

УДК 57.086.13:611.018.82.085.2*461*

С.Г. Алі¹, Н.М. Моїсеєва², Г.А. Божок^{1*}

Кріоконсервування культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят

UDC 57.086.13:611.018.82.085.2*461*

S.G. Ali¹, N.M. Moiseieva², G.A. Bozhok^{1*}

Cryopreservation of Cell Culture Derived from Dorsal Root Ganglia of Neonatal Pigs

Реферат: У роботі досліджували вплив кріоконсервування з різними концентраціями диметилсульфоксиду (ДМСО) на морфологічно-функціональні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв (ККСГ). Клітини отримували зі спінальних гангліїв неонатальних поросят і культивували протягом 7 діб у живильному середовищі α -МЕМ з 10% фетальної телячої сироватки (ФТС). За даних умов спостерігається переважний ріст мантійних гліоцитів (МГ). Отриману культуру кріоконсервували на етапі 1 зі швидкістю 0,5 град/хв до -20°C , на етапі 2 – 1 град/хв до -80°C , після чого зразки занурювали у рідкий азот. Використовували кріозахисні розчини на основі середовища α -МЕМ, 25% ФТС та ДМСО в кінцевих концентраціях 5, 7,5 та 10%. Після відігріву на 10-ту добу субкультивування оцінювали життєздатність клітин, відносну площу моношару та експресію глутамінсинтетази як маркера МГ. Встановлено, що кріоконсервування ККСГ з використанням 7,5% ДМСО забезпечує після відігріву 87,7% життєздатних клітин та 85% відносної площі моношару від інтактного контролю. Кількість МГ становила близько 95%. Одержані результати дозволяють рекомендувати обраний режим для низькотемпературного зберігання культур клітин, збагачених МГ.

Ключові слова: кріоконсервування, культура клітин, спінальні ганглії, сателітні гліоцити, диметилсульфоксид, глутамінсинтетаза.

Abstract: The effect of cryopreservation with various concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) on morphofunctional properties of the dorsal root ganglia cell culture (DRGCC) was investigated in this research. Cells were obtained from the dorsal root ganglia of neonatal piglets and cultured for 7 days in α -MEM with 10% fetal calf serum (FCS). These conditions promote a predominant growth of satellite glial cells (SGCs). The resulting culture was cryopreserved at a rate of 0.5 deg / min to -20°C at stage 1, and at 1 deg / min to -80°C at stage 2, afterwards the samples were immersed into liquid nitrogen. Cryoprotective solutions based on α -MEM, 25% FBS, and DMSO at final concentrations of 5, 7.5, and 10% were used. After warming on day 10 of sub-culturing, the cell viability, relative monolayer area, and glutamine synthetase expression as a marker of SGCs were evaluated. It has been established that cryopreservation of DRGCC using 7.5% DMSO provided 87.7% of viable cells after warming and 85% relative monolayer area in respect of an intact control. The amount of SGCs was about 95%. The obtained results allow us to recommend the chosen regimen for low temperature storage of cell cultures enriched with MG.

Key words: cryopreservation, cell culture, spinal ganglia, satellite glial cells, dimethyl sulfoxide, glutamine synthetase.

Спінальні ганглії (СГ) в ембріогенезі формуються з клітин-похідних нервового гребеня. Гістологічно ганглії містить тіла чутливих нейронів (ЧН), які оточені мантійними гліоцитами (МГ), і мієлінізовані нервові волокна. Спінальні ганглії мають сполучнотканинну капсулу та прошарки ендоневрію з кровоносними судинами.

Культури клітин, отримані з чутливих гангліїв, широко використовують для дослідження морфологічних, фенотипових властивостей нейронів і периферичної глії, електрофізіологічних характеристик нейронів, механізмів передачі нервового імпульсу, ноцицепції і регенерації аксонів [12, 13, 19]. Оскільки чутливі ганглії в емб-

In embryogenesis the dorsal root ganglia (DRG) are formed from the neural crest-derived cells. Histologically, the ganglion contains the bodies of sensory neurons (SN), which are surrounded by satellite glial cells (SGCs) and myelinated nerve fibers. The dorsal root ganglia have a connective tissue capsule and layers of endoneurium with blood vessels.

