

УДК 57.043:576.3:611.451:591.147

Е.М. Плаксина, О.С. Сидоренко, Г.А. Божок*

Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из надпочечников новорожденных поросят

UDC 57.043:576.3:611.451:591.147

Е.М. Plaksina, O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok*

Cryopreservation of Multicellular Spheroids Derived From Newborn Piglet Adrenal Glands

Реферат: Специальные технические приемы культивирования клеток разных органов животных и человека позволяют получать мультиклеточные сфероиды (МС), обеспечивающие пространственное микроокружение клеток, в отличие от стандартной культуры, в которой клетки пребывают в монослое. Ранее показано, что из МС, формирующиеся в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят, выселяются нейробластоподобные клетки, экспрессирующие маркер нейронов β -III-тубулин. В данной работе были апробированы режимы криоконсервирования МС с использованием 5, 7 и 10% растворов диметилсульфоксида (ДМСО) и 25% фетальной телячьей сыворотки (FBS). На основе результатов анализа некоторых характеристик криоконсервированных МС (адгезии к поверхности, способности к продуцированию нейробластоподобных клеток и формированию монослоя фибробластоподобными клетками) установлено, что наиболее оптимальным был режим криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 град/мин в присутствии 10% ДМСО. Добавление в среду FBS значительно не влияло на результат криоконсервирования, но при этом отмечено увеличение вероятности выселения нейробласто- и фибробластоподобных клеток из криоконсервированных МС.

Ключевые слова: мультиклеточные сфероиды, надпочечники, диметилсульфоксид, β -III-тубулин, нейробластоподобные клетки, фибробластоподобные клетки, новорожденные поросята.

Реферат: Спеціальні технічні прийоми культивування клітин різних органів тварин і людини дозволяють отримувати мультиклітинні сфероїди (МС), які забезпечують просторове мікрооточення клітин, на відміну від стандартної культури, в якій клітини перебувають у моношарі. Раніше показано, що з МС, які формуються в культурі клітин наднирників новонароджених поросят, виселяються нейробластоподібні клітини, що експресують маркер нейронів β -III-тубулін. У даній роботі були протестовані режими криоконсервування МС із використанням 5, 7 і 10% розчинів диметилсульфоксиду (ДМСО) і 25% фетальної телячої сироватки (FBS). На основі результатів аналізу деяких характеристик криоконсервованих МС (адгезії до поверхні, здатності до продукування нейробластоподібних клітин і формування моношару фібробластоподібними клітинами) встановлено, що найбільш оптимальним був режим зі швидкістю охолодження 1 град/хв у присутності 10% ДМСО. Додавання FBS значуще не впливало на результат криоконсервування, хоча спостерігалася тенденція до збільшення ймовірності виселення нейробласто- та фібробластоподібних клітин із криоконсервованих МС.

Ключові слова: мультиклітинні сфероїди, наднирники, диметилсульфоксид, β -III-тубулін, нейробластоподібні клітини, фібробластоподібні клітини.

Abstract: Application of special *in vitro* culture techniques for the cells, derived from different animal and human organs, makes possible the obtaining of multicellular spheroids (MSs), being the natural 3-D environment for cells unlike the standard culture with the cells in monolayer. Previously we have shown that MSs formed in the newborn piglet adrenal cell culture are capable to produce the neuroblast-like cells, expressing the neuronal marker β -III-tubulin. In the present work we have assessed the regimens for MSs cryopreservation using 5, 7 and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 25% fetal bovine serum (FBS). Analysis of some characteristics of cryopreserved MSs (surface adhesion, capability to produce the neuroblast-like cells and monolayer formation by fibroblast-like cells) allowed to choose the cryopreservation regimen with 1 deg/min cooling rate in the presence of 10% DMSO as the most optimal one. The FBS supplement to the medium did not significantly affect the cryopreservation outcome, although there was found a tendency to increase the capability of cryopreserved MSs to produce the neuroblast- and fibroblast-like cells.

Key words: multicellular spheroids, adrenal glands, dimethyl sulfoxide, β -III-tubulin, neuroblast-like cells, fibroblast-like cells, rats.

Получение мультиклеточных сфероидов (МС) является одним из перспективных подходов культивирования клеток различных тканей. Данный подход основан на природной склонности клеток пребывать в окружении себе подобных в отличие от классической монослойной культуры, в которой клетки контактируют только в одной плоскости.

The derivation of multicellular spheroids (MSs) is one of the promising approaches in culturing the cells of different tissues. This approach is based on a natural property of cells to function among similar ones, in contrast to the classical monolayer culture, where the cells contact in one plane only. Using the nutrient media enriched with growth factors allowed to derive spheroid

Отдел криоэндокринологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Cryoendocrinology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: bozhokgaru@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: bozhokgaru@gmail.com

Поступила 18.07.2017

Принята в печать 11.10.2017

Received July, 18, 2017

Accepted October, 11, 2017

© 2017 Е.М. Plaksina et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

При использовании питательных сред, обогащенных ростовыми факторами, формирование сфероидных структур было отмечено в культурах, полученных из роговицы и сетчатки глаза, кожи, сердца, гипофиза, надпочечников [6, 8, 25, 27, 30, 31], клеток опухолей [14, 17, 28]. В настоящее время хорошо изучены МС, формирующиеся из определенных областей мозга (нейросферы) [15]. В специальных условиях культивирования (культивирование на низкоадгезивной поверхности, подложке с трехмерной микроструктурой, в висячей капле, ротационное культивирование) формируются МС из гепатоцитов, клеток молочной железы, эпителия дыхательных путей [11, 23–25].

Мультиклеточные образования «хромосферы» были выделены из надпочечников человека и быка [10, 26]. Поскольку клетки в их составе обладали способностью дифференцироваться в нейрональном направлении, была отмечена перспективность их использования для лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона.

В наших предыдущих работах из надпочечников новорожденных поросят были получены МС [3], из которых выселялись нейробластоподобные клетки (НБК), экспрессирующие нейрональный маркер β -III-тубулин [7]. В связи с этим перспективно дальнейшее изучение МС из надпочечников как потенциального источника нейрональных клеток.

Криоконсервирование – общепринятый способ долгосрочного хранения клеточных культур и суспензий. Однако режимы их криоконсервирования не всегда оптимальны для МС, что связано как с разными размерами замораживаемого объекта, так и с его качественными характеристиками. В частности, в составе МС клетки находятся в тесном контакте друг с другом в отличие от суспензии диссоциированных клеток. Кроме того, элементы внеклеточного матрикса влияют на динамику физико-химических процессов, происходящих при замораживании.

F. Ehrhart и соавт. [12] на примере клеточной линии L929 показали, что для консервирования одиночных клеток наиболее подходит проникающий криопротектор ДМСО, а для сфероидов этой же линии – криозащитная среда на основе непроницающего криопротектора трегалозы. Учитывая прогресс в области тканевой инженерии при создании трехмерных биологических конструкций, является актуальной разработка режимов криоконсервирования многоклеточных объектов. Мультиклеточные сфероиды, полученные из надпочечников свиней, могут служить моделью для разработки режимов криоконсервирования, поскольку по некоторым физиологическим и биохимическим параметрам организм свиньи сходен с человеческим [19].

structures in culture cells from eye cornea and retina, skin, heart, pituitary, adrenal glands [1, 4, 22, 24, 30, 31], tumor cells [10, 13, 26]. The MSs, formed from the certain brain areas (neurospheres) are to date well studied [11]. Under special culture conditions (cultivation on a low-adhesive surface, a substrate with 3D microstructure, in hanging drop, rotational cultivation), the MSs were formed from hepatocytes, mammary cells, respiratory tract epithelium [7, 19, 21, 22].

Multicellular formations, called as ‘chromospheres’, were isolated from human and bovine adrenal glands [6, 23]. Since the cells being the part of these spheres were capable to differentiate in neuronal direction, their use was considered to be promising for using in therapy of neurodegenerative diseases, in particular Parkinson's disease.

Previously, we derived the MSs from the newborn piglet adrenal glands [25], and observed the migration of neuroblast-like cells (NBCs) out of the MSs, which expressed the neuronal marker β -III-tubulin [3]. In this context the further study of MSs from adrenal glands as a potential source of neuronal cells is optimistic.

