

УДК 57.086.13:611.018.82.085.2"461"

С.Г. Али, Г.А. Божок*

Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из первичной культуры клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят

UDC 57.086.13:611.018.82.085.2"461"

S.G. Ali, G.A. Bozhok*

Cryopreservation of Multicellular Spheroids Derived from Primary Culture of Newborn Piglet Spinal Ganglion Cells

Реферат: Спинальные ганглии (СГ) являются потенциальным источником нейральных стволовых клеток, поскольку содержат клетки-производные нервного гребня, способные дифференцироваться в нейроны и различные субпопуляции глиальных клеток. Известно, что при определенных условиях культивирования клетки СГ, полученные от неонатальных поросят, формируют флотирующие мультиклеточные сфероиды (МС), способные к выселению фибробластоподобных (ФБК), глиальных (ГЛК) и нейроноподобных (НПК) клеток. В настоящей работе проведено криоконсервирование МС, которые были получены в условиях бессывороточного культивирования, с использованием диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрациях 5; 7,5; 10% и двухэтапного режима замораживания. Установлено, что после криоконсервирования МС сохраняют способность к адгезии, а также выселению из них трех типов клеток – ГЛК, НПК и ФБК. Однако процесс выселения клеток из МС после криоконсервирования замедляется. Концентрация криопротектора влияет на тип клеток, преобладающий в культуре, полученной из размороженных МС. После криоконсервирования в присутствии 10% ДМСО монослой преимущественно состоит из ФБК, в то время как при концентрациях 5 и 7,5% – из ГЛК.

Ключевые слова: криоконсервирование, спинальные ганглии, мультиклеточные сфероиды, мантийные глиоциты, фибробластоподобные клетки, нейроноподобные клетки, неонатальные поросята.

Реферат: Спинальні ганглії (СГ) є потенційним джерелом нейральних стовбурових клітин, оскільки містять клітини – похідні нервового гребеня, які здатні диференціюватися в нейрони і різні субпопуляції гліальних клітин. Відомо, що при певних умовах культивування клітини СГ, отримані від неонатальних поросят, утворюють флотуючі мультиклітинні сфероїди (МС), здатні до виселення фібробластоподібних (ФБК), гліальних (ГЛК) і нейроноподібних (НПК) клітин. У даній роботі проведено криоконсервування МС, які були отримані в умовах безсироваткового культивування, з використанням диметилсульфоксиду (ДМСО) в концентраціях 5; 7,5; 10% і двоетапного режиму заморожування. Встановлено, що після криоконсервування МС зберігають здатність до адгезії, а також виселення із них трьох типів клітин – ГЛК, НПК і ФБК. Однак процес виселення клітин із МС після криоконсервування сповільнюється. Концентрація криопротектору впливає на тип клітин, що спостерігається переважно в культурі, отриманій з разморожених МС. Після криоконсервування у присутності 10% ДМСО моношар здебільшого складається з ФБК, у той час як при концентраціях 5 і 7,5% – із ГЛК.

Ключові слова: криоконсервування, спінальні ганглії, мультиклітинні сфероїди, мантийні гліоцити, фібробластоподібні клітини, нейроноподібні клітини, неонатальні поросята.

Abstract: Dorsal root ganglia (DRG) are a potential source of neural stem cells, since they contain the neural crest-derived cells capable to differentiate into neurons and different subpopulations of glial cells. It is known that under certain culture conditions, the DRG cells, derived from neonatal piglets form the floating multicellular spheroids (MSs), capable to produce the fibroblast-like cells (FLCs), glial cells (GCs) and neuron-like cells (NLCs). Here, we have cryopreserved the MSs, derived under serum-free culture conditions using 5, 7.5, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and two-stage regimen of freezing. After cryopreservation, the MSs were established to preserve the capability to adhere as well as to produce three cell types: FLCs, GCs and NLCs. However, the capability of frozen-thawed MSs to produce different cell types was reduced. The cryoprotectant concentration affected the cell type, prevailing in the culture, derived from the frozen-thawed MSs. After cryopreservation with 10% DMSO, the monolayer consisted mainly of FLCs, while with 5 and 7.5% DMSO it mostly comprised GLCs.

Key words: cryopreservation, dorsal root ganglia, multicellular spheroids, satellite glial cells, fibroblast-like cells, neuron-like cells, neonatal piglets.

Длительное сохранение жизнеспособной нервной ткани или клеток является современной и актуальной проблемой в связи с развитием методов лечения нейродегенеративных заболеваний и травм позвоночника. Криоконсервирование –

A prolonged preservation of viable nerve tissue or cells is a modern and topical task due to developing methods for therapy of neurodegenerative diseases and spinal injuries. Cryopreservation is the only reliable way for a long-term storage of biological

Відділ кріоендокринології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: bozhokgaru@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

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

Надійшла 28.01.2019

Прийнята до друку 14.11.2019

Received January, 28, 2019

Accepted November, 14, 2019

© 2019 G.A. Bozhok, 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.

единственный надежный способ долгосрочного хранения биологического материала, который позволяет не только сохранить его основные морфофункциональные характеристики, но и создать достаточный запас в криобанке [2].

В настоящее время внимание специалистов привлекают глиальные клетки периферической нервной системы, обладающие высоким потенциалом в восстановлении нарушений иннервации органов [8, 15, 16, 18].

В составе спинальных ганглиев (СГ) взрослого организма обнаружены мультипотентные стволовые клетки-производные нервного гребня, способные дифференцироваться в нейроны, глиальные клетки и миофибробласты [14]. При этом в СГ таких клеток приблизительно в 10 раз больше, чем в костном мозге и волосяном фолликуле.

Установлено, что шванновские клетки участвуют в реиннервации нервно-мышечных соединений и являются «направляющим» субстратом для прорастания нервного волокна [10]. Мантийные глиоциты (МГ) спинальных ганглиев способствуют выживанию чувствительных нейронов после травматического повреждения нерва [7, 18]. Травматическое повреждение периферического нерва приводит к изменению количества и морфофункциональных характеристик МГ [7, 13]. Более того, МГ, полученные в экспериментальных условиях от новорожденных животных, обладают некоторыми характеристиками нейральных стволовых клеток [17].

В настоящее время существуют различные способы получения первичной культуры клеток из СГ [11, 17]. Было установлено формирование флолирующих мультиклеточных сфероидов (МС) в культуре клеток, выделенной из СГ неонатальных поросят [1]. Культивирование клеток в составе МС – один из перспективных подходов, поскольку в данных условиях клетки проявляют свойства более ранних предшественников по сравнению с клетками, культивированными в виде монослоя [12]. Однако несмотря на перспективность применения культуры клеток из СГ, до сих пор практически не разработаны способы ее криоконсервирования.

