

УДК 612.015.21:611.018.82:615.014.41

М.В. Шевченко\*, А.Н. Сукач

## Влияние экстрактов головного мозга и печени на эффективность гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс

UDC 612.015.21:611.018.82:615.014.41

M.V. Shevchenko\*, A.N. Sukach

### Effect of Brain and Liver Extracts on Outcome of Hypothermic Storage of Newborn Rat Derived Neural Cells

**Реферат:** Изучали влияние гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в сахарозо-содержащем растворе и солевой среде DMEM/F-12 в присутствии сыворотки или экстрактов печени/головного мозга на их поведение в культуре. Показано, что гипотермическое хранение в DMEM/F-12 с сывороткой или экстрактами печени/головного мозга, а также в сахарозо-солевом растворе без сыворотки или с экстрактом головного мозга позволяет сохранять популяции дифференцированных и стволовых/прогениторных клеток в течение 2-х суток. Гипотермическое хранение более 2-х суток приводит к гибели нервных клеток новорожденных крыс. При этом процессе гипотермического хранения в среде DMEM/F-12 экстракт головного мозга/печени наряду с сывороткой увеличивают показатель выживаемости нервных клеток новорожденных крыс, а при гипотермическом хранении в сахарозо-содержащем растворе экстракт головного мозга оказывает положительное, а экстракт печени отрицательное влияние на выживаемость нервных клеток. Полученные результаты позволяют утверждать, что экстракты печени и головного мозга эффективно заменяют сыворотку при гипотермическом хранении нервных клеток в среде DMEM/F-12.

**Ключевые слова:** новорожденные крысы, нервные клетки, экстракт головного мозга, экстракт печени, гипотермическое хранение, культивирование.

**Реферат:** Вивчали вплив гіпотермічного зберігання ізолюваних нервових клітин новонароджених щурів у сахарозовмісному розчині та соловому середовищі DMEM/F-12 з сироваткою чи екстрактами печінки/головного мозку на їхню поведінку в культурі. Показано, що гіпотермічне зберігання в DMEM/F-12 з сироваткою або екстрактами печінки/головного мозку, а також у сахарозо-соловому розчині без сироватки або з екстрактом головного мозку дозволяє зберігати популяції диференційованих і стовбурових/прогениторних клітин протягом більше 2-х діб. Гіпотермічне зберігання більше 2-х діб призводить до загибелі нервових клітин новонароджених щурів. При цьому в процесі гіпотермічного зберігання в середовищі DMEM/F-12 екстракт головного мозку/печінки нарівні з сироваткою збільшують показник виживаності нервових клітин новонароджених щурів, а при гіпотермічному зберіганні у сахарозо-вмісному розчині екстракт головного мозку здійснює позитивний, а екстракт печінки негативний вплив на виживаність нервових клітин. Одержані результати дозволяють стверджувати, що екстракти печінки та головного мозку замінюють сироватку при гіпотермічному зберіганні нервових клітин у середовищі DMEM/F-12.

**Ключові слова:** новонароджені щури, нервові клітини, екстракт головного мозку, екстракт печінки, гіпотермічне зберігання, культивування.

**Abstract:** The behavior of isolated neural cells of newborn rats in culture after hypothermic storage in sucrose-based solution and saline medium DMEM/F-12 in the presence of serum or brain and liver extracts was studied. Hypothermic storage in saline medium DMEM/F-12 in the presence of serum or liver and brain extracts and sucrose-based solution without serum or in the presence of brain extract allows to preserve the differentiated and stem/progenitor cells populations for 2 days. The hypothermic storage of cells for more than this period results in their death. During the hypothermic storage in DMEM/F-12 the brain/liver extracts together with the serum augment the survival rate for newborn rats neural cells, and under hypothermic storage in sucrose-based solution the brain and liver extracts cause positive and negative effects, respectively, on neural cell survival. It was found that the brain and liver extracts allow to effectively substitute the serum during the hypothermic storage of neural cells in DMEM/F-12 medium.

**Key words:** newborn rats, neural cells, brain extract, liver extract, hypothermic storage, culturing.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию нервных стволовых и прогениторных клеток человека и животных. При этом, если эмбриональное развитие нервной системы человека и животных изучено достаточно хорошо [10, 11,

A great attention is paid currently to investigations of human and animal neural stem and progenitor cells. Embryonic development of human and animal nervous system has been studied quite well [4, 7, 12, 17, 19], meanwhile, the processes of neuro- and gliogenesis in

Отдел криобиохимии, 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: mariia\_shevchenko1981@ukr.net

Поступила 09.09.2014  
Принята в печать 29.10.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №1. – С. 13–23.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiochemistry, 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: mariia\_shevchenko1981@ukr.net

Received September, 09, 2014  
Accepted October, 29, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(1): 13–23.  
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

15, 17, 19], то процессы нейро- и глиогенеза в постнатальном мозге исследованы не в полной мере. Адекватной моделью для изучения механизмов самовозобновления и дифференцировки постнатальных нервных стволовых/прогениторных клеток, а также для исследования особенностей формирования ткани мозга у новорожденных могут быть изолированные клетки постнатальных нервных тканей животных. Для их эффективного использования важна разработка соответствующих способов хранения. Чаще всего данные клетки хранят при низких температурах; помещение в гипотермические условия может дополнять или быть альтернативой замораживанию. Для эффективного гипотермического хранения (ГХ) необходимо создание условий, при которых нервные клетки (НК) будут подвергаться минимальным повреждениям. Известно, что для нормального функционирования клеток важно их микроокружение (разные виды клеток, факторы роста, молекулы адгезии и внеклеточного матрикса) [7–9, 13]. В процессе выделения клеток происходит частичная утрата компонентов их микроокружения, что может приводить к их повреждению и гибели, особенно в процессе хранения. Многие из факторов микроокружения содержатся в сыворотке крови и экстрактах тканей животных и человека [5, 14, 18], добавление которых к средам может повышать эффективность хранения изолированных нервных клеток в гипотермических условиях. Использование сыворотки сопряжено с определенными трудностями, связанными с ее иммуногенностью и цитотоксичностью. Биологически активные вещества, которые содержатся в экстрактах тканей, имеют разный качественный и количественный состав [1]. Поэтому при использовании экстрактов в качестве источников, содержащих элементы микроокружения, необходимо учитывать их видо- и тканеспецифичность.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было сравнительное исследование влияния экстракта головного мозга, экстракта печени новорожденных крыс и сыворотки на эффективность гипотермического хранения изолированных постнатальных нервных клеток головного мозга крыс.