Cryopreservation is now a standard way for long-term storage of cell cultures and suspensions. Nevertheless, the regimens of cryopreservation being optimal for a single cell are not always good for MSs due to both different sizes of treated object and its qualitative characteristics as well. In particular, the cells within MSs are in a close contact with each other, in contrast to the suspension of dissociated cells, and, in addition, the elements of extracellular matrix affect the dynamics of physicochemical processes occurring during freezing.

For example, F. Ehrhart *et al.* [8] used L929 cell line and showed the penetrating cryoprotectant DMSO to be the most suitable for a single cell preservation, and the cryoprotective medium, based on non-penetrating cryoprotectant trehalose was the most appropriate for the spheroids constituted from cells of the same line. Taking into account the progress in tissue engineering and ongoing progress in producing 3D biological matrices, the development of cryopreservation regimens for multicellular objects is now a topical task. Multicellular spheroids, derived from pig adrenal glands may be the model to design the cryopreservation regimens, since the pig organism is similar to human one by some physiological and biochemical parameters [15].

This research was aimed to design the cryopreservation regimen for multicellular spheroids from neonatal pig adrenal glands.

Materials and methods

The cell suspension was derived from the adrenal glands of 1–2-day-old piglets of Large White and Ukrainian Meat breeds. After extraction the organs were

Цель работы – разработка режима криоконсервирования мультиклеточных сфероидов из неонатальных свиных надпочечников.

Материалы и методы

Суспензию клеток получали из надпочечников 1–2-суточных поросят пород крупная белая и украинская мясная. После извлечения органы помещали в охлажденную среду DMEM/F12 («Biowest», Франция) с растворенными в ней 200 Ед/мл бензилпенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина (оба производства «Артериум», Украина), 5 мкг/мл амфотерицина В («Biowest») и измельчали на фрагменты размером до 1 мм³. Фрагменты ткани подвергали 2–3-кратной отмывке средой с антибиотиками и ферментативной обработке в растворе, содержащем 1 мг/мл коллагеназы типа IA («Sigma», США) и 0,1 мг/мл ДНКазы («Sigma») по методу О.С. Сидоренко и соавт. [3].

Количество и сохранность клеток в полученной суспензии оценивали по стандартной методике с помощью окрашивания 0,4%-м раствором трипанового синего, который добавляли к суспензии клеток в соотношении 1:1. В среднем сохранность полученных клеток составляла 85–90%.

Клетки культивировали на среде DMEM/F12 с добавлением антибиотиков (200 Ед/мл бензилпенициллина и 200 мкг/мл стрептомицина), амфотерицина В (5 мкг/мл), 10% FBS при 37°C и содержании в атмосфере 5% CO₂. Для культивирования использовали пластиковые чашки Петри площадью 8,8 см² (НПЛ «Гранум», Украина) и с низкоадгезивной поверхностью. Для получения низкоадгезивной поверхности чашки Петри обрабатывали по методу J.A. Hammarback и соавт. [16]. Посевная концентрация составляла 2,5–5 × 10⁵ кл/мл (всего 2 мл на чашку Петри). Замену половины объема среды осуществляли каждые 3–4 дня.

На 10-е сутки культивирования флотирующие МС переносили из чашек Петри в 24-луночные планшеты («ТРР», Швейцария) и оставляли на 20 мин. При этом МС, сконцентрированные в центральной части лунок планшета, аккуратно отбирали с помощью микродозатора и собирали в одну пробирку. Половину МС переносили в криопробирку («Thermo Fisher Scientific», США) для дальнейшего криоконсервирования, а другую (контроль) – помещали в стандартные условия культивирования (адгезивная поверхность, среда DMEM/F12 с добавлением антибиотиков и 10% FBS при 37°C и содержании в атмосфере 5% CO₂).

Для криоконсервирования к образцам МС при комнатной температуре добавляли равный объем соответствующей криозащитной среды двойной концентрации. После 10-минутной инкубации в криозащитной среде образцы криоконсервировали

placed into a cooled medium DMEM/F12 (Biowest, France) supplemented with 200 U/ml Benzylpenicillin, 200 µg/ml Streptomycin (both produced by Arterium Corporation, Ukraine), 5 µg/ml Amphotericin B (Biowest), then disintegrated into the fragments up to 1 mm³ in size. The tissue fragments were washed 2–3-times with antibiotic media and enzymatically treated in the solution containing 1 mg/ml of collagenase type IA (Sigma, USA) and 0.1 mg/ml DNase (Sigma) according to the method of O.S. Sidorenko et al. [25].

The cell amount and survival in the resulting suspension was assessed according to the standard technique with 0.4% trypan blue, added in 1:1 ratio to cell suspension. Survival of the resulting cells was 85–90% in average.

Cells were cultured with DMEM/F12 medium, supplemented with antibiotics (200 U/ml Benzylpenicillin and 200 µg/ml Streptomycin), Amphotericin B (5 µg/ml), 10% FBS at 37°C and 5% CO₂. Plastic Petri dishes of 8.8 cm² culture area (Granum, Ukraine) and low-adhesive surface were used for cultivation. In order to obtain a low-adhesive surface, the Petri dishes were treated according to J.A. Hammarback et al. [12]. The cell inoculating concentration was 2.5–5 × 10⁵ cells/ml (totally 2 ml per Petri dish). Half of the medium was replaced every 3–4 days.

To day 10 of culture, the floating MSs were transferred from Petri dishes to 24-well plates (TRP, Switzerland) and left for 20 min. During this period the MSs concentrated in the central part of the plate wells and thereafter were carefully taken with a micropipette and collected into one vial. Half of the MSs was transferred into the cryovials (Thermo Fisher Scientific, USA) for further cryopreservation, and the other half (control) was placed under the standard culture conditions (adhesive surface, DMEM/F12 medium supplemented with antibiotics and 10% FBS, 37°C and 5% CO₂).

To perform cryopreservation the MSs specimens were supplemented with an equal volume of the corresponding double concentrated cryoprotective medium at room temperature. After a 10-minute incubation in a cryoprotective medium, the specimens were cooled with 0.5 and 1 deg/min rates down to –40°C with programmed freezer ZP10 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine) and then immersed into liquid nitrogen.

The cryoprotective media containing DMSO and FBS are usually applied for neurosphere cryopreservation [5]. We applied the cryoprotective media of following composition: DMEM/F12 with 5; 7 and 10% DMSO (final concentration), as well as DMEM/F12 with 5; 7; 10% DMSO together with 25% FBS (final concentration).



со скоростями охлаждения 0,5 и 1 град/мин до -40°C на программном замораживателе «ЗП10» (СКТБ с ОП, ИПКиК НАН Украины) при последующем погружении в жидкий азот.

Для криоконсервирования нейросфер использовали криозащитные среды на основе криопротектора ДМСО и FBS [9]. В данной работе применяли следующие криозащитные среды: DMEM/F12 с 5; 7 и 10% ДМСО (конечная концентрация), а также DMEM/F12 с 5; 7; 10% ДМСО в сочетании с 25% FBS (конечная концентрация).

Образцы отогревали на водяной бане при температуре 37°C , переносили из криопробирок в лунки планшета, добавляли двойной объем среды DMEM/F12 и концентрировали как описано ранее. При последующем поэтапном добавлении культуральной среды DMEM/F12 с 10% FBS постепенно снижали концентрацию ДМСО до 0,4 %. Согласно ранее полученным данным присутствие в среде криопротектора в концентрации 0,1–0,5% незначительно влияет на показатели функции клеток [4]. На следующие сутки среду полностью меняли и продолжали культивирование МС в стандартных условиях (адгезивная поверхность, среда DMEM/F12 с добавлением антибиотиков и 10% FBS при 37°C и содержании в атмосфере 5% CO_2). Среда культивирования в контрольных (некриоконсервированных) и опытных (криоконсервированных) образцах меняли через четверо суток.

Адгезивную способность МС определяли через сутки после размораживания и нахождения в условиях культивирования. Относительное количество прикрепленных МС вычисляли по формуле:

$$A = (1 - \Phi_{MC}/OMC) \times 100\%,$$

где Φ_{MC} – количество флотирующих МС; OMC – общее количество МС.