Cell cultures derived from sensory ganglia are widely used to study the morphological, phenotypic properties of neurons and peripheral glia, electrophysiological characteristics of neurons, mechanisms of nerve impulse transmission, nociception, and axonal regeneration [11, 12, 19].

¹ Відділ кріоендокринології,

² Відділ холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

¹ Department of Cryoendocrinology,

² Department of Cold Adaptation, 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 15.07.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

Received July, 15, 2019

Accepted April, 23, 2020

© 2020 S.G. Ali, 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.

ріогенезі формуються з нервового гребеня, вони є цінним джерелом мультипотентних стовбурових клітин [16, 17].

На особливу увагу спеціалістів у галузі медико-біологічних наук заслуговують МГ – гліальні клітини периферичної нервової системи. Результати досліджень останніх років свідчать про важливу роль МГ у створенні мікрооточення ЧН, синаптичній передачі нервового імпульсу, рециркуляції нейромедіатора глутамату, відповіді на запалення або пошкодження периферичного нерва, а також у формуванні патологічного хронічного болю [7, 18, 25]. Встановлено, що МГ мають характеристики нейральних стовбурових клітин у культурі *in vitro* [3, 11, 26], тому можуть бути використані в регенеративній медицині.

Застосування живильного середовища з достатнім вмістом (10–15%) фетальної телячої сироватки (ФТС) дозволяє отримати зі СГ культуру клітин, збагачену МГ [1, 4, 14, 23]. Даний підхід було реалізовано в представленій роботі для отримання культури клітин спінальних гангліїв (ККСГ), збагаченої МГ.

Відповідно до сучасних тенденцій щодо впорядкування проведення експериментів на тваринах [8], кріоконсервовані культури клітин є зручним матеріалом для вирішення багатьох біомедичних задач. При цьому для екстраполяції отриманих даних на людину слід враховувати вид експериментальної тварини як джерела одержання культури клітин. У цьому аспекті більш прийнятним об'єктом є свиня, у якої будова і функція багатьох органів незрівнянно більш схожі з людською, ніж у лабораторних гризунів [10]. На підставі наведеного вище можна вважати, що одержання культур клітин із тканин свиней є перспективним.

Кріоконсервування – загальноприйнятий метод довгострокового зберігання первинних та перещеплюваних культур клітин. Однак у доступній науковій літературі відсутні відомості щодо чутливості ККСГ до чинників кріоконсервування.

Мета роботи – оцінка впливу кріоконсервування за різних концентрацій диметилсульфоксиду на морфофункціональні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят, збагаченої мантійними гліоцитами.

Матеріали і методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) з дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН Ук-

Since sensory ganglia in embryogenesis are formed from the neural crest, they are a valuable source of multipotent stem cells [15, 16].

The experts in biomedical sciences pay a special attention to SGCs, *i. e.* glial cells of the peripheral nervous system. The results of recent studies indicate an important role of SGCs when creating the microenvironment of SN, synaptic transmission of nerve impulse, neurotransmitter glutamate cycle, response to inflammation or damage of the peripheral nerve, as well as in the formation of pathological chronic pain [6, 17, 25]. SGCs have been shown to have characteristics of neural stem cells in culture *in vitro* [2, 10, 26], and therefore can be used in regenerative medicine.

The use of a nutrient medium with sufficient content (10–15%) of fetal calf serum (FCS) allows to obtain cell culture enriched with SGCs from DRG [1, 3, 13, 23]. This approach was implemented in the presented research to obtain of dorsal root ganglia a cell culture (DRGCC) enriched with SGCs.

According to current trends to regulate the experiments in animals [7], the cryopreserved cell cultures are a convenient platform for solving many biomedical tasks. In this case, to extrapolate the obtained data to humans, the species of experimental animal as a source of cell culture should be considered. In this respect, a pig is more suitable object in which the structure and function of many organs is incomparably more similar to that of humans than those of laboratory rodents [9]. Based on the above, we can assume that the deriving of cell cultures from pig tissues is promising.

Cryopreservation is a common method of long-term storage of primary and transplanted cell cultures. However, the available scientific reports lack an information on the sensitivity of DRGCC to cryopreservation factors.