### Материалы и методы

Нервные клетки выделяли из тканей головного мозга новорожденных крыс. Для этого ткань мозга инкубировали в 0,25%-м растворе трипсина 10 мин при 37°C, переносили в среду DMEM/F-12 («Sigma», США), содержащую 10% сыворотки крови взрослых крыс (СКБК) и дезагрегировали на единичные клетки. Полученную суспензию пропус-

a postnatal brain are still not fully understood. The isolated cells derived from newborn animal nervous tissue may be an adequate model to study the mechanisms of self-renewal and differentiation of postnatal neural stem/progenitor cells, as well as to investigate the peculiarities of brain tissue formation in newborns. Of importance is to develop the appropriate storage technique for their efficient application. These cells are most often stored at low temperatures, but storage under hypothermic conditions may either supplement or be an alternative way to freezing. For an efficient hypothermic storage (HS) it is necessary to create the conditions, when neural cells (NCs) will get only minimum injuries. The microenvironment of cells (different cell types, growth factors, adhesion molecules and extracellular matrix) is known to be very important for their normal functioning [1–3, 10]. During cell isolation a partial loss of components from their microenvironment occurs, that may result in their damage and death, particularly during storage. Animal and human blood serum and tissue extracts comprise many of the microenvironment factors [5, 11, 18], and it is possible to improve the efficiency of isolated neural cells storage under hypothermic conditions if supplementing them into the media. The use of serum is accompanied with the certain difficulties because of its immunogenicity and cytotoxicity. The biologically active substances, containing in tissue extracts have different qualitative and quantitative composition [6]. Therefore, when using the extracts as the sources, comprising microenvironmental elements, we should take their species- and tissue specificity into account.

Proceeding from the mentioned above this research was aimed to study the effect of the newborn rat-derived brain extract as compared to that of liver and serum on the efficiency of hypothermic storage of postnatal neural cells isolated from rat brain.

### Materials and methods

The NCs were derived from newborn rat brain tissues. For this purpose the brain tissue was incubated in 0.25% trypsin solution for 10 min at 37°C, then transferred into DMEM/F-12 medium (Sigma, USA), containing 10% adult rat blood serum (ARBS) and disaggregated into single cells. The resulting suspension was passed through a nylon filter and washed free of trypsin using 1.5 min centrifugation (100g). After supernatant removal the cells were resuspended with medium for HS. The NCs suspension in 40–50 mln/ml concentration was stored at 8°C for 1, 2, 3 and 4 days in DMEM/F-12, enriched with 0.6% glucose solution, 2 mM glutamine, 3 mM sodium bicarbonate, and sucrose based solution (SBS) [8], using 10% ARBS and without it. Brain or liver extracts were supplemented to the serum-free medium for HS in



кали через капроновый фильтр и отмывали от трипсина при 1,5-минутном центрифугировании (100g). После удаления надосадочной жидкости к клеткам добавляли среду для ГХ. Суспензию НК в концентрации 40–50 млн/мл хранили при температуре 8°C в течение 1, 2, 3 и 4-х суток в среде DMEM/F-12, обогащенной 0,6%-м раствором глюкозы, 2 мМ глутамина, 3 мМ бикарбоната натрия и сахарозо-солевом растворе (ССР) [6] с использованием 10% СКВК и без нее. Экстракт мозга или печени добавляли в бессывороточную среду для ГХ в концентрации 0,3 мг белка/мл. Контролем служили свежeweделенные НК, которые не подвергались ГХ.

Жизнеспособность клеток оценивали по трипановому тесту [16], а подсчет их количества проводили в камере Горяева.

Свежeweделенные НК и клетки после ГХ культивировали в концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл в 24-луночных пластиковых планшетах («Corning», США) в обогащенной среде DMEM/F-12 с 10% СКВК в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и влажности воздуха 95%. Среду культивирования меняли каждые 3–4 суток. Экстракты добавляли в среду культивирования свежeweделенных НК в концентрации 0,1; 0,2 и 0,3 мг белка/мл.

Микрофотосъемку культур проводили на световом инвертированном микроскопе MT3000 («AmScope», США).

Динамику образования монослоя оценивали по изменению его размеров в процессе культивирования.

Для приготовления экстрактов использовали ткань головного мозга и печени новорожденных крыс, которую после извлечения гомогенизировали в равном объеме среды DMEM/F-12 и центрифугировали при 7000g в течение 10 мин. Супернатанты стерилизовали, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore», США). Содержание белка в экстрактах определяли по методу Лоури [12]. Все манипуляции по получению экстрактов проводили в стерильных условиях при температуре 4°C. Экстракты хранили при температуре –20°C.

Для получения СКВК взрослых беспородных белых крыс декапитировали под эфирным наркозом. Собранную кровь помещали в холодильник (8°C) на 15 мин для активации процессов свертывания, затем ее центрифугировали при 1500g в течение 15 мин. Сыворотку стерилизовали, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore»), аликвотировали и хранили при температуре –18°C.

Результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента с использованием программы «Excel» («Microsoft», США).

0.3 mg of protein/ml concentration. The freshly isolated NCs without HS served as the control.

The viability of cells was assessed by Trypan blue test [13], and their number was counted in Goryaev's chamber.

