

# Влияние экстрактов тканей мозга и печени на гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс

М.В. Шевченко

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

## Influence of Brain and Liver Tissue Extracts on Hypothermic Storage of Newborn Rat Neural Cells

M.V. Shevchenko

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

Целью работы явилось изучение роли микроокружения на поведение в культуре изолированных нервных клеток головного мозга новорожденных крыс до и после гипотермического хранения (ГХ).

Нервные клетки (НК), полученные из ткани мозга новорожденных крыс, культивировали в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной 10% сыворотки крови крыс. Клетки хранили в течение 1, 2, 3 и 4 суток при температуре 8°C в DMEM/F12 и сахарозо-солевом растворе (ССР). Среду хранения обогащали 10% сыворотки крови крыс, экстрактами мозга (ЭМ) и печени (ЭП) новорожденных крыс.

В культуре свежвыделенные НК формировали агрегаты, которые после прикрепления формировали монослой, состоящий из клеток глии и нейронов. На монослой впоследствии появлялись колонии стволовых/прогениторных клеток. Независимо от используемой среды и присутствия экстрактов, ГХ приводило к снижению как общего количества клеток, так и количества клеток, которые не прокрашивались трипановым синим. Присутствие сыворотки не влияло на изменение концентрации НК в процессе ГХ и оказывало небольшое положительное влияние на сохранность интактных клеток. Хранение на протяжении 1-х суток в среде DMEM/F12 с сывороткой и без нее, а также в ССР без сыворотки не влияло на поведение НК в культуре по сравнению с контролем. В присутствии как ЭМ, так и ЭП в среде DMEM/F12 происходили более позднее прикрепление агрегатов к подложке и более позднее появление на монослойе нейробластов. В присутствии ЭП в ССР нейробласты и колонии НК не появлялись. В течение 2-х суток ГХ в среде DMEM/F12 в присутствии как сыворотки, так и ЭП или ЭМ практически не влияло на поведение клеток в культуре. При отсутствии сыворотки и экстрактов в DMEM/F12 НК в культуре формировали лишь небольшие участки монослоя. Культивирование НК после хранения в ССР без сыворотки или в присутствии ЭМ приводило к формированию небольшого количества нейробластов и колоний, которые появлялись в более поздние сроки по сравнению с контролем. При культивировании НК, хранившихся в ССР с сывороткой, формировались мелкие агрегаты, не прикреплявшиеся к подложке. Добавление ЭП в ССР способствовало прикреплению части агрегатов и формированию небольших участков монослоя. Культивирование НК после 3-х суток ГХ независимо от используемой среды характеризовалось формированием мелких рыхлых агрегатов, которые не прикреплялись к подложке и в дальнейшем погибали.

Таким образом, добавление сыворотки или экстрактов в среду DMEM/F12 позволяет сохранять популяции стволовых/прогениторных и дифференцированных НК на протяжении 2-х суток ГХ. Присутствие сыворотки или ЭП в ССР оказывает отрицательное влияние на сохранность НК новорожденных крыс независимо от срока их ГХ.

The aim of the work was to study the influence of the microenvironment on isolated newborn rat neural cells (NC) behaviour in culture before and after their hypothermic storage (HS).

NC were isolated from the brain tissue of newborn rats and cultured of 2 mln cells per ml concentration in DMEM/F12 medium supplemented with 10% rat blood serum. Cells were stored for 1, 2, 3 and 4 days at 8°C in DMEM/F12 medium and sucrose-based solution (SBS). The medium was supplemented with 10% rat blood serum and brain (BE) or liver extracts (LE).

In culture the freshly isolated NC formed aggregates. After attachment to the substrate they formed a monolayer that consisted of glial cells and neurons. Stem/progenitor cell colonies appeared on the monolayer by further culturing. Regardless of medium or the presence of extracts HS caused the reduction of the NC concentration and the number of cells that excluded the trypan blue. The presence of serum did not influence the change of NC concentration during the HS and had a little positive effect on the preservation of intact cells. One day of HS in DMEM/F12, with or without serum, and in SBS without serum, did not influence the behavior of NC in culture if compared to the control. The presence of BE and LE in DMEM/F12 caused the later attachment of aggregates to the substrate and the later appearance of neuroblasts on the monolayer. In the presence of LE in SBS the appearance of neuroblasts and forming of colonies were not observed. Two days of HS in DMEM/F12 in the presence of serum or extracts almost did not affect the behavior of cells in culture. Being in serum-free and extract-free DMEM/F12 the cells only formed small areas of monolayer. Cultivation of NC that were stored in SBS without serum or supplemented with BE, resulted in formation of a small amount of neuroblasts and colonies, moreover they appeared later if compared to the control. Culturing of NC that were stored in SBS with serum led to appearance of small loosely-packed aggregates, not attached to the substrate. Supplementing the SBS with LE resulted in attachment of the part of aggregates to the substrate and formation of small areas of monolayer. The cultivation of NC after 3 days of HS, regardless of medium used, was characterized by forming of small-sized loosely packed aggregates that did not attach to the substrate and died during further cultivation.

Thus, the supplementing of DMEM/F12 medium with serum or extracts allowed to preserve the populations of stem/progenitor and differentiated NC within two days of HS. The presence of serum or LE in SBS had a suppressive effect on preservation of newborn rat NC regardless of HS duration.