The aim of this study was to evaluate the effect of cryopreservation in the presence of different concentrations of DMSO on morphofunctional properties of cell culture derived from neonatal piglets' dorsal root ganglia enriched with satellite glial cells.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV of February 2st, 2006) in compliance with the requirements of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, in accordance with the provisions of the 'European Convention



раїни, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Роботу проводили на СГ поросят добового віку. Суспензію клітин зі СГ отримували шляхом трьохетапної ферментативної обробки за методом А.С. de Luca і співавт. [6]. Для цього СГ спочатку інкубували протягом години в розчині 1,25 мг/мл колагенази типу ІА («ПанЕко», Росія), який готували на середовищі α -MEM. Ферментативний розчин видаляли, ополіскували свіжим середовищем і повторювали процедуру обробки з колагеназою. Потім видаляли ферментативний розчин і обробляли 0,25%-м розчином трипсину-ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко») протягом 30 хв. Механічну дезагрегацію клітин СГ проводили шляхом піпетування. Отриману суспензію клітин фільтрували через нейлонове сито і відмивали двічі при 110g.

Клітини висівали в концентрації 5×10^5 кл/мл на пластикові чашки Петрі з поверхнею, обробленою полі-D-лізином («Orange Scientific», Бельгія), і культивували при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ на живильному середовищі α -MEM із додаванням 10% ФТС («BioSera», Франція), гентаміцину («ПанЕко», 100 мкг/мл) і амфотеріцину В («ПанЕко», 2,5 мкг/мл). Заміну середовища здійснювали кожні 3–4 доби. Час культивування становив 7 діб. Всього з отримання ККСГ було проведено 14 експериментів.

Для субкультивування або кріоконсервування клітини первинної культури відкріпляли від підкладки 0,25%-м розчином трипсину з ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко») і відмивали у живильному середовищі з додаванням ФТС шляхом центрифугування протягом 5 хв при 110g на центрифугі MPW-260R («MPW Med. Instruments», Польща). Отриману клітинну суспензію ділили на дві частини. Одну частину (контроль) висівали в 24-лункові планшети («SPL LifeSciences», Республіка Корея) на живильне середовище вищевказаного складу і продовжували культивувати. Посівна концентрація клітин становила 4×10^4 кл/мл. Другу частину клітин кріоконсервували в захисному розчині, що містило живильне середовище α -MEM, 25% ФТС та ДМСО («AppliChem», Німеччина) у кінцевих концентраціях 5, 7,5 та 10%. До 0,5 мл клітинної суспензії з концентрацією 2×10^5 кл/мл додавали рівний об'єм попередньо витриманого при 10°C середовища з подвійною концентрацією ДМСО. Таким чином загальний об'єм кріоконсервованої суспензії становив 1 мл. Насичення кріопротектором проводили протягом 10 хв.

on the Protection of Vertebrates, Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

The research was performed in DRG of day-old piglets. The suspension of cells with DRG was obtained by three-step enzymatic treatment according to the method of A. de Luca *et al.* [5]. For this purpose, DRG was first incubated for one hour in a solution of 1.25 mg/ml collagenase type IA (PanEco, Russia), which was prepared with α -MEM. The enzyme solution was removed, rinsed with fresh medium and the treatment with collagenase was repeated. Then the enzyme solution was removed and treated with 0.25% trypsin-EDTA solution with Hanks salts (PanEco) for 30 min. DRG cells were mechanically disaggregated by pipetting. The resulted cell suspension was filtered through a nylon sieve and washed twice at 110g.

Cells were plated at a concentration of 5×10^5 cells/ml to plastic Petri dishes with a surface treated in poly-D-lysine (Orange Scientific, Belgium), and cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ with α -MEM with the addition of 10% FCS (BioSera, France), gentamicin («PanEco», 100 μ g/ml) and amphotericin B (PanEco, 2.5 μ g/ml). The medium was changed every 3–4 days. The cultivation time was 7 days. In total, 14 experiments were performed to obtain the DRGCC.