Цель работы – изучение влияния состава криопротекторной среды и двухэтапного режима замораживания на морфофункциональные характеристики мультиклеточных сфероидов, полученных в первичной культуре клеток спинальных ганглиев новорожденных поросят.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от

material, which enables not only to preserve its major morphofunctional characteristics, but ensures its sufficient supply in cryobank as well [4].

Nowadays, the attention of specialists is focused on glial cells of peripheral nervous system due to their high potential in restoring disorders of organ innervation [13, 15, 16, 18].

Within the dorsal root ganglia (DRG) of adult organism there were revealed the neural crest-derived multipotent stem cells, capable to differentiate into neurons, glial cells and myofibroblasts [12]. Moreover, the number of these cells is approximately 10 times higher in DRG, than in bone marrow and hair follicle.

Schwann cells were established to participate in reinnervating the neuromuscular connections, being a 'directing' substrate for nerve fiber growth [7]. Satellite glial cells (SGCs) of spinal ganglia promote the survival for sensitive neurons after traumatic nerve injury [2, 18]. A traumatic injury to peripheral nerve changes the number and morphofunctional characteristics of SGCs [2, 11]. Moreover, the SGCs, derived under experimental conditions from the newborn animals have some features of neural stem cells [17].

Currently, there are different ways to derive the primary cell culture from DRG [8, 17]. There was established the formation of floating multicellular spheroids (MSs) in the cell culture, isolated from neonatal piglet DRG [1]. The cell culture within the MSs is one of the promising approaches, since under these conditions the cells manifest properties of earlier precursors as compared with those, cultured as a monolayer [10]. However, despite the prospects of using the cell culture from DRG, the methods for its cryopreservation have not been virtually developed yet.

The research aim was to study the impact of cryoprotective medium composition and the two-stage freezing regimen on morphofunctional characteristics of multicellular spheroids, derived from the primary cell culture of newborn piglet dorsal root ganglia.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (N 3447-IV of February 21, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986).



жестокое обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Для получения суспензии клеток использовали СГ суточных поросят. После извлечения СГ помещали в охлажденную среду α -MEM («Биолот», Россия), содержащую 100 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), 2,5 мкг/мл амфотерицина В («Biowest», Франция). Спинальные ганглии подвергали ферментативной дезагрегации в среде α -MEM, содержащей 1,25 мг/мл коллагеназы типа IA («ПанЭко») с последующей обработкой 0,25%-м раствором трипсина-ЭДТА с солями Хенкса («ПанЭко») по методу А. С. de Luca и соавт. [9]. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм для удаления клеточного дебриса. Сохранность полученных клеток, которую контролировали с помощью окрашивания 0,4%-м раствором трипанового синего, составляла в среднем $(70 \pm 10)\%$.

Клетки высевали в концентрации $0,5 \times 10^4$ кл/мл и культивировали в пластиковых чашках Петри с поверхностью, обработанной поли-D-лизином («Orange Scientific», Бельгия), при 37°C в атмосфере с $5\% \text{CO}_2$. Для культивирования использовали бессывороточную среду, приготовленную на основе α -MEM с добавлением 2% «Нейромакса» («ПанЭко»), гентамицина (100 мкг/мл) и амфотерицина В (2,5 мкг/мл). Замену половины объема среды осуществляли каждые 3–4 суток, проводили 10 опытов по получению культуры клеток из СГ.

На 8-е сутки в данных условиях культивирования формировались флотирующие МС. Их делили на две части, одну из которых подвергали криоконсервированию, а другую (контроль) пересевали на 24-луночный планшет с нормальной адгезивной поверхностью («SPL Life Sciences», Корея) в среде α -MEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС; «BioSera», Франция), 100 мкг/мл гентамицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В. Количество посеянных МС контролировали с помощью инвертированного микроскопа с таким условием, чтобы в лунках находилось по 8–12 МС.

В работе были использованы криопротекторные растворы на основе питательной среды α -MEM и 25% ФТС, содержащие ДМСО («Applichem», Германия) в конечной концентрации 5, 7,5 и 10%. Концентрирование МС осуществляли путем пассивной седиментации, супернатант декантировали. К 0,5 мл среды с МС добавляли

The DRG derived from daily piglets were used to procure the cell suspension. After extraction, the DRG were placed in a cooled α -MEM medium (Biolog, Russia), containing 100 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (PanEco, Russia) and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Biowest, France). The dorsal root ganglia were enzymatically disaggregated in α -MEM medium, containing 1.25 mg/ml collagenase type IA (PanEco), followed by treatment with 0.25% trypsin-EDTA solution with Hanks salts (PanEco) according to the method of A.C. de Luca et al. [6]. The resulting cell suspension was filtered through a nylon sieve with 100 μm pore diameter for cell debris removal. The derived cell survival, controlled by staining with 0.4% trypan blue solution, was $(70 \pm 10)\%$ in average.

The cells were plated at 0.5×10^4 cells/ml concentration and cultured in plastic Petri dishes coated with poly-D-lysine (Orange Scientific, Belgium) at 37°C and $5\% \text{CO}_2$. For cultivation, we used the α -MEM-based serum-free medium, supplemented with 2% NeuroMax (PanEco), gentamicin (100 $\mu\text{g/ml}$) and amphotericin B (2.5 $\mu\text{g/ml}$). A half of the medium volume was replaced every 3–4 days; 10 experiments were carried out to procure the cell culture from DRG.

To day 8 under these culture conditions, the floating MSs were formed. They were divided into two parts, one of which was cryopreserved, and the other (control) was replated on a 24-well plate with normal adhesive surface (SPL Life Sciences, Korea) in α -MEM medium, containing 10% fetal bovine serum (FBS; BioSera, France), 100 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B. The number of plated MSs was monitored using an inverted microscope in such a way that 8–12 MSs were in the wells.

Here, we used the cryoprotective solutions based on α -MEM nutrient medium and 25% FBS, containing DMSO (Applichem, Germany) at a final concentration of 5, 7.5 and 10%. The MSs were concentrated by passive sedimentation, the supernatant was decanted. The 0.5 ml medium with MSc was supplemented with an equal volume of the medium, preliminarily exposed at 10°C with a double concentrated DMSO. The saturation with cryoprotectant was done within 10 min.