Freshly isolated NCs and cells after HS were cultured in  $2 \times 10^6$  cells/ml concentration using 24-well plastic plates (Corning, USA) in the enriched DMEM/F-12 medium with 10% ARBS in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, in atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air humidity. The culture medium was changed every 3–4 days. The extracts were supplemented to the culture medium of freshly isolated NCs in 0.1, 0.2 and 0.3 mg of protein/ml concentration.

Photomicrography of cultures was performed with light inverted microscope MT3000 (AmScope, USA).

Dynamics of monolayer formation was evaluated by changes in its dimensions during culture.

In order to prepare the extracts we used the newborn rat-derived brain and liver tissues, which were homogenized after extraction in an equal volume of DMEM/F-12 and centrifuged at 7000g for 10 min. Supernatants were sterilized by passing through a filter with 0.22 μm pore diameter (Millipore, USA). Protein content in extracts was determined by the Lowry method [9]. All the manipulations on extract derivation were carried-out aseptically at 4°C. Extracts were stored at –20°C.

To derive ARBS the adult white outbred rats were decapitated under ether anesthesia. The collected blood was placed into refrigerator (8°C) for 15 min to activate coagulation, and then centrifuged at 1500g for 15 min. The serum was sterilized by passing through a filter with 0.22 μm pore diameter (Millipore, USA), aliquoted and stored at –18°C.

The results were statistically processed with Student's t-test using Excel software (Microsoft, USA).

Experiments were performed in accordance with the General Principles of Experiments in Animals approved by the 5<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

## Results and discussion

In experiments we used the freshly isolated NCs suspension, the viability of which made 26–32%. To study the efficiency rate of extracts influence we supplemented the culture medium (containing ARBS) with brain and liver extracts (BE and LE, correspondingly).

As it was shown previously [16], the brain cells, freshly isolated from newborn rats were the heterogeneous suspension, comprising in addition to the finally differentiated cells, the stem and progenitor ones,

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

### Результаты и обсуждение

В экспериментах использовали свежeweыделенную суспензию НК, жизнеспособность которой составляла 26–32%. Для изучения эффективности влияния экстрактов в среду культивирования (содержащую СКВК) добавляли экстракты мозга (ЭМ) и печени (ЭП).

Как было показано ранее [2], свежeweыделенные клетки мозга новорожденных крыс являются гетерогенной суспензией, в состав которой, помимо окончательно дифференцированных, входят стволовые и прогениторные клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться в условиях культивирования *in vitro*. В процессе культивирования в присутствии СКВК нервные клетки новорожденных крыс формируют агрегаты, в которых воссоздается утерянное в процессе их выделения клеточное микроокружение и происходит восстановление клеток. При этом плотность упаковки клеток в агрегатах может увеличиваться и в результате агрегаты превращаются в сфероиды. Часть агрегатов в процессе культивирования сливается. После прикрепления к подложке клетки агрегатов начинают мигрировать и расплываться. Мигрирующие клетки характеризуются как глиальной, так и нейрональной морфологией. Клетки с нейрональной морфологией являются  $\beta$ -тубулин III-положительными [2]. После образования глиальными клетками монослоя на нем появляются нейробласты и колонии нестин/виментин-положительных стволовых/прогениторных клеток [2].

Поведение НК, которые культивировали в среде, содержащей любую из использованных концентраций ЭМ и 0,1 мг белка/мл ЭП, не отличалось от контрольных клеток (табл. 1). В результате культивирования НК с ЭП в концентрации 0,2 и 0,3 мг белка/мл агрегаты начинали прикрепляться к подложке позже по сравнению с контролем. При этом в течение всего времени культивирования к подложке прикрепилось не более 75% агрегатов. В присутствии ЭП в концентрации 0,2 мг белка/мл колонии недифференцированных клеток на монослое не формировались. В среде культивирования с ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл клеточный монослой занимал не более 50% площади поверхности лунки, при этом ни нейробластоподобные

capable to proliferate and differentiate under *in vitro* culture conditions. During culturing, in the presence of ARBS the newborn rat-derived neural cells formed the aggregates, where a cellular microenvironment, lost during their isolation, was restored and the cell recovery occurred. In this case the density of cell packing in aggregates might increase and raw aggregates thereby could transform into spheroids. Some aggregates during culturing were fused together. After attaching to substrate the cells of aggregates begun to migrate and flatten. Migrating cells were characterized by both glial and neuronal morphology. Cells with neuronal morphology were  $\beta$ -tubulin III-positive ones [16]. After the monolayer was formed by glial cells, the neuroblasts and nestin/vimentin-positive stem/progenitor cell colonies appeared on it [16].

The behaviour of NCs, cultured in the medium, containing any of the studied concentrations of BE and 0.1 mg of protein/ml of LE, did not differ from the control cells (Table 1). The NCs culturing with LE in 0.2 and 0.3 mg protein/ml concentration resulted in a later start of aggregate attachment to the substrate, if compared to the control. In this case, during all the culture time no more than 75% aggregates attached to the substrate. In the presence of BE in 0.2 mg protein/ml concentration no colonies of non-differentiated cells were formed in a monolayer. In culture medium with LE in 0.3 mg protein/ml concentration a cell monolayer occupied no more than 50% of surface area of the well, and no appearance of neuroblast-like cells and colonies of stem/progenitor cells was observed (Table. 1).

Based on these data, the concentration of 0.3 mg protein/ml for BE was established to be the most efficient in the effect produced on NCs. In further work we used BE in 0.3 mg protein/ml concentration, and to control the specificity of BE action the neural cells were stored at the same concentration of LE.

In experiments on studying the extracts impact on HS efficiency we used a heterogeneous population of freshly isolated NCs with the viability of  $(28.8 \pm 1.2)\%$ , which were stored in DMEM/F-12 saline medium and SBS, enriched with BE and LE in 0.3 mg protein/ml concentration. The ARBS-enriched DMEM/F-12 medium was used as the control. The presence of serum in SBS was previously demonstrated to reduce the NCs viability during HS [15], therefore we used here serum-free SBS for storage. The control cells formed aggregates, the cells of which after attachment migrated and formed the monolayer, consisting of glial cells and neurons. Neuroblasts and undifferentiated nestin-vimentin-positive cell colonies appeared on monolayer (Table. 1).