Выселение НБК изучали после размораживания МС и нахождения их в условия культивирования в течение 1, 4 и 9 суток. Относительная способность МС к выселению нейробластоподобных клеток вычисляли по формуле:

$$B = (BMC/PMC) \times 100\%,$$

где BMC – количество МС с выселившимися клетками; PMC – количество прикрепившихся МС.

Для определения экспрессии β -III-тубулина использовали первичные мышинные антитела к β -III-тубулину («Abcam», Великобритания) в разведении 1:200 и вторичные козы антимышинные HiLyte Fluor 488-конъюгированные антитела («Abcam») в разведении 1:400. Образцы фиксировали в течение 15 мин в растворе 4%-го параформальдегида («Sigma») на PBS. Пермеабелизацию проводили в растворе 0,3%-го Triton X-100 («Sigma») на PBS в течение 10 мин. Неспецифическое связывание

The specimens were thawed in a water bath at 37°C , then transferred from cryovials into plate wells, filled with a double volume of DMEM/F12 and concentrated as described previously. During further stepwise supplement of DMEM/F12 with 10% FBS, the DMSO concentration was gradually decreased down to 0.4%. According to the previous findings, the cryoprotectant presence in the medium in 0.1–0.5% concentration insignificantly affected the indices of cell function [27]. Next day the medium was completely changed and MSs were cultured then under the standard conditions (adhesive surface, DMEM/F12, supplemented with antibiotics and 10% FBS, 37°C and 5% CO_2). The culture medium in the control (non-cryopreserved) and experimental (cryopreserved) specimens was changed after 4 days.

Adhesive capability of MSs was determined one day after freeze-thawing and being under culture conditions. A number of attached MSs was calculated by the following formula:

$$A = (1 - FMSs/TMSs) \times 100\%,$$

where $FMSs$ is a number of floating MSs; $TMSs$ is the total amount of MSs.

The migration of NBCs cells out of spheres was studied after MSs freeze-thawing and culture during 1, 4 and 9 days. The capability of MSs to 'produce' the neuroblast-like cells was calculated by the following formula:

$$B = (PMSs/AMSs) \times 100\%,$$

where $PMSs$ is a number of MSs with observed migration of cells, $AMSs$ is a number of attached MSs.

The anti- β -III-tubulin primary antibodies (Abcam, UK) in 1:200 dilution and the HiLyte Fluor 488-conjugated secondary goat anti-mouse antibodies (Abcam) in 1:400 dilution were used to determine the β -III tubulin expression. The specimens were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde solution (Sigma) in PBS. Then they were permeabilized in 0.3% Triton X-100 solution (Sigma) in PBS for 10 min. Non-specific antibody binding was blocked with PBS containing 0.1% Triton X-100, 1% bovine serum albumin (Sigma), 0.3 M glycine (Reanal, Hungary) for an hour at room temperature. The specimens with primary antibodies were incubated at 4°C overnight and afterwards three times washed with PBS. The incubation with secondary antibodies was done at room temperature for 30 min in the dark, and then PBS was removed thrice.

Microphotography was performed with the AmScope IN300T-FL light-optical microscope (AmScope, USA) and the Axio Observer Z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany).

The monolayer formation rate was assessed visually using inverted microscope, to do this 10–15 MSs were

антител блокировали раствором PBS, содержащем 0,1% Triton X-100, 1% бычьего сывороточного альбумина («Sigma»), 0,3 М глицина («Reanal», Венгрия) на протяжении часа при комнатной температуре. Инкубацию образцов с первичными антителами проводили при 4°C на протяжении ночи, затем трижды отмывали PBS. Инкубацию со вторичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте, затем трижды отмывали PBS.

Микрофотосъемку осуществляли с помощью светооптического микроскопа «AmScope IN300T-FL» («AmScope», США) и флуоресцентного микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия).

Для изучения скорости образования монослоя под визуальным контролем с помощью инвертированного микроскопа 10–15 МС распределяли в каждую лунку планшета с адгезивной поверхностью. На разные сутки фиксировали образовавшийся монослой клеток в растворе 4%-го параформальдегида и окрашивали гематоксилином и эозином. Конфлюэнтность монослоя оценивали в процентах. Для этого сканировали дно планшета на сканере «Epson Perfection V10» («Epson», Япония). Площадь монослоя определяли с помощью программы «AxioVision Rel. 4.8» («Carl Zeiss»). Относительную площадь монослоя вычисляли по формуле:

$$S = S_m/S_w \times 100\%,$$

где S_m – площадь участка с окрашенными клетками, S_w – площадь лунки.

Количественные данные экспериментов представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В нашей предыдущей работе [2] было показано, что в условиях, препятствующих адгезии, клетки формируют небольшие флотирующие агрегаты, которые на 5–6-е сутки приобретают правильную сферическую форму. Данные образования представляют собой МС, включающие 30–40 клеток. При дальнейшем культивировании МС приобретают вид четко очерченных плотных конгломератов из морфологически однородных клеток. Благодаря пролиферации клеток в течение культивирования увеличивается размер МС, при этом их средний диаметр на 10–11-е сутки составляет 100–120 мкм; 26–28-е сутки – 160–180 мкм. Количество формируемых МС приблизительно составляет 1,5 на 1 млн клеток, изначально помещенных в культуру [2].

Мультиклеточные сфероиды, сформировавшиеся на 10-е сутки из клеток надпочечников новорожденных поросят при культивировании в усло-

put into each plate well with an adhesive surface. The formed cell monolayer was fixed in 4% paraformaldehyde solution on different days and stained with hematoxylin and eosin. The monolayer confluence was estimated as a percentage. For this purpose the plate bottom was scanned with Epson Perfection V10 scanner (Epson, Japan). The area of monolayer was determined using the AxioVision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss). The relative monolayer area was calculated by the following formula:

$$S = S_m/S_w \times 100\%,$$

where S_m is the site area with stained cells, and S_w is the well area.

The quantitative experimental data were presented as the mean value standard deviation. Statistical significance was assessed using a one-way ANOVA, the differences at $p < 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

Our previous findings [20] demonstrated that the cells under adhesion-preventing conditions formed the small floating aggregates, acquired a regular spherical shape to days 5–6. These formations represented the MSs consisting of 30–40 cells. With further culture, the MSs acquired the shape of dense conglomerates with sharp contours consisting of morphologically homogeneous cells. Due to the cell proliferation during culture the size of MSs increased, herewith their average diameter to days 10–11 and 26–28 was 100–120 μm and 160–180 μm , respectively. The number of formed MSs was approximately 1.5 per 1 million cells initially placed into the culture [20].

The multicellular spheroids, formed to day 10 from the newborn piglet adrenal cells cultured under low adhesion to the substrate, were cryopreserved (Fig. 1). For cryopreservation of the adrenal gland-derived MSs, we tested the cooling rates of 0.5 and 1 deg/min, reported for neurosphere cryopreservation [5, 33]. Series of cryoprotective media with 5–10% DMSO, as well as 25% FBS as a supplement to cryoprotective medium, were also tested.

It is known that molecular structures of cells, responsible for their attachment to the substrate, may be damaged during cryopreservation [14]. Supported with this fact, the assessment of an adhesive capability of frozen-thawed cells is one of the most common methods for testing their state. After cryopreservation in the media of different composition with two selected cooling rates (0.5 and 1 deg/min), the specimens were thawed and placed under the standard culture conditions (adhesive surface, DMEM/F12 medium supplemented with antibiotics and 10% FBS, 37°C and 5% CO_2).

The intact (control) MSs, transferred from the low-adhesive conditions onto the adhesive surface, atta-



виях низкой адгезии к подложке, подвергали криоконсервированию (рис. 1). Для криоконсервирования МС, полученных из надпочечников, были апробированы скорости охлаждения 0,5 и 1 град/мин, которые используются для криоконсервирования нейросфер [9, 33]. Также был протестирован ряд криозащитных сред с ДМСО в концентрации 5–10%, а также FBS в концентрации 25% в качестве добавочного компонента к криозащитной среде.