The samples were frozen in cryovials (SPL Life Sciences, Korea) by the following program: the stage I comprised the 0.5 deg/min rate down to -20°C ; the stage II was 1 deg/min rate down to -80°C , followed by immersion into liquid nitrogen. We carried out 5 experiments on the DRG-derived cell culture cryopreservation.

The samples were thawed in a water bath at 37°C . To remove the cryoprotectant, a resulted suspension



равный объем предварительно выдержанной при температуре 10°C среды с двойной концентрацией ДМСО. Насыщение криопротектором проводили в течение 10 мин.

Образцы замораживали в криопробирках («SPL Life Sciences», Корея) по следующей программе: I этап – со скоростью 0,5 град/мин до –20°C; II этап – со скоростью 1 град/мин до –80°C с последующим погружением в жидкий азот. Было проведено 5 опытов по криоконсервированию культуры клеток из СГ.

Отогрев образцов осуществляли на водяной бане при температуре 37°C. Для удаления криопротектора к полученной суспензии по каплям добавляли 10-кратный объем питательной среды, седиментировали в течение 10 мин, супернатант удаляли. Данную процедуру повторяли дважды. Под визуальным контролем с помощью инвертированного микроскопа деконсервированные МС высевали по 8–12 штук на лунку в 24-луночный планшет с нормальной адгезивной поверхностью («SPL Life Sciences») и культивировали в среде α -MEM, содержащей 10% ФТС («BioSera») и антибиотики.

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

$$A = (1 - \text{ФМС}/\text{ОМС}) \times 100\%,$$

где ФМС – количество флотирующих МС; ОМС – общее количество МС.

Выселение клеток из МС изучали после деконсервирования и нахождения МС в течение 2-х суток в условиях культивирования. Относительную способность клеток МС к выселению вычисляли по формуле:

$$B = (\text{ВМС}/\text{ПМС}) \times 100\%,$$

где ВМС – количество МС с выселившимися клетками; ПМС – количество прикрепившихся МС.

Проводили морфологический и морфометрический анализ клеточного монослоя, сформированного в течение 10 суток культивирования МС в присутствии 10% ФТС в культуральных планшетах с нормальной адгезивной поверхностью. Для этого монослой фиксировали в 4%-м параформальдегиде («Sigma», США) в течение 15 мин, затем отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4, «Biowest») и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

was dropwise supplemented with a 10-fold volume of nutrient growth medium, sedimented within 10 min, and the supernatant was removed. This procedure was repeated twice. Under visual control, using an inverted microscope the frozen-thawed MSs were seeded by 8–12 pieces per well in a 24-well plate with a normal adhesive surface (SPL Life Sciences) and cultured in α -MEM medium, containing 10% FBS (BioSera) and antibiotics.

The adhesive capacity of MSs was determined in one day after thawing and staying under culture conditions. The relative number of attached MSs was calculated by the formula:

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

where FMS is the number of floating MSs; TMSs is the total number of MSs.

The cell production from MSs was studied after freeze-thawing and MSs staying for 2 days under culture conditions. The relative capacity of MSs cells to produce was calculated by the formula:

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

where PMSs is the number of MSs with produced cells; AMSs is the number of attached MSs.

The cell monolayer, formed during 10 days of MSs culturing in the presence of 10% FBS in the culture plates with a normal adhesive surface, was morphologically and morphometrically analyzed. For this purpose, the monolayer was fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, USA) for 15 min, then washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4, Biowest) and stained with hematoxylin and eosin by the standard technique.

Microphotography was carried out using an inverted microscope Biomed-4I (Biomed, Russia) with a Toup-Cam video eyepiece (Toup Tek, Photonics Co, China). The microphotographs were morphometrically analyzed using the Toup-View 3.7 software (Toup Tek, Photonics Co) and Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Germany).

The relative area of cell monolayer was assessed by the method described previously [15]. The relative number of cells with the certain morphological type in monolayer was calculated by the formula:

$$K = (\text{NCs} / \text{TCs}) \times 100\%,$$

where NCs is the number of cells with the certain morphological type; TCs is the total number of cells.

Quantitative data of the experiments are presented as the mean values \pm standard deviation. The type of distribution was analyzed using the Shapiro-Wilk



Микрофотосъемку осуществляли с помощью инвертированного микроскопа «Биомед-4И» (Россия) с видеоокулярном «TourCam» (Tour Tek, Photonics Co, Китай). Морфометрический анализ проводили по микрофотографиям с использованием программ «Tour-View 3.7» (Tour Tek, Photonics Co) и «Axio Vision Rel. 4.8» («Carl Zeiss», Германия).

Относительную площадь клеточного монослоя оценивали по методу, описанному ранее [6]. Относительное количество клеток определенного морфологического типа в монослое вычисляли по формуле:

$$K = (KK/OK) \times 100\%,$$

где КК – количество клеток определенного морфологического типа; ОК – общее количество клеток.

Количественные данные экспериментов представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Вид распределения анализировали с помощью W-критерия Шапиро-Уилка, значимость различий между группами данных рассчитывали с использованием параметрического t-критерия Стьюдента (для групп с нормальным распределением данных) и непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (для групп с ненормальным распределением данных). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При культивировании клеток, полученных из СГ неонатальных поросят, в бессывороточных условиях в присутствии 2%-го «Нейромакса», на 8-е сутки формировались МС диаметром в среднем (115 ± 59) мкм (рис. 1), затем МС криоконсервировали.

При пересеве в среду, содержащую 10% ФТС, нативные МС (контроль) прикреплялись к поверхности культурального планшета в течение первых нескольких часов. Через сутки способность нативных МС к адгезии составляла $(88,5 \pm 8)\%$ (рис. 2). После криоконсервирования МС сохраняли способность к адгезии. Статистически значимой разницы между контрольными и опытными образцами не наблюдалось, однако существовала тенденция к снижению адгезивной способности МС, которые подвергались криоконсервированию в присутствии 10% ДМСО.