Every 24 hrs of storage we counted a total number of cells and that of non-stained with Trypan blue.



клетки ни колонии стволовых/прогениторных клеток на нем не появлялись (табл. 1).

На основании полученных данных было установлено, что концентрация 0,3 мг белка/мл для ЭМ наиболее эффективна в оказываемом на НК действии. В дальнейшей работе мы использовали ЭМ в концентрации 0,3 мг белка/мл, а для контроля специфичности действия ЭМ нервные клетки хранили при такой же концентрации ЭП.

В экспериментах по изучению влияния экстрактов на эффективность ГХ использовали гетерогенную популяцию свежeweделенных НК с жизнеспособностью  $(28,8 \pm 1,2)\%$ , которые хранили в солевой среде DMEM/F-12 и ССР, обогащенных ЭМ и ЭП в концентрации 0,3 мг белка/мл. В качестве контроля использовали среду DMEM/F-12, обогащенную СКВК. Ранее было показано, что присутствие сыворотки в ССР снижает жизнеспособность НК в процессе ГХ [4], поэтому в данном исследовании для хранения мы использовали ССР без сыворотки. Контрольные клетки формировали агрегаты, клетки которых после прикрепления мигрировали и образовывали монослой, состоящий из клеток глии и нейронов. На монослое появлялись нейробласты и колонии недифференцированных нестинвизментин-положительных клеток (табл. 1).

Каждые 24 ч хранения подсчитывали общее количество и количество не прокрашенных трипановым синим клеток. После этого клетки сеяли и культивировали. В культуре отмечалось начало формирования агрегатов, изменение их размеров и плотности упаковки, прикрепление к подложке, миграция клеток агрегатов, скорость формирования и размеры монослоя, время появления нейробластов и колоний недифференцированных клеток.

Проведенные исследования показали, что в процессе ГХ концентрация НК снижалась независимо от среды хранения и присутствия в ней экстрактов (рис. 1). После 4-х суток хранения концентрация клеток составляла 20,8–26,2% от исходной. После суток ГХ в ССР независимо от присутствия экстрактов количество клеток резко снижалось, при

**Таблица 1.** Влияние разных концентраций ЭП и ЭМ на стадии культивирования НК новорожденных крыс

**Table 1.** Effect of differently concentrated LE and BE at the stage of newborn rat NCs culturing

Стадии культивирования НК NC culture milestones	Контроль Control	Концентрация ЭМ, мг белка/мл BE concentration, mg of protein/ml			Концентрация ЭП, мг белка/мл LE concentration, mg of protein/ml		
		0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
Начало прикрепления агрегатов, сутки Start of aggregate attachment, day	1	1–2	1–2	1–2	1–2	3	3
Прикрепление 90% агрегатов, сутки Attachment of 90% aggregates, day	4–5	5	5	5	5	–	–
Миграция клеток от агрегатов, сутки Cell migration from aggregates, day	3–4	4	4	4	4	5–6	5–6
Начало формирования монослоя, сутки Start of monolayer formation, day	2	2	2	2	2	2	4
Формирование 70% монослоя, сутки Formation of 70% monolayer, day	6–7	7	6–7	5–6	7	7–8	–
Появление нейробластов, сутки Neuroblast appearance, day	6–7	6–7	6–7	6	6–7	6–7	–
Формирование колоний НК, сутки NCs colonies formation, day	9–13	13	13	9–11	13	–	–

Afterwards the cells were plated and cultured. In the culture there were noted the beginning of aggregate formation, a change in their dimensions and packing density, attachment to substrate, migration of aggregate cells, rate of monolayer formation and dimensions, time of neuroblasts and non-differentiated cell colonies appearance.

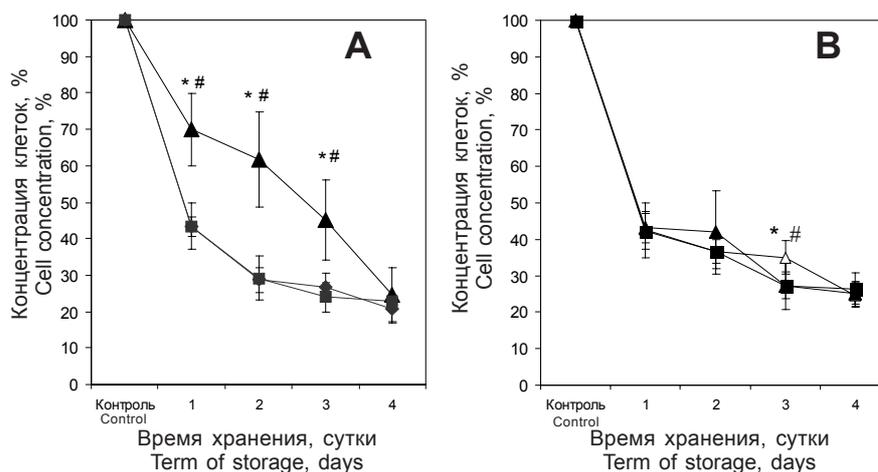
The performed research demonstrated the NCs concentration to reduce during HS independently on the storage medium and presented in it extracts (Fig. 1). After 4 day long storage the cell concentration made 20.8–26.2% of the initial one. After 1 day long HS in SBS independently on the presented extracts a number of cells was sharply decreased, and with further storage it reduced slightly. During the whole storage period a number of NCs in DMEM/F-12 was intensively reduced independently on the extract presence. Thus, after 1 day long HS in DMEM/F-12 with ARBS the cell concentration decreased by 30%, but in the pres-

дальнейшем хранении оно уменьшилось незначительно. На протяжении всего срока хранения количество НК в среде DMEM/F-12 независимо от присутствия экстрактов интенсивно снижалось. Так, после суток ГХ в среде DMEM/F-12 с СКВК концентрация клеток снижалась на 30%, а в присутствии экстрактов – на 56% (рис. 1, А). При дальнейшем хранении в среде DMEM/F-12 с СКВК концентрация клеток уменьшалась на 45%, в присутствии экстрактов – на 22%. При этом в присутствии как ЭМ, так и ЭП концентрация клеток в течение всего периода хранения была значимо более низкой, чем в среде DMEM/F-12 с сывороткой.