Известно, что в процессе криоконсервирования могут повреждаться молекулярные структуры клетки, ответственные за их прикрепление к субстрату [18]. Учитывая данный факт, одним из общепринятых методов тестирования состояния размороженных клеток является оценка их адгезивной способности. После криоконсервирования в средах различного состава при двух выбранных скоростях охлаждения (0,5 и 1 град/мин) образцы размораживали и помещали в стандартные условия культивирования (адгезивная поверхность, среда DMEM/F12 с добавлением антибиотиков и 10% FBS при 37°C и содержании в атмосфере 5% CO₂).

Интактные (контрольные) МС, перенесенные из низкоадгезивных условий на адгезивную поверхность, прикреплялись в течение нескольких часов. После первых суток адгезивная способность контрольных образцов МС составляла (85,1 ± 17,0)% (рис. 2).

После криоконсервирования МС сохраняли способность к прикреплению, однако этот показатель изменялся в зависимости от состава среды и скорости охлаждения. Статистически значимое уменьшение адгезивной способности по сравнению с контролем наблюдалось при использовании сред с 5 и 7% ДМСО при обеих скоростях охлаждения. Наилучшие показатели адгезивной способности МС были получены при консервировании в криозащитной среде с 10% ДМСО и 25% FBS при скорости охлаждения 0,5 град/мин (73,3 ± 14,6)%. Кроме того не наблюдалось статистически значимой разницы между интактным контролем и образцами, криоконсервированными в присутствии 10% ДМСО при 1 град/мин.

Ранее показано [7], что из МС, полученных из надпочечников новорожденных поросят, выселяются НБК, экспрессирующие специфический маркер нейробластов β-III-тубулин. На данном этапе исследования необходимо было проверить, сохраняется ли подобное свойство МС после криоконсервирования.

Установлено, что криоконсервирование влияет на способность клеток МС к продуцированию нейробластоподобных клеток. В интактных образцах МС выселение НБК начиналось на протяжении 24 ч после помещения их на адгезивную поверх-

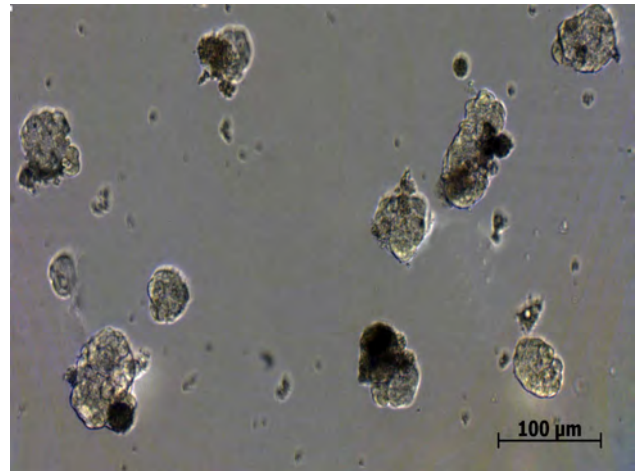


Рис. 1. Мультиклеточные сфероиды, сформировавшиеся на 10-е сутки из клеток надпочечников новорожденных поросят при культивировании в условиях низкой адгезии к подложке.

Fig. 1. Multicellular spheroids, formed to day 10 from the newborn piglet adrenal cells in culturing under low adhesion to the substrate.

ched within several hours. After the first day, an adhesive capacity of the MSs control specimens was (85.1 ± 17.0)% (Fig. 2).

After cryopreservation, MSs were able to attach, but the estimated index of adhesion varied depending on the medium composition and cooling rate. A sta-

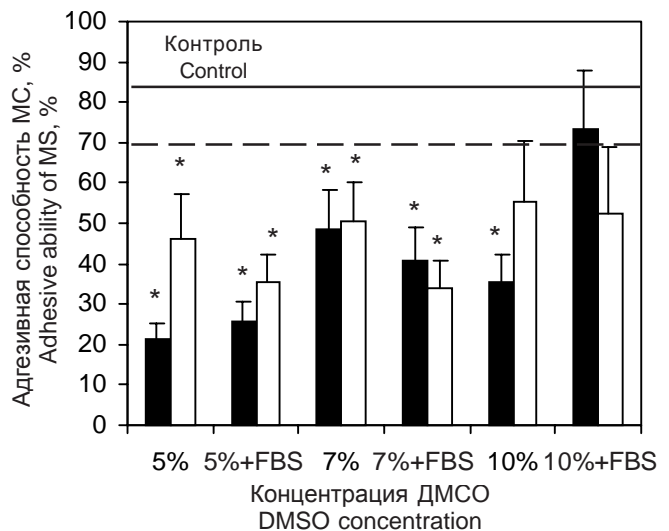


Рис. 2. Адгезивная способность МС, криоконсервированных в средах с разным составом. ■ – 0,5 град/мин; □ – 1 град/мин; сплошная линия – средние значения адгезии в контроле; пунктирная линия – стандартное отклонение среднего значения адгезии в контроле; * – отличия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 1. Adhesive ability of MSs, cryopreserved in media of various composition. ■ – 0.5 deg/min; □ – 1 deg/min; solid line – average values of adhesion in the control; dotted line – standard deviation of the average adhesion value in the control; * – differences are significant in comparison with the control, $p < 0.05$.

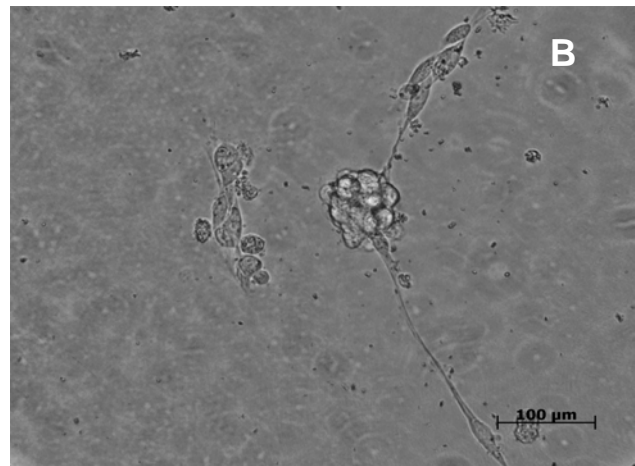
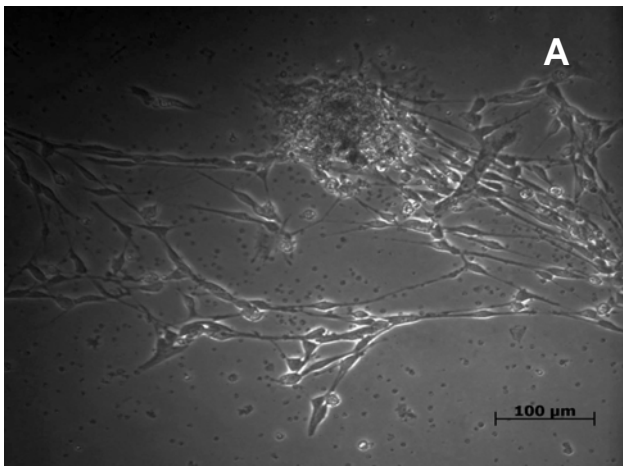


Рис. 3. Выселение нейробластоподобных клеток из МС, полученных из надпочечников новорожденных поросят в течение 10 суток культивирования на низкоадгезивной поверхности и последующего переноса на адгезивную поверхность: **А** – интактные МС, **В** – криоконсервированные МС.

Fig. 3. Migration of NBCs out of MSs, obtained from adrenal glands of newborn piglets during 10 days of culturing on a low-adhesive and subsequent transfer to adhesive surface: **A** – intact MSs, **B** – cryopreserved MSs.

ность (рис. 3, А). В течение 9 суток количество МС с выселением НБК возрастало с 39 до 58% (рис. 4). В криоконсервированных образцах МС также наблюдалось выселение клеток (рис. 3, В). Во всех образцах, криоконсервированных со скоростью охлаждения 0,5 град/мин, количество МС с выселением НБК во все исследованные временные интервалы (1, 4 и 9 суток) было значимо меньше по сравнению с контролем (рис. 4, А). При криоконсервировании со скоростью охлаждения 1 град/мин в растворах с концентрацией ДМСО 5 и 7 % также наблюдалось значимое уменьшение МС с выселением НБК по сравнению с контролем (рис. 4, В).