На 2-е сутки наблюдалось выселение клеток из МС. Относительная способность клеток нативных МС к выселению составляла $(90 \pm 9)\%$ (рис. 3). В размороженных образцах наблюдалось снижение показателя, который для трех ис-

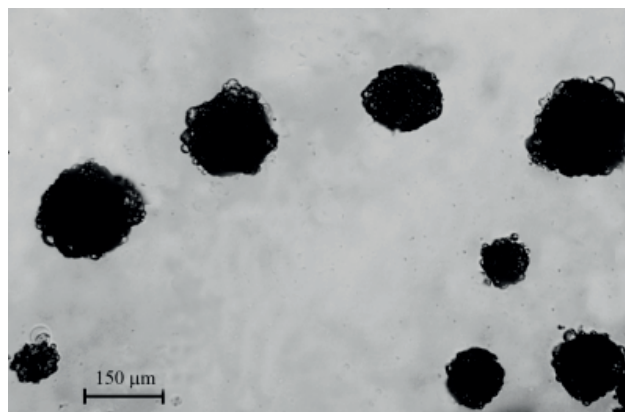


Рис. 1. Мультиклеточные сфероиды, полученные из СГ неонатальных поросят на 8-е сутки культивирования в бессывороточных условиях с 2%-м «Нейромаксом». Прижизненная фотосъемка, микроскопия в проходящем свете.

Fig. 1. Multicellular spheroids, derived from neonatal piglet DRG to day 8 of culture under serum-free conditions supplemented with 2% Neuromax. Vital imaging, transmitted light microscopy.

W-test, the significance of differences between the data groups was calculated using a parametric Student t-test (for groups with normal data distribution) and a non-parametric Kruskal-Wallis test (for groups with non-normal data distribution). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

When culturing the cells, derived from the neonatal piglet DRG under serum-free conditions in the presence of 2% Neuromax, to day 8 the MSs with an average diameter of (115 ± 59) μm were formed (Fig. 1), then MSs were cryopreserved.

When replated in the medium, containing 10% FBS, the native MSs (control) were attached to the surface of culture plate within first few hours. A day later, the capacity of native MSs to adhesion was $(88.5 \pm 8)\%$ (Fig. 2). After cryopreservation, the MSs preserved their capacity to adhere. Although there was no statistically significant difference between the control and experimental samples, a tendency to a decrease in adhesive ability of MSs, cryopreserved in 10% DMSO presence, was observed.

To day 2, the MSs produced the cells. The relative capacity of native MSs cells to produce was $(90 \pm 9)\%$ (Fig. 3). In the frozen-thawed samples, this index decreased, being within the range from 65 to 68% for three DMSO concentrations we used.

It is known that DRG comprises the bodies of sensitive neurons surrounding their SGCs; Schwann cells, producing an axonal myelination; connective tissue cells of endoneuria [9]. Thus,



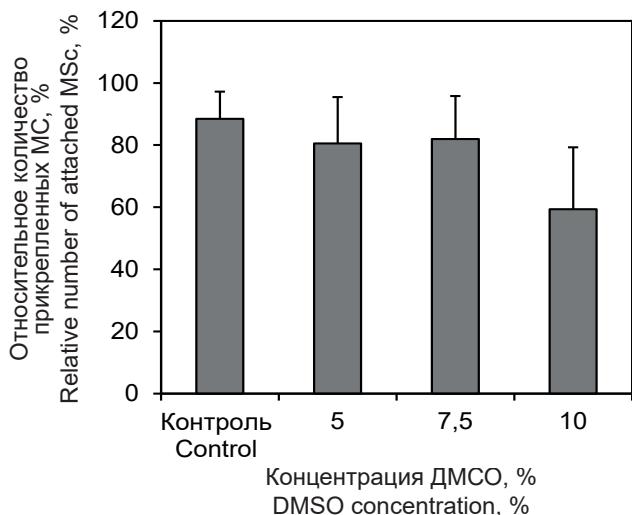


Рис. 2. Относительное количество прикрепленных МС после криоконсервирования в криозащитных средах, содержащих разные концентрации ДМСО. Первые сутки после размораживания и помещения МС в условия культивирования.

Fig. 2. Relative number of attached MSs after cryopreservation in cryoprotective media, containing different concentrations of DMSO. Day 1 after thawing and MSs placing under culture conditions.

пользованных концентраций ДМСО находился в пределах от 65 до 68%.

Известно, что в составе СГ присутствуют тела чувствительных нейронов, окружающие их МГ; шванновские клетки, создающие миелинизацию аксонов; соединительнотканые клетки эндоневрия [4]. Таким образом, суспензия клеток, полученная из СГ, является гетерогенной, а включение различных клеточных типов в состав МС и их рост зависит от структурно-функциональных особенностей самих клеток (жизнеспособность, способность к адгезии и пролиферации) и условий культивирования (состав питательной среды, наличие ростовых факторов). Перенос МС в среду, содержащую 10% ФТС, способствует прикреплению МС и выселению из них клеток [6]. Анализ сформировавшегося монослоя позволяет выяснить, какие типы клеток МС обладают способностью к миграции и пролиферации.

При культивировании нативных МС в среде с 10% ФТС в течение 10 суток наблюдалось формирование разреженного монослоя, состоящего из отростчатых клеток с включением более плотных участков из фибробластоподобных клеток (рис. 4, А). По морфологическим характеристикам в монослое выделяли три типа клеток. Крупные распластанные мультиполярные клетки со светло окрашенным ядром овальной формы и равномерно распределенным хроматином и одним–двумя хорошо заметными ядрышками были отнесены нами к фибробластоподобным клет-

the DRG-derived cell suspension is heterogeneous, but the inclusion of various cell types within the MSs composition and their growth depend on structural and functional characteristics of the cells themselves (viability, capacity to adhere and proliferate) and culture conditions (nutrient medium composition, presence of growth factors). The MSs transfer into the medium, containing 10% FBS promotes the MSs attachment and cell production from them [13]. The formed monolayer analysis enables elucidating the types of MSs cells with the capacity to migrate and proliferate.

The formation of a rarefied monolayer, consisting of dendritic cells with inclusion of denser sites from fibroblast-like cells, was observed when culturing the native MSs in the medium with 10% FBS for 10 days (Fig. 4A). In a monolayer three types of cells were distinguished by morphological characteristics. To fibroblast-like cells (FLCs) we referred the large flattened multipolar cells with a light-colored oval-shaped nucleus with evenly distributed chromatin and 1–2 clearly visible nucleoli. In a monolayer, the cells of a pyramidal (less often oval) shape with basophilic stained granules in cytoplasm and rounded nuclei with pronounced basophilia were also determined. This type cells had 2–3 long branching processes and we referred them to neuron-like cells (NLs). Small fusiform cells with a scanty cytoplasm, a dense, intensely