For sub-culturing or cryopreservation, the primary culture cells were detached from the substrate with a 0.25% trypsin EDTA solution with Hanks salts (PanEco) and washed in nutrient medium by the addition of FCS by centrifugation for 5 min at 110g MPW- 260R (MPW Med. Instruments, Poland). The resulted cell suspension was divided into two parts. One part (control) was seeded into 24-well plates (SPL LifeSciences, Republic of Korea) with the nutrient medium of the above composition and culturing continued. The seeding concentration of cells was 4×10^4 cells/ml. The second part of the cells was cryopreserved in a protective solution containing α -MEM, 25% FCS and DMSO (AppliChem, Germany) at final concentrations of 5, 7.5 and 10%. To 0.5 ml of cell suspension at a concentration of 2×10^5 cells/ml was added an equal volume of pre-incubated at 10°C medium with double concentration of DMSO. Thus, the total volume of cryopreserved suspension was 1 ml. The saturation with cryoprotectant was carried out for 10 min.

Samples were frozen in SPL Life Sciences test tubes at step 1 at a rate of 0.5 deg/min to –20°C, and at 1 deg/min to –80 °C at step 2, and then immersed into liquid nitrogen. The samples were warmed in a water bath at 37°C. To remove the cryoprotectant,



Зразки заморожували у кріопробірках («SPL Life Sciences») на етапі 1 зі швидкістю 0,5 град/хв до -20°C , на етапі 2 – 1 град/хв до -80°C , після чого занурювали в рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 37°C . Для видалення кріопротектору до розмороженої суспензії клітин по краплях додавали 10-кратний об'єм живильного середовища α -MEM, центрифугували протягом 5 хв при 110g, супернатант видаляли. Клітини висівали в 24-лункові планшети і культивували, як вказано вище.

Збереженість і вихід клітин після кріоконсервування оцінювали за допомогою методу забарвлення з трипановим синім. Для цього використовували 0,4%-й розчин барвника, який додавали до суспензії клітин у співвідношенні 1:1. Показник збереженості клітин визначали у відсотках як відношення кількості незабарвлених клітин до їх загальної кількості. Вихід клітин визначали у відсотках як відношення кількості незабарвлених клітин після кріоконсервування до їх кількості до кріоконсервування.

Клітинний моношар, сформований після пересіву контрольної або кріоконсервованої ККСГ (субкультивування), піддавали морфологічному аналізу. Відносну площу клітинного моношару оцінювали на різну добу культивування за методом Е. М. Плаксиної та співавт. [2]. Для цього клітини, культивовані в 24-лункових планшетах, фіксували в 4%-му розчині параформальдегіду («Sigma», США) протягом 30 хв, потім забарвлювали гематоксиліном і еозином. Планшети сканували на сканері «Epson Perfection V10» («Epson», Японія). Відносну площу, займану моношаром клітин, підраховували за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.8» («Carl Zeiss», Німеччина) за формулою:

$$S_{\text{моношару}} = \sum S_{\text{забарвлених ділянок}} / S_{\text{лунки}} \times 100\%.$$

Експресію глутамінсинтетази (ГС) як маркера МГ вивчали імуноцитохімічним методом. Використовували перші кролячі антитіла до ГС («Abcam», Велика Британія) в розведенні 1:700 та другі козячі антикролячі Alexa488-кон'юговані антитіла («Abcam») у розведенні 1:800. Клітинний моношар фіксували 15 хв в 4%-му розчині параформальдегіду з подальшим відмиванням PBS тричі по 5 хв. Пермеабілізацію проводили в 0,3%-му розчині Triton X-100 («Sigma») впродовж 10 хв. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували розчином PBS, який містив 0,1% Triton X-100 («Sigma»); 1% бичачого сироваткового альбуміну («Біолот», Росія); 0,3 М гліцину («Rea-

a 10-fold volume of α -MEM was dropwise added to the thawed cell suspension, centrifuged for 5 min at 110g, and the supernatant was removed. Cells were seeded in 24-well plates and cultured as indicated above.

Preservation and cell yield after cryopreservation were evaluated using the trypan blue staining method. To this end, a 0.4% dye solution was used, which was added to the cell suspension in a 1 : 1 ratio. The cell retention rate was defined as a percentage as the ratio of the number of unstained cells to their total. Cell output was defined as a percentage as the ratio of the number of unstained cells after cryopreservation to their number prior to cryopreservation.