Результаты анализа количества жизнеспособных клеток (которые не прокрашивались витальным красителем трипановым синим) свидетельствовали, что данный показатель уменьшился (рис. 2). На протяжении всего времени хранения в среде DMEM/F-12, обогащенной СКВК, интенсивно уменьшалось количество непрокрашенных НК; после 4-х суток хранения оно снижалось в 2,5 раза (рис. 2, А). В среде DMEM/F-12 в присутствии экстрактов наиболее интенсивно количество непрокрашенных клеток уменьшалось после суток хранения (в 1,4 раза), в дальнейшем снижалось незначительно, а после 4-х суток хранения – в 1,9 раза. При хранении в ССР количество непрокрашенных клеток наиболее интенсивно снижалось после 1- и 4-х суток хранения – в 1,3 и 1,4 раза соответственно (рис. 2, В). В присутствии в ССР ЭМ на протяжении первых двух суток хранения количество непрокрашенных клеток не изменялось, при дальнейшем хранении оно постепенно уменьшалось.

Гипотермическое хранение клеток в ССР в присутствии ЭП на протяжении суток не оказывало влияния на количество непрокрашенных клеток. При дальнейшем хранении их количество постепенно снижалось, а после 4-х суток уменьшилось в 1,6 раза.

Для определения функциональной активности НК, подвергнутых ГХ, их культивировали в условиях *in vitro*. Установлено, что ГХ на протя-



**Рис. 1.** Изменение количества НК при ГХ в среде DMEM/F-12 (А) и ССР (В):  $\Delta$  – без сыворотки;  $\blacktriangle$  – в присутствии сыворотки;  $\blacklozenge$  – ЭМ;  $\blacksquare$  – ЭП; за 100% принято количество посеянных клеток; \*, # – отличия статистически значимы по сравнению с ЭМ и ЭП соответственно,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Changes in NCs content during HS in DMEM/F-12 (A) and SBS (B):  $\Delta$  – serum-free medium;  $\blacktriangle$  – in the presence of serum;  $\blacklozenge$  – BE;  $\blacksquare$  – LE; 100% was the content of seeded cells; \*, # – differences are statistically significant as compared to BE and LE, respectively,  $p < 0.05$ .

ence of extracts it did by 56% (Fig. 1). During further storage in DMEM/F-12 with ARBS the cell concentration decreased by 45%, and in the presence of extracts it did by 22%. In this case in the presence of both BE and LE the cell concentration during the whole storage period was significantly lower than in DMEM/F-12 with serum.

Analysis of a number of viable cells (not stained with Trypan blue dye) showed this index decreased (Fig. 2). During all the storage time in the ARBS-enriched DMEM/F-12 a number of non-stained NCs was intensively reduced; after 4-day storage it decreased in 2.5 times (Fig. 2). In DMEM/F-12 with presented extracts the most intensive decrease in non-stained cell number was observed after 1 day long storage (1.4 fold), thereafter it reduced slightly, and after 4 day long storage it did in 1.9 times. During storage in SBS a number of non-stained cells decreased most intensively after 1 and 4 day long storage: in 1.3 and 1.4 times, respectively (Fig. 2). If BE was present in SBS, a number of non-stained cells remained unchanged during first two days of storage, during further storage it decreased gradually.

The 1 day long hypothermic storage of cells in SBS in LE presence had no effect on a number of non-stained cells. During following storage their number decreased gradually, and after 4 days it decreased in 1.6 times.

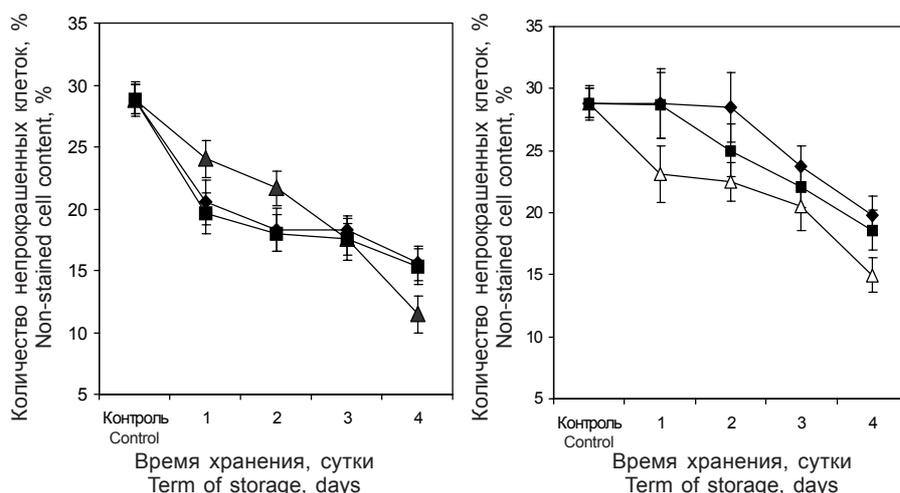
To determine a functional activity of NCs, subjected to HS, they were cultured *in vitro*. The 1 day long HS



жении суток независимо от используемой среды и присутствия в ней экстрактов практически не влияло на поведение клеток в культуре (табл. 2). Гипотермическое хранение клеток в течение 2-х суток во всех исследованных средах, кроме DMEM/F-12 без сыворотки и экстрактов, а также ССР, обогащенной ЭП, не влияло на их способность к образованию агрегатов. Однако при этом увеличивалось время прикрепления агрегатов НК к подложке и снижалась скорость формирования клетками монослоя (табл. 2). Формирование монослоя на 70% площади поверхности лунки происходило на 2–4 суток позже, чем в культуре свежвыделенных НК. Нейробластоподобные клетки на монослое появлялись в более поздние сроки по сравнению с контролем. Время формирования колоний недифференцированных клеток практически не отличалось от контроля (табл. 2). Культивирование НК, которые хранили на протяжении 2-х суток в среде DMEM/F-12 без сыворотки и экстрактов и в ССР обогащенной ЭП, характеризовалось формированием мелких рыхлых агрегатов, большая часть которых к подложке не прикреплялась. Монослой не формировался и в результате данные клетки погибали.