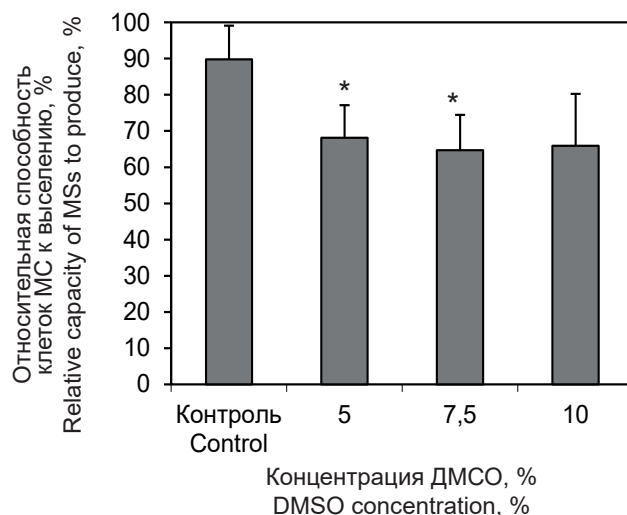


Рис. 3. Относительная способность клеток к выселению после криоконсервирования МС в криозащитных средах, содержащих разные концентрации ДМСО. 2-е сутки после размораживания и помещения МС в условия культивирования; * – отличия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 3. Relative capacity of cells to produce after MSs cryopreservation in cryoprotective media, containing different concentrations of DMSO. Day 2 after thawing and MSs placing under culture conditions; * – differences are significant as compared with the control, $p < 0.05$.



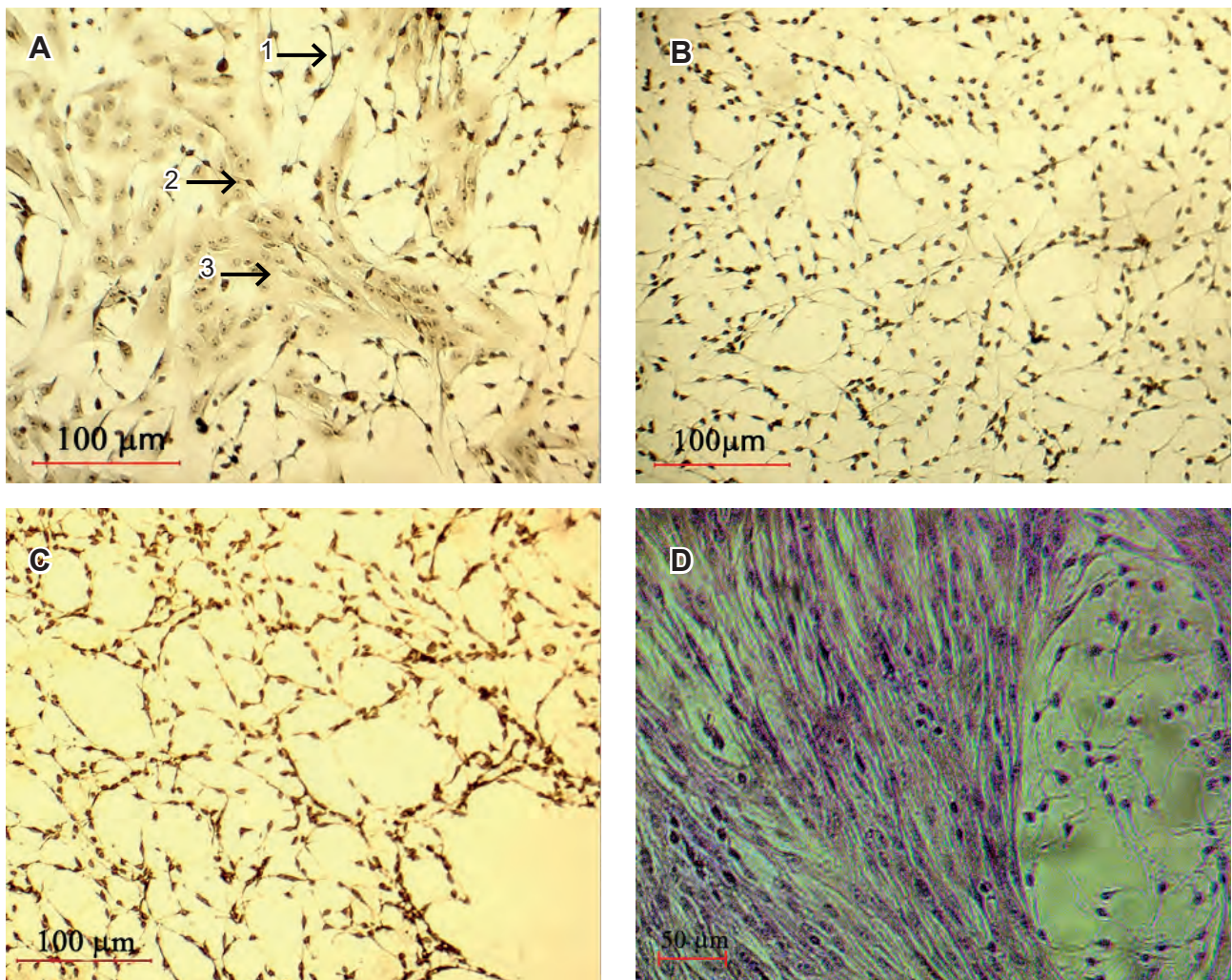


Рис. 4. Клеточный монослой, полученный из нативных (А) и криоконсервированных (В–D) МС на 10-е сутки культивирования. Мультиклеточные сфероиды, криоконсервированные с ДМСО в концентрациях: В – 5%, С – 7,5%, D – 10%. Окраска гематоксилином и эозином. 1 – НпК; 2 – ГлК; 3 – ФБК.

Fig. 4. Cell monolayer, derived from native (A) and cryopreserved (B–D) MSs to day 10 of culture. Multicellular spheroids were cryopreserved with DMSO in following concentrations: B – 5%, C – 7,5%, D – 10%. Hematoxylin and eosin stain. 1 – NLCs; 2 – GCs; 3 – FLCs.

кам (ФБК). В монослое также определялись клетки пирамидальной (реже овальной) формы с базофильно окрашенными глыбками в цитоплазме и округлыми ядрами с выраженной базофилией. Клетки данного типа имели по 2–3 длинных ветвящихся отростка и были отнесены нами к нейроноподобным клеткам (НпК). Мелкие веретеновидные клетки со скудной цитоплазмой, плотным интенсивно базофильным ядром и двумя короткими отростками были идентифицированы как глиальные клетки (ГлК).

При культивировании МС, криоконсервированных в присутствии различных концентраций ДМСО, также наблюдались выселение трех указанных выше типов клеток и формирование монослоя (рис. 4, В–D). Однако использование разных концентраций ДМСО влияло на соотношение клеток в монослое. В культуре, полученной из

basophilic nucleus and two short processes were identified as glial cells (GLCs).

