

Криоконсервирование мультиклеточных сфероидов, полученных из клеток дермальной папиллы кролика

О.Ю. Новикова, Т.П. Бондаренко, Г.А. Божок

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Multicellular Spheroids Derived from Rabbit Dermal Papilla Cells

O.Yu. Novikova, G.A. Bozhok, T.P. Bondarenko

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

Клетки дермальной папиллы (ДП) волосяного фолликула представляют пул мультипотентных клеток-производных нервного гребня [M. Sieber-Blum, 2004; M. Santana *et al.*, 2012]. Показана возможность получения мультиклеточных сфероидов (МС) из клеток ДП в условиях 3D-культивирования *in vitro*. По сравнению с монослойными культурами МС структурно приближены к ткани (содержат клетки и межклеточное вещество), поэтому могут служить моделью как для изучения гистогенеза ДП, так и для получения культуры клеток-производных нервного гребня.

Цель работы – изучение влияния состава криозащитной среды на способность клеток дермальной папиллы кролика формировать мультиклеточные сфероиды.

Выделение культуры клеток ДП проводилось по методике [M. Sieber-Blum, 2004]. Для получения МС монослой первичной культуры через 14 суток культивирования открепляли с подложки, используя 0,05% трипсин («Biowest», Франция) в ЕДТА («ПанЭко», Россия). Полученную суспензию клеток культивировали в планшетах («SPL», Германия) на среде ДМЕМ/F12 («Biowest»), содержащей 2% B27 («Sigma», США) и 20 нг/мл EGF («Sigma») при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Через трое суток МС подвергали криоконсервированию. Использовали следующие криозащитные среды: 1 – 5% фетальной телячьей сыворотки + 5% ДМСО; 2 – 10% ДМСО. Скорость охлаждения образцов составляла 1 град/мин до –80°C, с дальнейшим погружением в жидкий азот, через трое суток их деконсервировали и помещали в вышеописанную питательную среду для культивирования. Незамороженные МС, культивируемые в аналогичных условиях, служили контролем. На 7-е сутки культивирования измеряли диаметр МС с помощью программы для фотосъемки и анализа изображений LAN.

В контрольном варианте культуры средний диаметр МС составил (185,00 ± 17,78) мкм. Диаметр МС после криоконсервирования в среде 1 в среднем составил (116,50 ± 27,29) мкм, а в среде 2 – (120,38 ± 32,69) мкм. Размеры сфероидов в криоконсервированной культуре варьировали в более широких пределах: в контрольном варианте – 9,61%; среде 1 – 21,52% и среде 2 – 22,71%.

Таким образом, МС, полученные из криоконсервированной культуры, имеют меньшие размеры и более гетерогенны по размеру в первые семь суток наблюдения. Это может быть обусловлено частичной гибелью клеток в составе МС после криоконсервирования, а также замедлением активности пролиферативных процессов в клетках. Отсутствие значимых различий между диаметром МС, криоконсервированных в средах 1 и 2, говорит о возможности использования данных сред в зависимости от целей исследования – допустимости или исключения фетальной телячьей сыворотки.

The hair follicle dermal papilla (DP) cells represent a pool of multipotent neural crest-derived cells [M. Sieber-Blum, 2004; M. Santana *et al.*, 2012]. The possibility to procure the multicellular spheroids (MSs) from DP cells under 3D *in vitro* cultivation has been shown. If compared with the monolayer cultures, the MSs are structurally close to the tissue (they contain the cells and intercellular substance), therefore, they may serve both to simulate the DP histogenesis and to procure the neural crest-derived cell culture.

This research aim was to study the impact of cryoprotective medium composition on the capability of rabbit dermal papilla cells to form the multicellular spheroids.

The DP cell culture was isolated according to the method [M. Sieber-Blum, 2004]. To procure the MSs, a monolayer of the primary culture in 14 days after the culture was detached from the substrate by treating with 0.05% trypsin (Biowest, France) in EDTA (PanEko, Russia). The resulting cell suspension was cultured in plates (SPL, Germany) on DMEM/F12 (Biowest) medium, containing 2% B27 (Sigma, USA) and 20 ng/ml EGF (Sigma) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In 3 days the MSs were cryopreserved using the following protective media: the medium 1 comprised 5% fetal bovine serum + 5% DMSO; the medium 2 was 10% DMSO. The cooling rate of specimens was 1 deg/min down to –80°C, then they were immersed into liquid nitrogen, and 3 days later the samples were frozen-thawed and placed into the above nutrient medium for culture. The non-frozen MSs, cultured under the similar conditions served as the control. To day 7 of culture, the diameter of MSs was measured using the LAN software for photography and image analysis (Leica, Germany).

In the control, the average diameter of MSs was (185.00 ± 17.78) μm. The diameter of MSs after cryopreservation in the medium 1 made (116.50 ± 27.29) μm on average, and (120.38 ± 32.69) μm in the medium 2. The sizes of spheroids in a cryopreserved culture varied within wider limits, *i. e.* 9.61% in the control and 21.52 and 22.71% in the media 1 and 2, respectively.

Thus, the sizes of the MSs, procured from the cryopreserved culture were less and they were more heterogeneous in size in the first seven days of observation. This may be due to a partial cell death within the MSs composition after cryopreservation, as well as because of slowing down of the activity of proliferative processes in cells. The absence of significant differences between the diameter of the MSs, preserved in the media 1 and 2, suggests a possibility of further use of protective medium with a reduced concentration of cryoprotectant.