Нервные клетки, хранившиеся на протяжении 3-х и более суток в среде DMEM/F-12 и ССР, независимо от присутствия экстрактов и сыворотки в процессе культивирования формировали мелкие рыхлые агрегаты, которые к подложке не прикреплялись и в процессе культивирования погибали.

Проведенные исследования подтвердили полученные нами ранее данные [5] о том, что ГХ в ССР и DMEM/F-12 приводит к гибели части клеток, поврежденных, очевидно, в процессе выделения [4]. Гибель клеток не зависит от присутствия в средах сыворотки и экстрактов печени и мозга. Кроме того, установлено, что в процессе ГХ уменьшается количество НК, которые не прокрашиваются трипановым синим. Однако, несмотря на такое снижение общей концентрации клеток и клеток, не прокрашенных трипановым синим, их поведение в культуре после суток ГХ существенно не отличалось от поведения свежвыделенных



**Рис. 2.** Изменение количества НК, которые не прокрашивались витальным красителем трипановым синим, при ГХ в среде DMEM/F-12 (А) и ССР (В): △ – без сыворотки; ▲ – в присутствии сыворотки; ◆ – ЭМ; ■ – ЭП; за 100% принято количество посеянных клеток.

**Fig. 2.** Content of NCs, non-stained with Trypan blue dye during HS in DMEM/F-12 (A) and SBS (B): △ – serum-free medium; ▲ – in the presence of serum; ◆ – BE; ■ – LE; 100% was the content of seeded cells.

regardless of the medium used and presented in it extracts was established as virtually not affecting the cell behaviour in culture (Table. 2). The 2 day long hypothermic storage of cells in all the studied media, except DMEM/F-12 without serum and extracts, as well LE-enriched SBS caused no effect on their capability to form aggregates. However, in this case the time of NCs aggregate attachment to substrate increased and the rate of monolayer formation by cells reduced (Table 2). The formation of monolayer occupying 70% surface of the well occurred 2–4 days later, than in the culture of fresh NCs. The neuroblast-like cells appeared on a monolayer at later terms as compared to the control. The time of formation of undifferentiated cells colonies virtually did not differ from the control (Table 2). The culturing of NCs, stored for 2 days in DMEM/F-12 without serum and extracts, and in LE-enriched SBS, was characterized by the formation of small loose aggregates, most of which did not attach to the substrate. Monolayer was not formed and cell died.

Neural cells, stored for 3 days and longer in DMEM/F-12 and SBS, regardless of the presence of extracts and serum, formed small loose aggregates during culturing, which did not attach to the substrate and died thereafter.

These studies confirmed our previously reported data [5], that the HS in SBS and DMEM/F-12 resulted in a death of some cells, obviously damaged during their isolation [15]. Cell death did not depend on the presence in media of serum and liver/brain extracts.

**Таблица 2.** Влияние ГХ в присутствии ЭП и ЭМ в средах DMEM/F-12 и ССР на стадии культивирования НК новорожденных крыс

**Table 2.** Milestones in newborn rat NCs culturing following HS in DMEM/F-12 and SBS supplemented with BE or LE

Срок ГХ, сутки HS term, days	Среда хранения Storage medium	Стадии культивирования НК, сутки Milestones of NCs culturing, days				
		Начало прикрепления агрегатов Beginning of aggregate attachment	Прикрепление 90% агрегатов Attachment of 90% aggregates	Формирование 70% монослоя Formation of 70% monolayer	Появление нейробластов Appearance of neuroblasts	Появление колоний НК Appearance of NCs colonies
0	Контроль Control	1–2	4–5	6	6–7	9–13
1	DMEM/F-12	3	6	6–7	6–7	9–15
	DMEM/F-12 + СВК DMEM/F-12 + ARBS	1–2	6	6	6–7	9–13
	DMEM/F-12 + ЭМ DMEM/F-12 + BE	1–2	6–7	6–7	6–7	12–14
	DMEM/F-12 + ЭП DMEM/F-12 + LE	1–2	6–7	6–7	6–7	12–14
	ССР SBS	1–2	6	6–7	7	9–15
	ССР + ЭМ SBS + BE	1–2	6–7	6–7	7–8	12–14
	ССР + ЭП SBS + LE	1–2	6–7	6–7	7–8	14
2	DMEM/F-12	–	–	–	–	–
	DMEM/F-12 + СВК DMEM/F-12 + ARBS	3	7–8	8	7–8	9–13
	DMEM/F-12 + ЭМ DMEM/F-12 + BE	2–3	7–8	8–10	8	11–13
	DMEM/F-12 + ЭП DMEM/F-12 + LE	2–3	7–8	8–10	8	11–13
	ССР SBS	3	10	9–10	8	12–13
	ССР + ЭМ SBS + BE	3	10	10	8	11–13
	ССР + ЭП SBS + LE	–	–	–	–	–
3	Все среды All the media	–	–	–	–	–
4	Все среды All the media	–	–	–	–	–

клеток. При этом наблюдалось лишь замедление скорости прикрепления агрегатов, сформированных данными клетками. С одной стороны, данный факт можно объяснить тем, что в течение суток ГХ погибает часть клеток, которые в процессе выделения получили летальные повреждения. С другой стороны, клетки в процессе хранения могут получать нелетальные повреждения. При последующем культивировании клеток происходит репарация таких повреждений, о чем может свидетельство-

In addition, a number of NCs, not stained with Trypan blue, was established to reduce during HS. However, in spite of such a reduction of total concentration of cells and those, not stained with Trypan blue, their behaviour in the culture after 1 day long HS did not significantly differ from that of freshly isolated cells. We only observed here the slowing down of attachment rate of the aggregates, formed by these cells. On the one hand, this fact may be explained by the death of some cells, which got lethal damages during isolation



вать увеличение времени, необходимого для прикрепления агрегатов НК и формирования клетками агрегатов монослоя.