When culturing the MSs, cryopreserved with differently concentrated DMSO, we also observed the production of three mentioned above cell types and the monolayer formation (Fig. 4B–D). However, the use of different concentrations of DMSO affected the cell ratio in monolayer. In the culture, derived from the native MSs we observed (61 ± 11)% of FLCs, (31 ± 7)% of GCs and (8 ± 3)% of NLCs (Fig. 5). A similar ratio of cell types was kept in the culture, derived from the MSs, cryopreserved with 10% DMSO. Herewith the number of FLCs and GCs was (56 ± 8)% and (35 ± 6)%, respectively, but (9 ± 3)% for NLCs. In the cultures derived from MSs, cryopreserved with 5 and 7.5% DMSO, a significant decrease in FLCs number down to 3–5%, as well as an increase in GCs and NLCs numbers



нативных МС, наблюдались ($61 \pm 11\%$) ФБК, ($31 \pm 7\%$) ГлК и ($8 \pm 3\%$) НпК (рис. 5). Подобное соотношение клеточных типов сохранялось в культуре, полученной из МС, криоконсервированных в присутствии 10% ДМСО. При этом количество ФБК составило ($56 \pm 8\%$), ГлК – ($35 \pm 6\%$), а НпК – ($9 \pm 3\%$). В культурах, полученных из МС, криоконсервированных в присутствии 5 и 7,5% ДМСО, наблюдалось значимое уменьшение количества ФБК до 3–5%, а также увеличение количества ГлК до 80–85% и НпК до 12–15%.

К 10-м суткам в культуре, полученной из нативных МС, наблюдалось формирование монослоя, относительная площадь которого достигала ($88,0 \pm 7,1\%$) (рис. 6). С увеличением срока культивирования (до 25-х суток) она незначительно изменялась. В культурах, полученных из криоконсервированных

МС, скорость формирования монослоя снижалась. На 10-е сутки его площадь составила ($26,3 \pm 6,1\%$) для МС, замороженных с 5% ДМСО, ($10,7 \pm 3,5\%$) для МС, замороженных с 7,5% ДМСО, и ($17,8 \pm 4,9\%$) для МС, замороженных с 10% ДМСО. Данный показатель увеличивался до терминального срока наблюдения и составил ($51,7 \pm 7,8\%$), ($20,1 \pm 6,9\%$) и ($38,5 \pm 9,5\%$) для культур, полученных из МС, консервированных под защитой 5, 7,5 и 10% ДМСО соответственно.

Ранее нами было установлено формирование флотирующих МС в первичной культуре клеток, полученной из СГ неонатальных поросят [1]. Показано, что при пересеве МС, формирующихся при культивировании в бессывороточной среде с 2%-й добавкой «Нейромакса», в культуральный планшет с нормальной адгезивной поверхностью на среду с 10% ФТС наблюдается прикрепление МС ко дну планшета. После этого из МС выселяются клетки нескольких типов (ФБК, ГлК, НпК), которые формируют монослой к 10-м суткам.

Известно, что в процессе криоконсервирования происходит повреждение клеточных структур без нарушения целостности плазматической мембраны. В связи с этим одним из методов оценки жизнеспособности МС после цикла замораживания-отогрева является их способность к прикреплению. Она реализуется через сложный комплекс мембранных рецепторов, которые

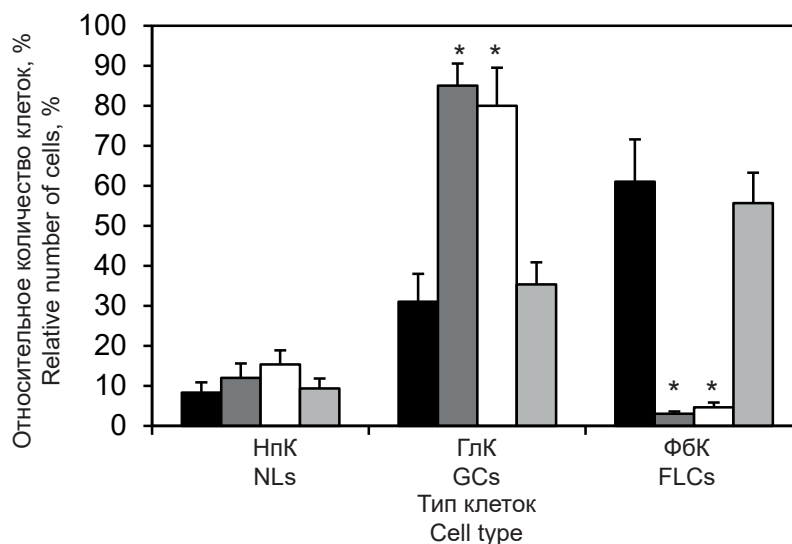


Рис. 5. Относительное количество клеток разных типов в монослое, полученном из нативных и криоконсервированных МС на 10-е сутки культивирования. □ – контроль; ■ – 5% ДМСО; ■ – 7,5% ДМСО; ■ – 10% ДМСО; * – отличия значимы по сравнению с количеством клеток соответствующего типа в контроле, $p < 0,05$.

Fig. 5. Relative number of cells of different types in monolayer, derived from native and cryopreserved MSs to day 10 of culture. □ – control; ■ – 5% DMSO; ■ – 7.5% DMSO; ■ – 10% DMSO; * – differences are significant as compared with the cell number of corresponding type in the control, $p < 0.05$.

up to 80–85% and 12–15%, respectively, were observed.

To day 10 in the culture, derived from native MSs, we noted the monolayer formation, the relative area of which reached ($88.0 \pm 7.1\%$) (Fig. 6). When increasing the culture period (up to 25 days), it slightly changed. In those cultures, derived from cryopreserved MSs, the rate of monolayer formation decreased. To day 10, its area made ($26.3 \pm 6.1\%$), ($10.7 \pm 3.5\%$) and ($17.8 \pm 4.9\%$) for the MSs, frozen with 5, 7.5 and 10% DMSO, respectively. This index augmented up to the final observation period and made ($51.7 \pm 7.8\%$), ($20.1 \pm 6.9\%$) and ($38.5 \pm 9.5\%$) for the cultures, derived from the MSs, preserved with 5, 7.5 and 10% DMSO, respectively.