The cell monolayer formed after transplantation of control or cryopreserved DRGCC (subculturing) was subjected to morphological analysis. The relative area of the cell monolayer was evaluated at different days of cultivation by the method of E.M. Plaksina *et al.* [18]. With this aim the cells cultured in 24-well plates were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, USA) for 30 min, then stained with hematoxylin and eosin. The culture plates were scanned on an Epson Perfection V10 (Epson, Japan) scanner. The relative area occupied by the monolayer of cells was calculated using the AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Germany) by the formula:

$$S_{\text{monolayer}} = \sum S_{\text{stained sections}} / S_{\text{wells}} \times 100\%.$$

The expression of glutamine synthetase (GS) as a marker of SGCs was studied by immunocytochemistry method. There were used the first rabbit antibodies to GS (Abcam, UK) at a 1:700 dilution and the second goat anti-rabbit Alexa488-conjugated antibodies (Abcam) at a 1:800 dilution. The cell monolayer was fixed for 15 min in a 4% paraformaldehyde solution, followed by washing with PCS three times for 5 min. Permeabilization was performed in 0.3% Triton X-100 (Sigma) solution for 10 min. Nonspecific antibody binding was blocked with a PCS solution containing 0.1% Triton X-100 (Sigma); 1% bovine serum albumin (Biolot, Russia); 0.3 M glycine (Reanal, Hungary) for one hour at room temperature. Incubation with the first antibodies was performed overnight at 4°C followed by PCS washing, with the second antibodies 30 min in the dark at room temperature followed by PCS washing. Cell nuclei were stained with a solution of Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) in PCS for 30 min in the dark at room temperature. The relative number of GS-positive cells per 100 cells of the monolayer was calculated and expressed as a percentage.



nal», Угорщина) впродовж години при кімнатній температурі. Інкубацію з першими антитілами проводили протягом ночі при 4°C із подальшим відмиванням PBS, з другими антитілами – 30 хв у темряві при кімнатній температурі з подальшим відмиванням PBS. Ядра клітин забарвлювали розчином Hoechst 33342 (5 мкг/мл, «Sigma») у PBS протягом 30 хв у темряві при кімнатній температурі. Підраховували відносну кількість ГС-позитивних клітин на 100 клітин моношару і виражали у відсотках.

Мікрофотозйомку здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа «Біомед-4И» («Біомед», Росія) з відеоокуляром «ToupCam 9 Мпкс» («ToupCam», Китай) і флуоресцентного мікроскопа «Carl Zeiss Axio Observer Z1» («Carl Zeiss»). Морфометричний аналіз проводили з використанням програми «ToupView 3.7» («ToupCam») і «AxioVision Rel. 4.8» («CarlZeiss»).

Оцінку розподілу даних проводили за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлка, значущість відмінностей розраховували за параметричним t-критерієм Стюдента (для груп із нормальним розподілом даних) і непараметричного критерію Краскела-Уолліса (для груп із ненормальним розподілом даних). Відмінності вважали статистично значущим при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За складом первинна ККСГ неонатальних поросят є гетерогенною (рис. 1). На 7-му добу культивування в ній виявляються кластери світлих великих клітин і моношар, що складається з фібробластоподібних клітин (ФБК), полігональних і веретеноподібних клітин із двома тонкими відростками. Як було раніше встановлено, кластери великих клітин є тілами ЧН, а полігональні та веретеноподібні клітини відносяться до МГ [4, 14, 23]. Одержана культура була піддана кріоконсервуванню.

Кріоконсервування у всіх використаних захисних середовищах зменшувало показник збереженості клітин, який у контрольній ККСГ становив $(92,6 \pm 1,6) \%$ (рис. 2), після кріоконсервування в середовищах з 5 і 10% ДМСО він знижувався на 9,3 і 8,9 % відповідно ($p < 0,05$), а в середовищі з 7,5% ДМСО – на 4,9%. Вихід життєздатних клітин був максимальним за умов використання кріозахисного середовища на основі 7,5% ДМСО (рис. 2).