Наибольшая сохранность МС с выселением НБК была отмечена в случае криоконсервирования со скоростью охлаждения 1 град/мин в присутствии 10% ДМСО с 25% FBS. При этом на 4- и 9-е сутки их количество составляло $(40,5 \pm 14,3)$ и $(41,4 \pm 10,0)$ % (в контроле $(40,4 \pm 12,2)$ и $(58,1 \pm 8,4)$ % соответственно).

Чтобы установить, сохраняется ли экспрессия β -III-тубулина в нейробластоподобных клетках после криоконсервирования, нами были проведены иммуноцитохимические исследования. Для анализа использовали МС с наиболее высокими показателями выселения нейробластоподобных клеток. После криоконсервирования специфическое мечение антителами к β -III-тубулину наблюдалось в МС и выселяющихся из них НБК (рис. 5), характер и интенсивность окрашивания которых не отличались от незамороженных образцов.

Как было показано ранее [3], в МС присутствуют фибробластоподобные клетки, которые выселяются при перенесении в адгезивные условия и формируют монослой при последующем культи-

tistically significant decrease in adhesive capacity if compared to the control was observed when using the media with 5 and 7% DMSO and both cooling rates. The biggest index of MSs adhesive ability was obtained after freeze-thawing in a cryoprotective medium with 10% DMSO and 25% FBS at a cooling rate of 0.5 deg/min (73.3 ± 14.6) . In addition, there was no statistically significant difference between the intact control and the samples cryopreserved in the presence of 10% DMSO at 1 deg/min.

It has been previously shown [3] that the NBCs, expressing a specific marker of neuroblasts β -III-tubulin, migrate out of the MSs, obtained from the adrenal glands of newborn piglets. In this research it was necessary to check whether such a property of MSs was kept after cryopreservation.

It has been established that cryopreservation affected the ability of MS to 'produce' NBCs. In non-frozen-thawed samples the migration of NBCs started within 24 hours after placing the MSs on adhesive surface (Fig. 3A). Within 9 days the amount of MSs with the migrating NBCs increased from 39 to 58% (Fig. 4). In cryopreserved MSs, the cell migration was also observed (Fig. 3B). In all the samples cryopreserved at a cooling rate of 0.5 deg/min, the number of MSs with the migrating NBCs was significantly lower than in the control within all the investigated time intervals (1, 4 and 9 days) (Fig. 4A). Following cryopreservation with a cooling rate of 1 deg/min in the solutions of 5 and 7% DMSO, we also have found a significant decrease in MSs with migrating NBCs if compared to the control (Fig. 4B).

The highest preservation rate of the MSs with the migrating NBCs cells was noted in the case of cryopreservation with a cooling rate of 1 deg/min in the presence



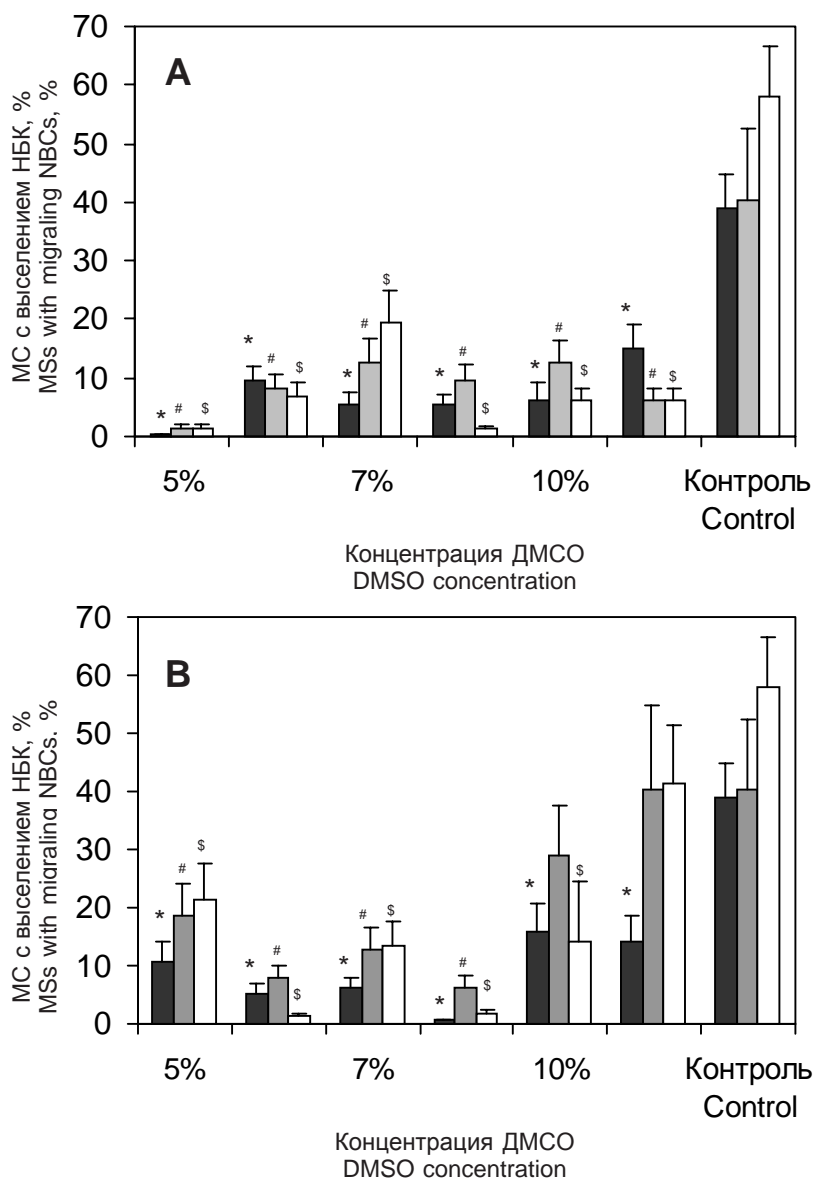


Рис. 4. Количество МС с выделением НБК в течение 9 суток культивирования: МС, криоконсервированные при 0,5 (А) и 1 град/мин (В). ■ – 1 сутки; □ – 4 сутки; □ – 9 сутки; *, #, \$ – значимые отличия показателя высеивания в соответствующие сутки культивирования по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 4. Number of MSs with migrating NBSs within 9 days of culturing: MSs, cryopreserved at 0.5°C/min (A) and at 1°C/min (B). ■ – 1 day; □ – 4 days; □ – 9 days; *, #, \$ – significant differences in migration index for corresponding day of culturing as compared to the control, $p < 0.05$.

вировании. Такой монослой служит «фидером» для разрастания нейробластов и формирования сетей из их отростков. В связи с этим сохранение субпопуляции фибробластоподобных клеток является важной задачей при выборе режима криоконсервирования.

При перенесении размороженных МС в культуральные планшеты с адгезивной поверхностью формирование монослоя замедлялось по сравнению с контрольными (незамороженными) образцами (рис. 6). В контроле 90%-й монослой фибробласто-

of 10% DMSO and 25% FBS. Herewith to day 4 and 9 their number made (40.5 ± 14.3) and $(41.4 \pm 10.0)\%$ (in the control these were (40.4 ± 12.2) and $(58.1 \pm 8.4)\%$, respectively).

To determine whether β -III-tubulin expression is preserved in NBSs after cryopreservation, we performed immune cytochemical staining. For the analysis we have selected the MSs with the highest migration of NBSs. Specific labeling with antibodies to β -III-tubulin was observed in the post-thaw MSs and migrating NBCs (Fig. 5), the nature and intensity of staining did not differ from the un-frozen samples.

As it was shown earlier [25] the fibroblast-like cells were present in the MSs, which were migrating following the transfer to the adhesive conditions and forming a monolayer during subsequent culturing. Such a monolayer serves as a 'feeder' providing the proliferation of neuroblasts and formation of networks made of the cell processes. In this regard, the preservation of a subpopulation of fibroblast-like cells is important when choosing the cryopreservation regimen.

When the thawed MSs were transferred to culture plates with adhesive surface, monolayer formation was slowed down if compared to the control (non-frozen-thawed) samples (Fig. 6). In the control, a 90% monolayer of fibroblast-like cells was formed to day 7 after MSs transfer. In the wells with cryopreserved MSs only 3–6% monolayer was formed at this time of cultivation. The highest potential for monolayer formation was retained by MSs samples, frozen-thawed with cooling rate of 1 deg/min in cryoprotective media containing 10% DMSO (Fig. 6A).