Previously, we have established the formation of floating MSs in primary cell culture, procured from neonatal piglet DRG [1]. When replating the MSs, formed during culture in serum-free medium, supplemented with 2% Neuromax, into the culture plate with a normal adhesive surface on the medium with 10% FBS, the MSs attachment to the plate bottom was observed. After this, the cells of several types (FLCs, GCs, NLCs), which formed the monolayer to day 10, were produced from the MSs.

It is known that during cryopreservation, the cell structures are damaged without any disorder in plasma membrane integrity. Due to this fact, the



опосредуют взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом [3]. В настоящей работе мы установили, что после криоконсервирования МС сохраняются основные этапы развития культуры при пересеве в среду с 10%-й ФТС, которые включают прикрепление МС, выселение клеток трех типов, формирование монослоя.

Однако концентрация ДМСО, использованного в данной работе в качестве криопротектора, может оказывать влияние на некоторые этапы развития культуры. После криоконсервирования замедлялся процесс выселения клеток из МС, что согласуется с данными, полученными для МС, формирующихся из клеток надпочечников [5]. Криоконсервирование МС с использованием 10% ДМСО приводило к снижению способности клеток МС к адгезии в условиях культивирования. Криоконсервирование МС в криозащитной среде с 10 и 7,5% ДМСО, вероятно, приводило к частичному повреждению клеток в составе МС и уменьшению их пролиферативной активности, что замедляло формирование монослоя.

Преимущественный рост в культуре разных морфотипов клеток (ФБК, ГЛК, НпК) зависел от использованной концентрации ДМСО. Снижение концентрации ДМСО в криозащитной среде до 5–7,5% приводило к уменьшению количества ФБК больше чем в 10 раз и увеличению количества ГЛК приблизительно в два раза по сравнению с контролем (см. рис. 5). Эти результаты свидетельствуют о том, что вариация концентрации ДМСО в криозащитной среде при постоянном режиме охлаждения может являться способом селективного действия для получения культуры требуемого типа клеток.

Выводы

1. Криоконсервирование с использованием ДМСО в концентрациях 5, 7,5 и 10% и двухэтапного режима охлаждения (I этап со скоростью 0,5 град/мин до -20°C , II этап со скоростью 1 град/мин до -80°C) позволяют сохранить основные свойства МС, полученных из первичной культуры клеток СГ новорожденных поросят. После криоконсервирования МС сохраняются основные этапы развития культуры при пересеве в среду с 10%-й ФТС, которые включают прикрепление

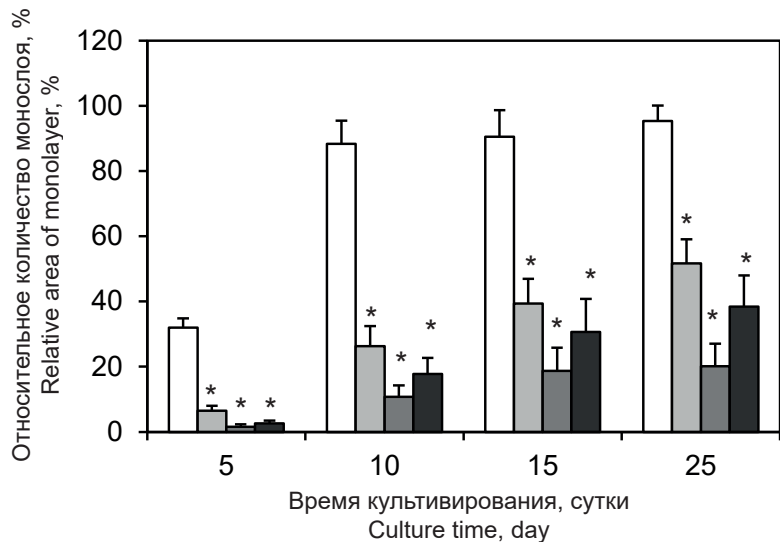


Рис. 6. Относительная площадь монослоя, поученного из нативных и криоконсервированных МС на разных сроках культивирования. □ – контроль; ■ – 5% ДМСО; ■ – 7,5% ДМСО; ■ – 10% ДМСО; * – отличия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Fig. 6. Relative area of the monolayer, derived from native and cryopreserved MSs at different stages of culture. □ – control; ■ – 5% DMSO; ■ – 7.5% DMSO; ■ – 10% DMSO; * – differences are significant as compared with the control, $p < 0.05$.

MSs viability after freeze-thawing cycle can be assessed by their capacity to attach. It is implemented through a cascade of membrane receptors, which mediate the cell interactions with extracellular matrix [5]. Here, we have established the fact, that after MSs cryopreservation, when replating into the medium with 10% FBS, the main stages of culture development, including the MSs attachment, production of cells of 3 types, and the monolayer formation, are preserved.

However, the concentration of DMSO, used here as a cryoprotectant, can affect some stages of culture development. After cryopreservation, the cell production from MSs was slowed down, which was consistent with the data obtained for MSs, formed from adrenal cells [14]. The MSs cryopreservation using 10% DMSO resulted in a decrease in MSs cell capacity to adhere under culture conditions. The MSs cryopreservation in cryoprotective medium with 10 and 7.5% DMSO most likely entailed a partial cell damage within MSs and a decrease in their proliferative activity, resulted in monolayer formation slowdown.

A predominant growth in the culture of different cell morphotypes (FLCs, GCs, NLCs) depended on the DMSO concentration we used. A decrease in DMSO concentration in cryoprotective medium down to 5–7.5% resulted in more than tenfold decrease in FLCs number and approximately twice increase in GCs as compared to the control (See Fig. 5). These findings testified to the fact, that



МС, выделение клеток трех типов (ГлК, НпК и ФБК), формирование монослоя.

2. Криоконсервирование МС приводит к частичному повреждению клеток их составе, что выражается в снижении способности клеток МС к адгезии, уменьшении скорости высеивания клеток из МС и формирования монослоя.

3. Концентрация ДМСО влияет на тип клеток (ГлК, НпК и ФБК), который превалирует в культуре после размораживания МС и переноса их в условия культивирования. Использование 10%-й концентрации ДМСО сохраняет соотношение клеточных типов, характерное для нативной культуры. В культурах, полученных из МС, криоконсервированных в криозащитных средах с 5 и 7,5% ДМСО, наблюдаются уменьшение относительного количества ФБК и увеличение ГлК и НпК.