Морфологічний аналіз показав, що після пересіву в контрольній і кріоконсервованій ККСГ тіла ЧН були відсутні (рис. 3). На початкових строках культивування (1–6 доба) у контрольній культурі моношар складався з МГ, розта-

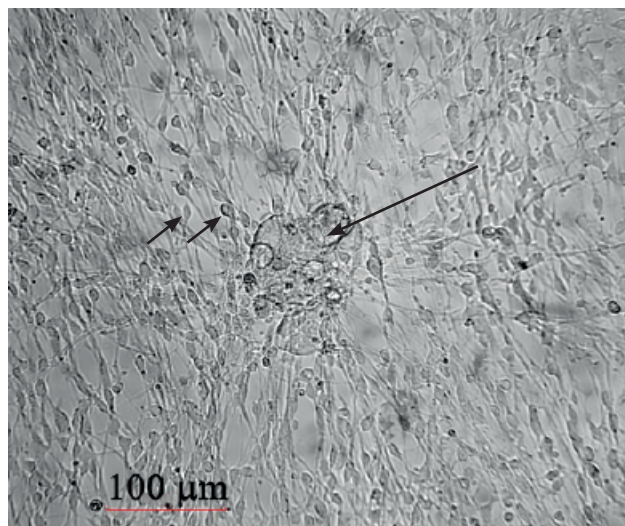


Рис. 1. ККСГ неонатальних поросят на 7-му добу культивування. Довгою стрілкою позначено кластер тіл ЧН, короткими – МГ.

Fig. 1. DRGCC of neonatal piglets on day 7 of cultivation. The long arrow indicates the cluster of SN bodies, the short ones indicates SGCs.

Microphotography was performed using an inverted microscope Biomed-4I (Biomed, Russia) with a video eyepiece ToupCam 9MP (ToupCam, China) and a fluorescence microscope Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). Morphometric analysis was carried out using ToupView 3.7 (ToupCam) and AxioVision Rel. 4.8 (CarlZeiss).

The data distribution was estimated using the Shapiro-Wilk W-test; the significance of the differences was calculated using the Student's parametric t-test (for groups with normal data distribution) and nonparametric Kraskell-Wallis test (for groups with abnormal data distribution). The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Composition of primary DRGCC of neonatal piglets is heterogeneous (Fig. 1). On day 7 of cultivation, the clusters of light large cells and a monolayer consisting of fibroblast-like cells (FBCs), polygonal and spindle-shaped cells with two thin processes are found in it. As previously established, large cell clusters are SN bodies, and polygonal and spindle cells belong to SGCs [3, 13, 23]. The resulted culture was cryopreserved.

Cryopreservation in all protective used media reduced the cell rate, which in the control DRGCC was $(92.6 \pm 1.6)\%$ (Fig. 2), after preservation in media with 5 and 10% DMSO, it decreased by 9.3 and 8.9% respectively ($p < 0.05$), and in the medium with 7.5% DMSO it did by 4.9%. The yield of viable cells was maximal when a cryoprotective medium based on 7.5% DMSO was used (Fig. 2).



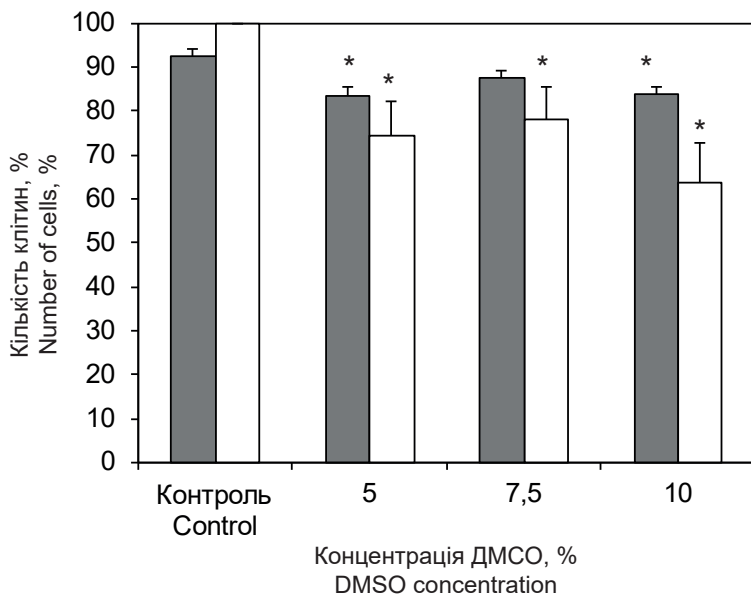


Рис. 2. Збереженість (■) та вихід (□) ККСГ неонатальних поросят після кріоконсервування в кріозахисних середовищах із різними концентраціями ДМСО. * – різниця значуща порівняно з контролем (К), $p < 0,05$.

