Physiol. – 1991. – Vol. 434. – P. 489–506.
4. Deng H., Han H. S., Cheng D. et al. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation // Stroke. – 2003. – Vol. 34, N10. – P. 2495–2501.
5. Hinderliter A., Biltonen R.L., Almeida P.F. Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43, N22. – P. 7102–7110.
6. Kanagawa T., Fukuda H., Tsubouchi H. et al. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat // Brain Res. – 2006. – Vol. 1111, N1. – P. 36–40.
7. Mbamala E. C., Ben-Shaul A., May S. Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes // Biophysical Journal. – 2005. – Vol. 88, N3. – P. 1702–1714.
8. Palmer T.D., Schwartz P.H., Taupin P. et al. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death // Nature. – 2001. – Vol. 411, N3. – P. 42–43.
9. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol. – 1976. – Vol. 13, N1. – P. 29–83.
10. Xiong M., Cheng G.Q., Ma S.M. et al. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain // Neurochem. Int. – 2011. – Vol. 58, N6. – P. 625–633.
11. Zhang R.L., Zhang Z.G., Zhang L., Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia // Neuroscience. – 2001. – Vol. 105, N1. – P. 33–41.

Accepted 25.06.2012