The monolayer was not formed in the samples frozen-thawed with a cooling rate of 0.5 deg/min in cryoprotective media, containing 5 or 10% DMSO (Fig. 6B).

Cryopreservation of cell suspensions is widely used in biology and medicine for a long-term storage of cell lines, reproductive and somatic cells [2]. For this purpose, various cooling regimens have been developed and the compositions of cryoprotective media optimal for each cell type have been selected. Nevertheless, cryopreservation of multi-cell systems, including the MSs, is more complicated, since during freezing their

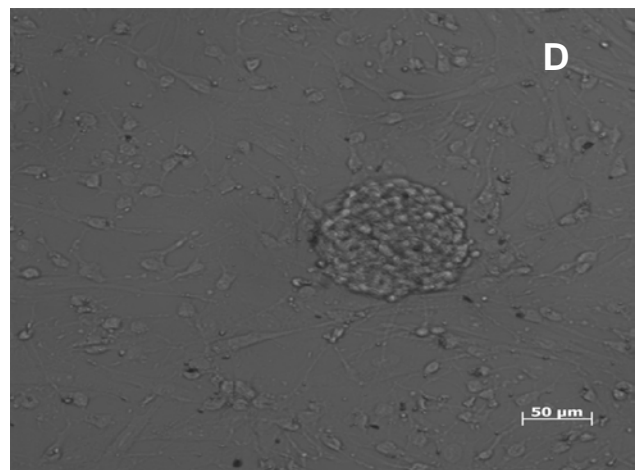
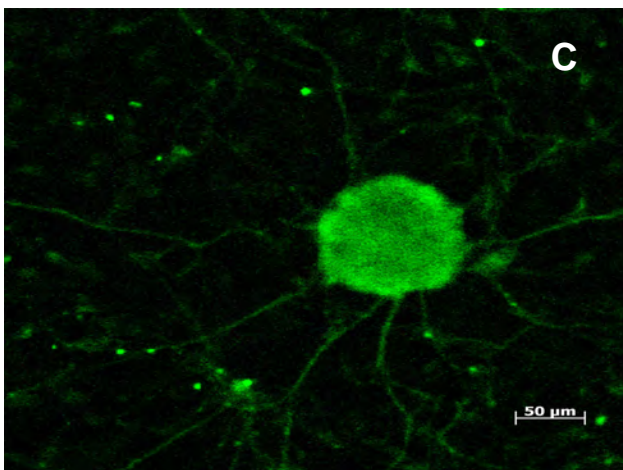
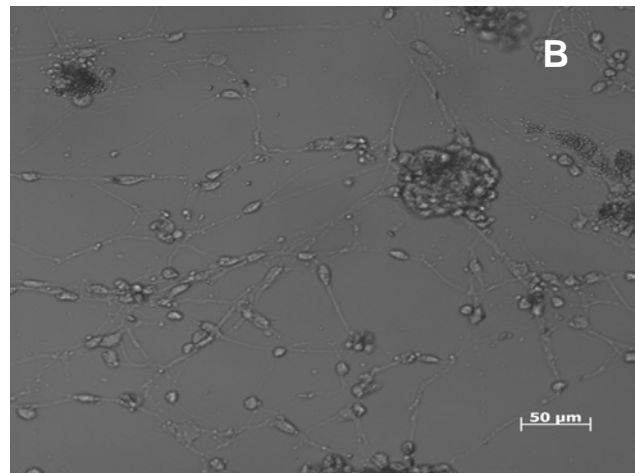
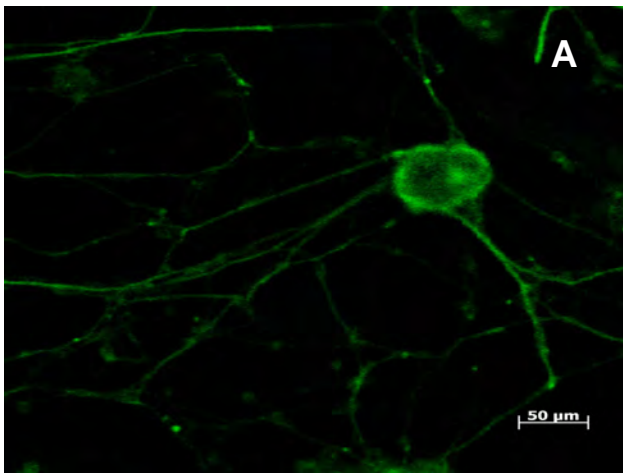


Рис. 5. Типичные изображения контрольных (А, В) и криоконсервированных (С, D) МС, окрашенных антителами к β -III-тубулину (зеленая флуоресценция). Изображения представлены в режиме флуоресценции (А, С) и проходящем свете (В, D).

Fig. 5. Typical images of control (A, B) and cryopreserved (C, D) MSs, stained with antibodies to β -III-tubulin (green fluorescence). Images were made with fluorescent (A, C) and transmitted light microscopy (B, D).

подобных клеток образовывался на 7-е сутки после посева МС. В криоконсервированных МС на данном сроке культивирования формировалось 3–6% монослоя. При этом наибольший потенциал сохраняли образцы МС, консервированные со скоростью охлаждения 1 град/мин в криозащитных средах, содержащих 10% ДМСО (рис. 6, А). Монослой не формировался в образцах, консервированных со скоростью охлаждения 0,5 град/мин в криозащитных средах, содержащих 5 и 10% ДМСО (рис. 6, В).

Криоконсервирование клеточных суспензий широко применяется в биологии и медицине для долгосрочного хранения клеточных линий, репродуктивных и соматических клеток [1]. Для этой цели разработаны различные режимы охлаждения и подобраны оптимальные для каждого типа клеток составы криозащитных сред. Однако криоконсервирование многоклеточных систем, в том числе МС, является более сложной задачей, поскольку в процессе замораживания может быть нарушена их

structure may be damaged. Therefore, the development of cryopreservation protocols, aimed at preserving the integrity of the three-dimensional cell aggregates, viability and functional properties of their cells, is essential.

For each type of bioobject during cryopreservation, the optimal cooling rate, type and concentration of the cryoprotectant should be selected. Many methods of cryopreservation have been tested in the colonies of neural stem cells, *i. e.* the neurospheres. In the report of F.C. Tan *et al.* [29] it was emphasized that cryopreservation with a low cooling rate (1 deg/min) reduced the viability of cells in the neurosphere by 30% if compared to the cells subjected to the vitrification of the sample. Despite the fact, most contemporary cryopreservation protocols are based exactly on the method used for neurospheres, and include cooling rate of 1 deg/min and cryoprotective medium with 10% DMSO [5, 17, 33].

Using the MSs obtained from adrenal glands of newborn piglets we have evaluated the efficiency of freezing at two low cooling rates (0.5 and 1 deg/min) and



структура. В связи с этим актуальным является разработка протоколов криоконсервирования, направленная на сохранение целостности трехмерных клеточных агрегатов, жизнеспособности и функциональных свойств их клеток.

Для криоконсервирования каждого типа биообъекта необходимо подобрать оптимальную скорость охлаждения, вид и концентрацию криопротектора. Многие способы криоконсервирования были апробированы на колониях нейтральных стволовых клеток – нейросферах. В работе F.C. Tan и соавт. [29] установили, что криоконсервирование с низкой скоростью охлаждения (1 град/мин) на 30% снижает жизнеспособность клеток в составе нейросфер по сравнению с витрифицированными клетками. При этом в настоящее время используется стандартный протокол криоконсервирования нейросфер, включающий скорость охлаждения 1 град/мин и криозащитную среду на основе 10% ДМСО [9, 21, 33].