В процессе дальнейшего хранения количество поврежденных клеток возрастает, о чем свидетельствует увеличение времени, необходимого для прикрепления агрегатов НК, которые хранили на протяжении 2-х суток, к подложке и снижение скорости формирования монослоя. Во всех культурах НК, которые подвергались ГХ и были способны формировать конфлюэнтный монослой, наблюдалось появление нейробластов и колоний недифференцированных клеток, что указывает на сохранность прогениторных и стволовых НК в процессе хранения.

Кроме того, проведенные исследования показали, что добавление в среду DMEM/F-12 экстрактов мозга и печени новорожденных крыс оказывает влияние, подобное действию сыворотки, увеличивая время эффективного хранения НК до 2-х суток. Это свидетельствует о том, что ЭМ и ЭП, как и сыворотка, содержат специфические факторы, стабилизирующие ионный транспорт и оптимизирующие энергетическое состояние клеток, увеличивая тем самым время эффективного хранения НК.

Отсутствие связи между снижением количества НК, которое наблюдается при ГХ в DMEM/F-12 и ССР, и их поведением в культуре указывает на лизис летально поврежденных клеток, изначально неспособных прикрепляться, распластываться и формировать агрегаты. При этом динамика снижения количества НК в процессе их хранения (рис. 1) также подтверждает тот факт, что лизис более интенсивно протекает в отсутствие сыворотки.

Снижение количества НК, которые не прокрашиваются трипановым синим, наблюдаемое при их хранении в DMEM/F-12 в присутствии как экстрактов, так и сыворотки, может указывать на возникновение повреждений плазматической мембраны. Снижение концентрации НК не оказывало влияния на способность клеток формировать агрегаты, прикрепляться к подложке и распластываться, что может свидетельствовать о том, что эти повреждения не являются летальными и в процессе культивирования восстанавливаются. Кроме того, определение жизнеспособности клеток по трипановому тесту не в полной мере соответствует реальному показателю.

Проведенные исследования также выявили, что присутствие ЭМ оказывает положительное, а ЭП отрицательное влияние на жизнеспособность НК, определенную по трипановому тесту. При этом полученные данные по сохранности НК коррели-

and following 1 day-long HS. On the other hand, the cells might have non-lethal damages during storage. The reparation of these injuries could occur during following cell cultivation, that may be testified by the increment of time, necessary for NCs aggregate attachment, and the monolayer formation by aggregate cells.

During following storage a number of cell injuries augments, that is testified by the increment of time, needed for the attachment of NCs aggregates, stored for 2 days, to the substrate and a decreased rate of monolayer formation. In all the NC cultures, which underwent HS and were capable to form a confluent monolayer, we observed the appearance of neuroblasts and non-differentiated cell colonies, that pointed to the survival of progenitor and stem NCs during storage.

In addition, the performed research demonstrated the supplement of newborn rat brain and liver extracts into DMEM/F-12 as causing the effect, similar to the action of serum, *i. e.* increasing the time for NCs efficient storage up to 2 days. This testifies to the fact that BE and LE, as well as serum, contain specific factors, stabilizing ion transport and optimizing energetic state of cells, thereby increasing an efficient storage time for NCs.

Absence of dependence between a decrease in NCs number, observed under HS in DMEM/F-12 and SBS, and their behavior in culture might indicate the lysis of lethally injured cells, initially incapable of attachment, flattening and aggregate formation. In this case the dynamics of decrease in NCs number within their storage period (Fig. 1, 2) also confirms the fact of more intensive lysis proceeding when no serum was present.

A decreased number of NCs, not stained with Trypan blue, observed during their storage in DMEM/F-12 in the presence of both extracts and serum might indicate the occurrence of injuries in cell membrane. The reduction of NCs concentration did not affect the capability of cells to form aggregates, attach to substrate and flatten, that might testify to the fact that these injuries were not lethal and could be recovered during culturing. In addition, the determination of cell viability by Trypan blue test does not fully correspond to a real index.

The research performed also demonstrated the presence of BE and LE to cause positive and negative affects, respectively, on NCs viability determined by Trypan blue test. In this case our findings on NCs survival correlated with their behavior in culture (Fig. 2, Table 2), that pointed to the tissue specificity of the extract action, manifested if sucrose based solution was used for storage. This was possibly associated with a negative effect of specific factors, contained in BE, and probably with an insufficient number or ab-



руют с их поведением в культуре (рис. 2, В; табл. 2), что указывает на тканеспецифичность действия экстрактов, которое проявляется при использовании для хранения сахарозо-солевого раствора. Возможно, это связано с негативным действием специфических факторов, которые содержатся в ЭМ, а возможно – с недостаточным количеством или отсутствием факторов, специфичных для нервной ткани. В ССР также может проявляться специфическое действие на НК низкомолекулярных веществ (550–6800 Да), состав и количество которых различается в экстрактах мозга и печени [3]. Возможно, в неэлектролитном ССР низкомолекулярные вещества ЭП повышают ионную проницаемость клеточных мембран, что может быть причиной изменения внутриклеточного состава, более интенсивного образования свободных радикалов, активации кальцийзависимых протеаз и фосфолипаз, повреждающих цитоскелет и препятствующих клеточной адгезии.

### Выводы

Экстракт мозга и печени наряду с сывороткой увеличивают выживаемость нервных клеток новорожденных крыс при гипотермическом хранении в среде DMEM/F-12.

Экстракт мозга оказывает положительное, а экстракт печени отрицательное влияние на выживаемость нервных клеток при гипотермическом хранении в ССР.