Литература

1. Али СГ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Влияние состава питательной среды на морфологические характеристики культуры клеток спинальных ганглиев неонатальных поросят. Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Серия «Биология». 2018; 49–59.
2. Бондаренко ТП, Легач ЕИ, Киришча ВВ, и др. Культивирование, криоконсервирование и трансплантация ткани эндокринных желез. В: Гольцев АН, ред. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины; Харьков; 2012; 361–401.
3. Боценовский ВА, Барышников АЮ. Молекулы клеточной адгезии человека. Успехи современной биологии. 1994; 114(6): 741–53.
4. Кузнецов СЛ, Мушамбаров НН. Гистология, цитология и эмбриология. Учебник для медицинских вузов. Москва: МИА; 2007. 600 с.
5. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из надпочечников новорожденных поросят. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(4): 322–33.
6. Плаксина ЕМ, Сидоренко ОС, Легач ЕИ, и др. Экспрессия β-III-тубулина в культуре клеток неонатальных надпочечников: сравнение монослойного и 3D-культивирования. Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Серия «Биология». 2017; 76–86.
7. Arkhipova SS, Raginov IS, Mukhitov AR, et al. Satellite cells of sensory neurons after various types of sciatic nerve trauma in the rat. *Neurosci Behav Physiol.* 2010; 40(6): 609–14.
8. Barras FM, Kuntzer T, Zurn AD, et al. Local delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves facial nerve regeneration after late repair. *Laryngoscope.* 2009; 119(5): 846–55.
9. de Luca AC, Faroni A, Reid AJ. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration. *J Vis Exp [Internet].* 2015 [Cited 02.05.2019]; (96): e52543. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354675/>
10. Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol.* 2003; 32(5): 975–85.

the variation of DMSO concentration in cryoprotective medium under a constant cooling regimen, could be a way for a selective action to procure the culture of the required cell type.

Conclusions

1. Cryopreservation with 5, 7.5 and 10% DMSO and a two-stage cooling regimen (stage I with 0.5 deg/min rate down to -20°C , stage II with 1 deg/min rate down to -80°C) enables to preserve the main properties of the MSs, derived from the primary culture of newborn piglet DRG cells. After MSs cryopreservation, when replating into the media with 10% FBS, the main stages of culture development, included the MSs attachment, production of cells of 3 types (GCs, NLCs, and FLCs), and the monolayer formation, are preserved.

2. The MSs cryopreservation entails a partial cell damage within their composition, manifested in a decrease in MSs cell capacity to adhere, a decrease in cell production rate from MSs and the monolayer formation.

3. The DMSO concentration affects the cell type (GCs, NLCs and FLCs), which prevails in the culture after MSs thawing and transferring them under culture conditions. The use of 10% DMSO preserves the ratio of cell types inherent in native culture. In the cultures, derived from MSs, cryopreserved in cryoprotective media with 5 and 7.5% DMSO, a decrease in the relative number of FLCs and an increase in GCs and NLCs are observed.

References

1. Ali SG, Sidorenko OS, Bozhok GA. [Influence of nutrient medium composition on the morphological characteristics of culture of dorsal root ganglion cells of neonatal piglets]. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series «Biology».* 2018; 30: 49–59. Russian.
2. Arkhipova SS, Raginov IS, Mukhitov AR, et al. Satellite cells of sensory neurons after various types of sciatic nerve trauma in the rat. *Neurosci Behav Physiol.* 2010; 40(6):609–14.
3. Barras FM, Kuntzer T, Zurn AD, et al. Local delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves facial nerve regeneration after late repair. *Laryngoscope.* 2009; 119(5): 846–55.
4. Bondarenko TP, Legach EI, Kiroshka VV, et al. [Cultivation, cryopreservation and transplantation of the tissue of the endocrine glands]. In: Goltsev AN, editor. [Actual problems of cryobiology and cryomedicine.] Kharkiv: IPCC; 2012. p. 361–401. Russian.
5. Bozenovskiy VA, Baryshnikov AYU. [Human cell adhesion molecules]. *Uspekhi sovremennoi biologii.* 1994; 114(6): 741–53. Russian.
6. de Luca AC, Faroni A, Reid AJ. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: An in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration. *J Vis Exp. [Internet].* 2015 [cited 2019 May 02]; (96):e52543.



11. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, et al. Sox₂ promotes survival of satellite glial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 464(1): 269–74.
12. Li H, Dai Y, Shu J, et al. Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *Tissue Cell.* 2015; 47(1): 39–48.
13. Liu H, Zhao L, Gu W, et al. Activation of satellite glial cells in trigeminal ganglion following dental injury and inflammation. *J Mol Histol.* 2018; 49(3): 257–63.
14. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(4): 392–403.
15. Nascimento RS, Santiago MF, Marques SA, et al. Diversity among satellite glial cells in dorsal root ganglia of the rat. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(11): 1011–7.
16. Rosich K, Hanna BF, Ibrahim RK, et al. The effects of glial cell line-derived neurotrophic factor after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2017; 34(24): 3311–25.
17. Wang XB, Ma W, Luo T, et al. A novel primary culture method for high-purity satellite glial cells derived from rat dorsal root ganglion. *Neural Regen Res.* 2019; 13(2): 339–45.
18. Zhou XF, Deng YS, Chie E, et al. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(5): 1711–22.
- Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354675/>
7. Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol.* 2003; 32(5): 975–85.
8. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, et al. Sox2 promotes survival of satellite glial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 464(1): 269–74.
9. Kuznetsov SL, Mushkambarov NN. [Histology, cytology and embryology: Textbook for medical schools]. Moscow: MIA, 2007. 600 p. Russian.
10. Li H, Dai Y, Shu J, et al. Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *Tissue Cell.* 2015; 47(1): 39–48.
11. Liu H, Zhao L, Gu W, et al. Activation of satellite glial cells in trigeminal ganglion following dental injury and inflammation. *J Mol Histol.* 2018; 49(3): 257–63.
12. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(4): 392–403.
13. Nascimento RS, Santiago MF, Marques SA, et al. Diversity among satellite glial cells in dorsal root ganglia of the rat. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(11): 1011–7.
14. Plaksina EM, Sidorenko OS, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from newborn piglet adrenal glands. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27(4): 322–33.
15. Plaksina EM, Sidorenko OS, Legach EI, 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».* 2018; 28: 76–86. Russian.
16. Rosich K, Hanna BF, Ibrahim RK, et al. The effects of glial cell line-derived neurotrophic factor after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2017; 34(24): 3311–25.
17. Wang XB, Ma W, Luo T, et al. A novel primary culture method for high-purity satellite glial cells derived from rat dorsal root ganglion. *Neural Regen Res.* 2019; 13(2): 339–45.
18. Zhou XF, Deng YS, Chie E, et al. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(5): 1711–22.