В работе на МС, полученных из надпочечников новорожденных поросят, нами была оценена эффективность замораживания при двух низких скоростях охлаждения (0,5 и 1 град/мин) и криозащитных сред на основе криопротектора ДМСО в концентрации от 5 до 10%. Кроме того, был получен значительный стабилизирующий эффект [5, 13, 22], а также протестированы среды с присутствием FBS. На основе анализа результатов изучения характеристик криоконсервированных МС (способность к адгезии, выселению НБК клеток и формированию монослоя фибробластоподобными клетками) можно заключить, что наиболее приемлемым является режим с использованием скорости охлаждения 1 град/мин и криозащитной среды, содержащей 10% ДМСО. Добавление 25% FBS значительно не влияло на результат криоконсервирования, но при этом наблюдалась тенденция к повышению способности МС, замороженных в среде с сывороткой, к выселению нейробласто- и фибробластоподобных клеток.

Известно, что криоконсервирование влияет не только на сохранность стволовых/прогениторных клеток разных тканей, но и на их способность к дифференцировке [20, 32]. В наших экспериментах установлено, что после консервирования со скоростью охлаждения 1 град/мин в криозащитной среде, содержащей 10% ДМСО, сохранялась способность МС к выселению НБК клеток. Экспрессия маркера нейробластов β -III-тубулина в культуре МС, криоконсервированных в данном режиме, соответствовала таковой в интактной культуре МС.

Выводы

Криоконсервирование МС, полученных из надпочечников новорожденных поросят, со скоростью охлаждения 1 град/мин в среде на основе 10% ДМСО

cryoprotective media based on DMSO at concentrations ranging from 5 to 10%. Considering the significant stabilizing effect of FBS [9, 18, 28], some media contained this substance. The analysis of characteristics of cryopreserved MSs (ability to adhere, migration of NBCs and forming a monolayer with fibroblast-like cells) allow us to conclude that the most acceptable mode is the application of a cooling rate of 1 deg/min and a cryoprotective medium containing 10% DMSO. The supplementing of the media with 25% FBS did not significantly affect the outcome of cryopreservation,

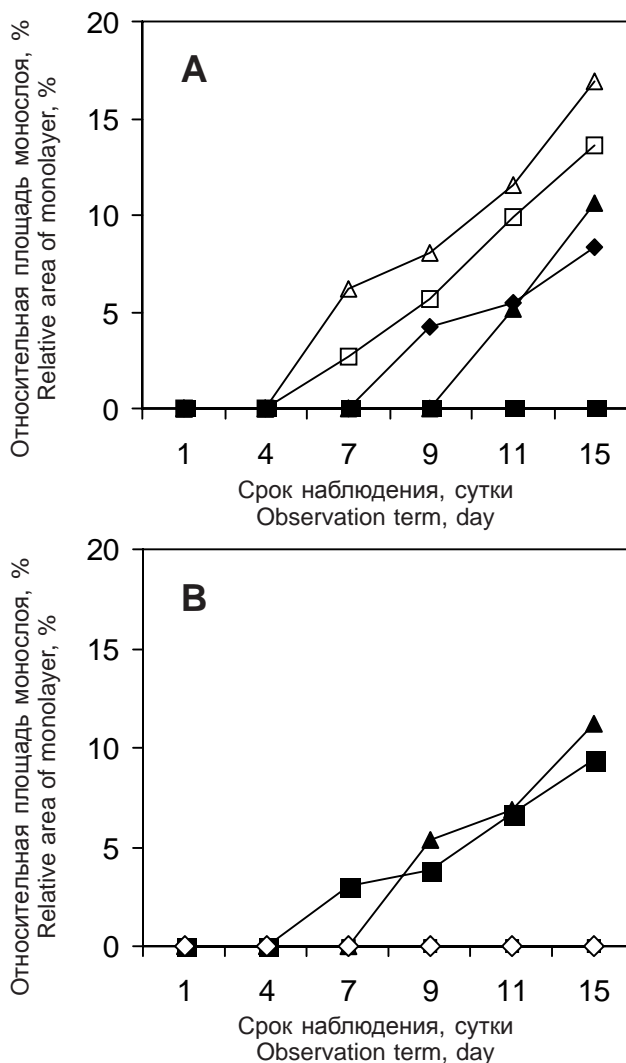


Рис. 6. Относительная площадь монослоя, формируемого фибробластоподобными клетками в течение 15 суток культивирования, после криоконсервирования МС со скоростью охлаждения 0,5 град/мин (А) и 1 град/мин (В) и их переноса в культуральные планшеты с адгезивной поверхностью. Концентрации ДМСО и FBS: ◆ – 5%; ▲ – 7%; □ – 10%; ◇ – 5% + FBS; ■ – 7% + FBS; △ – 10% + FBS.

Fig. 6. Relative area of monolayer formed by fibroblast-like cells during 15 days of culturing after cryopreservation of MSs at cooling rate of 0.5 deg/min (A) and 1 deg/min (B) and transferring them to culture plates with adhesive surface. Concentrations of DMSO and FBS: ◆ – 5%; ▲ – 7%; □ – 10%; ◇ – 5% + FBS; ■ – 7% + FBS; △ – 10% + FBS.

позволяет сохранить их способность к прикреплению, а также, как минимум, двух субпопуляций клеток: формирующих монослой фибробластов и выселяющихся нейробластоподобных клеток.

Литература

1. Бондаренко Т.П., Легач Е.И., Киروشка В.В. и др. Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез / В кн. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. А.Н. Гольцева. – Харьков: 2012. – С. 361–401.
2. Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Легач Е.И. и др. Экспрессия β -III-тубулина в культуре клеток неонатальных надпочечников: сравнение монослойного и 3D-культивирования // Вісник Харк. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна, Серія «Біологія». – 2017. – Вып. 28. – С. 76–86.
3. Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И., Бондаренко Т.П. Формирование цитосфер и нейрональная дифференцировка в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 359–362.
4. Сукач А.Н. Влияние ДМСО на жизнеспособность эмбриональных нервных клеток человека и их поведение в условиях культивирования *in vitro* // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т.15, №3. – С. 429–432.
5. Тамарина И.В., Божок Г.А., Гурина Т.М. и др. Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников новорожденных мышей. II. Влияние концентраций сыворотки в составе криозащитной среды // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т.23, №1. – С. 66–74.
6. Amano S., Yamagami S., Mimura T., Uchida S. et al. Corneal stromal and endothelial cell precursors // *Cornea*. – 2006. – Vol. 25, №10 (Suppl. 1). – P. 73–77.
7. Bozhok G.A., Sidorenko O.S., Plaksina E.M. et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands // *Cryobiology*. – 2016. – Vol. 73, №2. – P. 152–161.
8. Chen J., Hersmus N., Van Duppen V. et al. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics // *Endocrinology*. – 2005. – Vol. 146, №9. – P. 3985–3998.
9. Chong Y.K., Toh T.B., Zaiden N. et al. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme // *Stem Cells*. – 2009. – Vol. 27, №1. – P. 29–39.
10. Chung K.F., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla // *Stem Cells*. – 2009. – Vol. 27, №10. – P. 2602–2613.
11. Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M. et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer // *Cell Prolif.* – 2003. – Vol. 36 (Suppl. 1). – P. 59–72.
12. Ehrhart F., Schulz J.C., Katsen-Globa A. et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58, №2. – P. 119–127.
13. Freshney R. *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*. – New York: Alan R. Liss, Inc., 1987. – 220 p.
14. Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach // *Nat. Protoc.* – 2009. – Vol. 4, №3. – P. 309–324.
15. Gil-Perotin S., Duran-Moreno M., Cebrian-Silla A. et al. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay // *Anat Rec (Hoboken)*. – 2013. – Vol. 296, №9. – P. 1435–1452.
16. Hammarback J.A., Palm S.L., Furcht L.T., Letourneau P.C. Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-

albeit there was a tendency to an increased migration of neuroblast- and fibroblast-like cells out of the MSs, frozen-thawed in medium with the serum.

It is known that cryopreservation affects not only the survival of stem/progenitor cells of different tissues, but also their ability to differentiate [16, 32]. Our experiments demonstrated that after cryopreservation with a cooling rate of 1 deg/min in a cryoprotective medium containing 10% DMSO, the ability of the NBCs cells migration out of MSs was kept. The expression of neuroblast β -III-tubulin marker in MSs culture, cryopreserved according to this combination, corresponded to that in MSs intact culture.

Conclusions

Cryopreservation of the MSs, derived from the adrenal glands of newborn piglets at a cooling rate of 1 deg/min in a 10% DMSO medium enabled the retaining of spheres' adhesive ability, as well as the survival of at least two subpopulations of cells: monolayer-forming fibroblast-like and migrating neuroblast-like cells.