Гипотермическое хранение в DMEM/F-12 и ССР независимо от присутствия в них сыворотки и экстрактов мозга или печени на протяжении более 2-х суток приводит к гибели нервных клеток новорожденных крыс.

### Литература

1. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 4, №5. – С. 61–74.
2. Сукач А.Н., Ляшенко Т.Д., Шевченко М.В. Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6, №3. – С. 63–68.
3. Шевченко М.В., Семенченко А.Ю., Сукач А.Н. Молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах тканей крыс в зависимости от стадии их развития // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2013. – Т. 2, №103. – С. 103–107.
4. Шевченко М.В., Сукач А.Н. Влияние гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре // *Проблемы криобиологии*. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 423–432.
5. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Чалисова Н.И., Окулов В.Б. Влияние пептидов головного мозга на клетки нервной ткани in vitro // *Цитология*. – 1997. – Т. 39, №7. – С. 571–575.

sence of factors, specific to nervous tissue. During storage of NCs in SBS there could be manifested a specific effect of low molecular weight substances (550–6,800 Da), the composition and amount of which vary in brain and liver extracts [14]. Probably, due to non-electrolyte nature of SBS the low molecular weight substances of LE increase an ion permeability of cell membranes, that may change an intracellular ion composition, intensify the formation of free radicals, activate calcium-dependent proteases and phospholipases, damaging cytoskeleton and preventing cell adhesion.

### Conclusions

Brain and liver extracts, along with serum augment the survival of neural cells of newborn rats during hypothermic storage in DMEM/F-12.

The brain and liver extracts have positive and negative effects, respectively, on neural cell survival during hypothermic storage in SBS.

Hypothermic storage in DMEM/F-12 and SBS independently of the presented in them serum and brain/liver extracts for more than 2 days results in a death of newborn rat neural cells.

### References

1. Alvarez-Buylla A., Lim D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004; 41: 683–686.
2. Condic M.L., Letourneau P.C. Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 1997; 389(6653): 852–856.
3. De Arcangelis A., Georges-Labouesse E. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet* 2000; 16(9): 389–395.
4. Gotz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(10): 777–788.
5. Havinson V.H., Morozov V.G., Chalisova N.I., Okulov V.B. The effect of the brain peptides on cells of nervous tissue in vitro. *Cytology* 1997; 39(7): 571–575.
6. Kaidashev I.P. The tissue specificity of peptide extracts isolated from different organs, and immunoregulatory action of the peptide extract of kidney. *Biopolymers and cell* 1995; 4(5): 61–74.
7. Koch P., Opitz T., Steinbeck J.A. et al. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106 (9): 3225–3230.
8. Kravchenko L.P., Andrienko A.M., Semenchenko O.A. et al. inventors. The solution for hypothermic storage of isolated hepatocytes. Patent of Ukraine N 16946, IPC 5 C12N5/00. 1997 August 29.
9. Lowry O., Rosenbourg R., Farr A. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265–275.
10. Morrison S.J., Spradling A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008; 132 (4): 598–611.
11. Rauch C., Feifel E., Amann E.M. et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *Altex* 2011; 28(4): 305–316.



6. Пат. № 16946, Україна, МПК 5С12N5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Л.П. Кравченко, А.М. Андрієнко, О.А. Семенченко та ін. – № 4684421/SU; заявл. 20.02.1989; опубл. 29.08.1997, Бюл. №4.
7. Alvarez-Buylla A., Lim D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain // *Neuron*. – 2004. – Vol. 41. – P. 683–686.
8. Condic M.L., Letourneau P.C. Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth // *Nature* – 1997. – Vol. 389, № 6653. – P. 852–856.
9. De Arcangelis A., Georges-Labouesse E. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development // *Trends. Genet.* – 2000. – Vol. 16, №9. – P. 389–395.
10. Gotz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6, №10. – P. 777–788.
11. Koch P., Opitz T., Steinbeck J.A. et al. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 106, №9. – P. 3225–3230.
12. Lowry O., Rosenbourg R., Farr A. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265–275.
13. Morrison S.J., Spradling A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life // *Cell*. – 2008. – Vol. 132, №4. – P. 598–611.
14. Rauch C., Feifel E., Amann E.M. et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media // *Altex*. – 2011. – Vol. 28, №4 – P. 305–316.
15. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells // *Brain Res*. – 2001. – Vol. 913, №2. – P. 201–205.
16. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.* – 1976. – Vol. 13, №1. – P. 29–83.
17. Temple S. The development of neural stem cells // *Nat.* – 2001. – Vol. 414. – P. 112–117.
18. Xu X.C., Howard T., Mohanakumar T. Tissue-specific peptides influence human T cell repertoire to porcine xenoantigens // *Transplantation*. – 2001. – Vol. 72, №7. – P. 1205–1212.
19. Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat. Biotech.* – 2001. – Vol. 19. – P. 1129–1133.
20. Schuldiner M., Eiges R., Eden A. et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001; 913(2): 201–205.
21. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth Cell Biol* 1976; 13(1): 29–83.
22. Shevchenko M.V., Semenchenko A.J., Sukach A.N. The molecular-mass distribution of peptides in rat tissues extracts depending on the stage of their development. *Visnyk Problem Biologii i Meditsyny* 2013; 2(103): 103–107.
23. Shevchenko M.V., Sukach A.N. The effect of hypothermic storage of isolated newborn rat nerve cells in media of various compositions on their behavior in culture. *Problems of Cryobiology* 2012; 22(4): 423–432.
24. Sukach A.N., Liashenko T.D., Shevchenko M.V. Properties of isolated cells of the nervous tissue of newborn rats in culture. *Biotechnologia Acta* 2013; 6(3): 63–68.
25. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414: 112–117.
26. Xu X.C., Howard T., Mohanakumar T. Tissue-specific peptides influence human T cell repertoire to porcine xenoantigens. *Transplantation* 2001; 72(7): 1205–1212.
27. Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2001; 19: 1129–1133.