References

1. Amano S., Yamagami S., Mimura T., Uchida S. et al. Corneal stromal and endothelial cell precursors. *Cornea* 2006; 25 (10, Suppl. 1): 73–77.
2. Bondarenko T.P., Legach E.I., Kiroshka V.V. et al. Cultivation, cryopreservation and tissue transplantation of endocrine glands. In: Goltsev A.N., editor. *Current Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. – Kharkiv; 2012. p. 361–401.
3. Bozhok G.A., Sidorenko O.S., Plaksina E.M. et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. *Cryobiology* 2016; 73(2): 152–161.
4. Chen J., Hersmus N., Van Duppen V. et al. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 2005; 146(9): 3985–3998.
5. Chong Y.K., Toh T.B., Zaiden N. et al. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem Cells* 2009; 27(1): 29–39.
6. Chung K.F., Sicard F., Vukicevic V. et al. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells* 2009; 27(10): 2602–2613.
7. Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M. et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 2003; 36 (Suppl. 1): 59–72.
8. Ehrhart F., Schulz J.C., Katsen-Globa A. et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology* 2009; 58(2): 119–127.
9. Freshney R. *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*. New York: Alan R. Liss, Inc.; 1987.
10. Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 2009; 4(3): 309–324.
11. Gil-Perotin S., Duran-Moreno M., Cebrian-Silla A. et al. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)* 2013; 296(9): 1435–1452.
12. Hammarback J.A., Palm S.L., Furcht L.T., Letourneau P.C. Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-adsorbed laminin. *J Neurosci Res* 1985; 13(1–2): 213–220.



- adsorbed laminin // *Journal of Neuroscience Research*. – 1985. – Vol. 13, №1–2. – P. 213–220.
17. Ivascu A., Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis // *J. Biomol. Screen*. – 2006. – Vol. 11, №8. – P. 922–932.
 18. Koenigsmann M.P., Koenigsmann M., Notter M. et al. Adhesion molecules on peripheral blood-derived CD34⁺ cells: effects of cryopreservation and short-term ex vivo incubation with serum and cytokines // *Bone Marrow Transplant*. – 1998. – Vol. 22, №11. – P. 1077–1085.
 19. Kuzmuk K., Schook L. Pigs as a model for biomedical sciences. In: *The Genetics of the Pig*, second ed / Ed. by M.F. Rothschild, A. Ruvinsky. – Cambridge: Oxfordshire, 2011. – P. 426–444.
 20. Martin-Ibanez R., Hovatta O., Canals J. Cryopreservation of human pluripotent stem cells: are we going in the right direction? In: *Current Frontiers in Cryobiology* / Ed. by I.I. Katkov. – Croatia: InTech, 2012. – P. 139–165.
 21. Milosevic J., Storch A., Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23, №5. – P. 681–688.
 22. Morris C.B. Cryopreservation of animal and human cell lines. In: *Methods in Molecular Biology, Cryopreservation and Freeze-drying Protocols*. Vol. 38 / Ed. by J.G. Day, M.R. McLellan. – Humana Press Inc., 1995. – P. 179–187.
 23. Nyberg S.L., Hardin J., Amiot B. et al. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver // *Liver Transpl*. – 2005. – Vol. 11, №8. – P. 901–910.
 24. Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – Vol. 106, №31. – P. 12771–12775.
 25. Sanie-Jahromi F., Ahmadi H., Soheili Z.S. et al. Enhanced generation of retinal progenitor cells from human retinal pigment epithelial cells induced by amniotic fluid // *BMC Res. Notes*. – 2012. – Vol. 5 (182).
 26. Santana M.M., Chung K.F., Vukicevic V. et al. Isolation, characterization, and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla // *Stem Cells Transl Med*. – 2012. – Vol. 1, №11. – P. 783–791.
 27. Saxena S., Wahl J., Huber-Lang M.S. et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, №5. – e64454.
 28. Su G.H. *Pancreatic cancer: Methods and protocols*. – Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2005. – 352 p.
 29. Tan F.C., Lee K.H., Gouk S.S. et al. Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols // *CryoLetters*. – 2007. – Vol. 28, №6. – P. 445–460.
 30. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23, №6. – P. 727–737.
 31. Tomita Y., Matsumura K., Wakamatsu Y. et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart // *J Cell Biol*. – 2005. – Vol. 170, №7. – P. 1135–1146.
 32. Wagh V., Meganathan K., Jagtap S. et al. Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing // *Stem Cell Rev*. – 2011. – Vol. 7, №3. – P. 506–517.
 33. Xiong H., Gendelman H.E. *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research*. – New York: Springer-Verlag, 2014. – 585 p.
 13. Ivascu A., Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 2006; 11(8): 922–932.
 14. Koenigsmann M.P., Koenigsmann M., Notter M. et al. Adhesion molecules on peripheral blood-derived CD34⁺ cells: effects of cryopreservation and short-term ex vivo incubation with serum and cytokines. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(11): 1077–1085.
 15. Kuzmuk K., Schook L. Pigs as a model for biomedical sciences. In: Rothschild M.F., Ruvinsky A., editors. *The Genetics of the Pig*, 2nd ed. Cambridge: Oxfordshire, 2011; p. 426–444.
 16. Martin-Ibanez R., Hovatta O., Canals J. Cryopreservation of human pluripotent stem cells: are we going in the right direction? In: Katkov I.I., editor. *Current Frontiers in Cryobiology*. Croatia: InTech, 2012; p. 139–165.
 17. Milosevic J., Storch A., Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells* 2005; 23(5): 681–688.
 18. Morris C.B. Cryopreservation of animal and human cell lines. In: Day J.G., McLellan M.R., editors. *Methods in Molecular Biology, Cryopreservation and Freeze-drying Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc., 1995; p. 179–187.
 19. Nyberg S.L., Hardin J., Amiot B. et al. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transpl* 2005; 11(8): 901–910.
 20. Plaksina E.M., Sidorenko O.S., Legach E.I. et al. Expression of β -III-tubulin in the neonatal adrenal cell culture: comparison of monolayer and 3D-culture. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. series: Biology* 2017; 28: 76–86.
 21. Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(31): 12771–12775.
 22. Sanie-Jahromi F., Ahmadi H., Soheili Z.S. et al. Enhanced generation of retinal progenitor cells from human retinal pigment epithelial cells induced by amniotic fluid. *BMC Res Notes* 2012; 5 (182).
 23. Santana M.M., Chung K.F., Vukicevic V. et al. Isolation, characterization, and differentiation of progenitor cells from human adult adrenal medulla. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(11): 783–791.
 24. Saxena S., Wahl J., Huber-Lang M.S. et al. Generation of murine sympathoadrenergic progenitor-like cells from embryonic stem cells and postnatal adrenal glands. *PLoS One* 2013; 8(5): e64454.
 25. Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I., Bondarenko T.P. Formation of cytospheres and neuronal differentiation in newborn piglet adrenal cell culture. *Probl Cryobiol Cryomed* 2013; 23(4): 359–362.
 26. Su G.H. *Pancreatic cancer: Methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2005.
 27. Sukach A.N. Influence of DMSO on the viability of human embryonic nerve cells and their behavior under in vitro culture conditions. *Probl Cryobiol* 2005; 15(3): 429–432.
 28. Tamarina I., Bozhok G., Gurina T. et al. Cryopreservation of newborn mice adrenal cell suspension. II. Effect caused by concentration of serum as component of cryoprotective medium. *Probl Cryobiol Cryomed* 2013; 23(1): 66–74.
 29. Tan F.C., Lee K.H., Gouk S.S. et al. Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols. *CryoLetters* 2007; 28(6): 445–460.
 30. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005; 23(6): 727–737.
 31. Tomita Y., Matsumura K., Wakamatsu Y. et al. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 2005; 170(7): 1135–1146.
 32. Wagh V., Meganathan K., Jagtap S. et al. Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing. *Stem Cell Rev* 2011; 7(3): 506–517.
 33. Xiong H., Gendelman H.E. *Current Laboratory Methods in Neuro-science Research*. New York: Springer-Verlag; 2014.