Fig. 2. Preservation (■) and yield (□) of DRGCC of neonatal piglets after cryopreservation in cryoprotective media with different concentrations of DMSO. * – difference is significant compared to the control, $p < 0.05$.

шованих на підкладці з ФБК (рис. 3, А). Кріоконсервування впливало на клітинний склад та швидкість формування моношару. В кріоконсервованих культурах спочатку відбувалося розростання МГ, які формували комірчасту «мережу», тоді як активне розростання ФБК спостерігалось пізніше (рис. 3, В–Д).

На 4-ту добу в контролі відносна площа моношару становила ($86,2 \pm 4,7$)% (рис. 4), у кріоконсервованих зразках вона була майже в 2 рази менша. При цьому даний показник у ККСГ, кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО, значуще не відрізнявся: 5 % ДМСО – ($36,2 \pm 6,2$)%; 7,5 % ДМСО – ($37,5 \pm 5,0$)%; 10% ДМСО – ($45,0 \pm 7,1$)%. На 10-ту добу значущих відмінностей показника між контрольною та кріоконсервованими культурами вже не спостерігалось.

Характерною особливістю МГ є великий вміст ГС – ферменту, який каталізує перетворення глутамату в глутамін [15]. Однак відомо, що шваннівські клітини, які забезпечують мієлінізацію аксонів ЧН та присутні в СГ, не експресують ГС [26], тому використання антитіл до ГС дозволяє відрізнити субпопуляцію МГ від інших представників периферичної глії у ККСГ.

Забарвлення антитілами до ГС підтвердило належність полігональних і веретеноподібних клітин із двома тонкими відростками

Morphological analysis showed that after subculturing in the control and cryopreserved DRGCC, the SN bodies were absent (Fig. 3). At initial cultivation terms (1–6 days) in the control culture, the monolayer consisted of SGCs located on a substrate with FBC (Fig. 3A). Cryopreservation influenced the cellular composition and rate of monolayer formation. In cryopreserved cultures, MG growths were first observed, which formed a cellular ‘network’, whereas active growth of FBC was observed later (Fig. 3, B–D).

On day 4 in the control, the monolayer relative area was (86.2 ± 4.7)% (Fig. 4), in cryopreserved samples it was almost 2 times smaller. At the same time, this indicator did not differ significantly in DRGCC, cryopreserved with different concentrations of DMSO: 5% DMSO – (36.2 ± 6.2)%; 7.5% DMSO – (37.5 ± 5.0)%; 10% DMSO – (45.0 ± 7.1)%. On day 10 the strong differences between the control and cryopreserved cultures were no longer observed.

A characteristic feature of SGCs is a high content of GS, an enzyme that catalyzes the conversion of glutamate to glutamine [14]. However, it is known that Schwann cells, which provide myelination of CN axons and present in SG, do not express GS [26], so the use of antibodies to GS allows to distinguish a subpopulation of SGCs from other representatives of peripheral glia in DRGCC.

Staining with antibodies to GS confirmed the identity of polygonal and spindle cells with two thin processes to SGCs (Fig. 5). The relative number of GS-positive cells in the control culture was (80.0 ± 1.2)%, and in cryopreserved samples differed depending on the concentration of DMSO in the cryoprotective medium (Fig. 6). The highest number of such cells was observed in DRGCC frozen with 7.5% DMSO ((94.5 ± 5.1)% of control), and in samples frozen in the presence of 5 and 10% DMSO was (67.3 ± 7.6) and (75.4 ± 6.9)% of the control, respectively. Thus, the selected cooling mode with the use of a cryoprotectant medium based on 7.5% DMSO is best for maintaining the maximum amount of SGCs.

It is known that the morphological and functional properties of cell cultures derived from DRG depend on the culture conditions. After culturing in the absence of FCS, but with the addition of N2 nutrient and EGF/FGF growth factors from DRG of adult rats, multicellular spheroids contain-



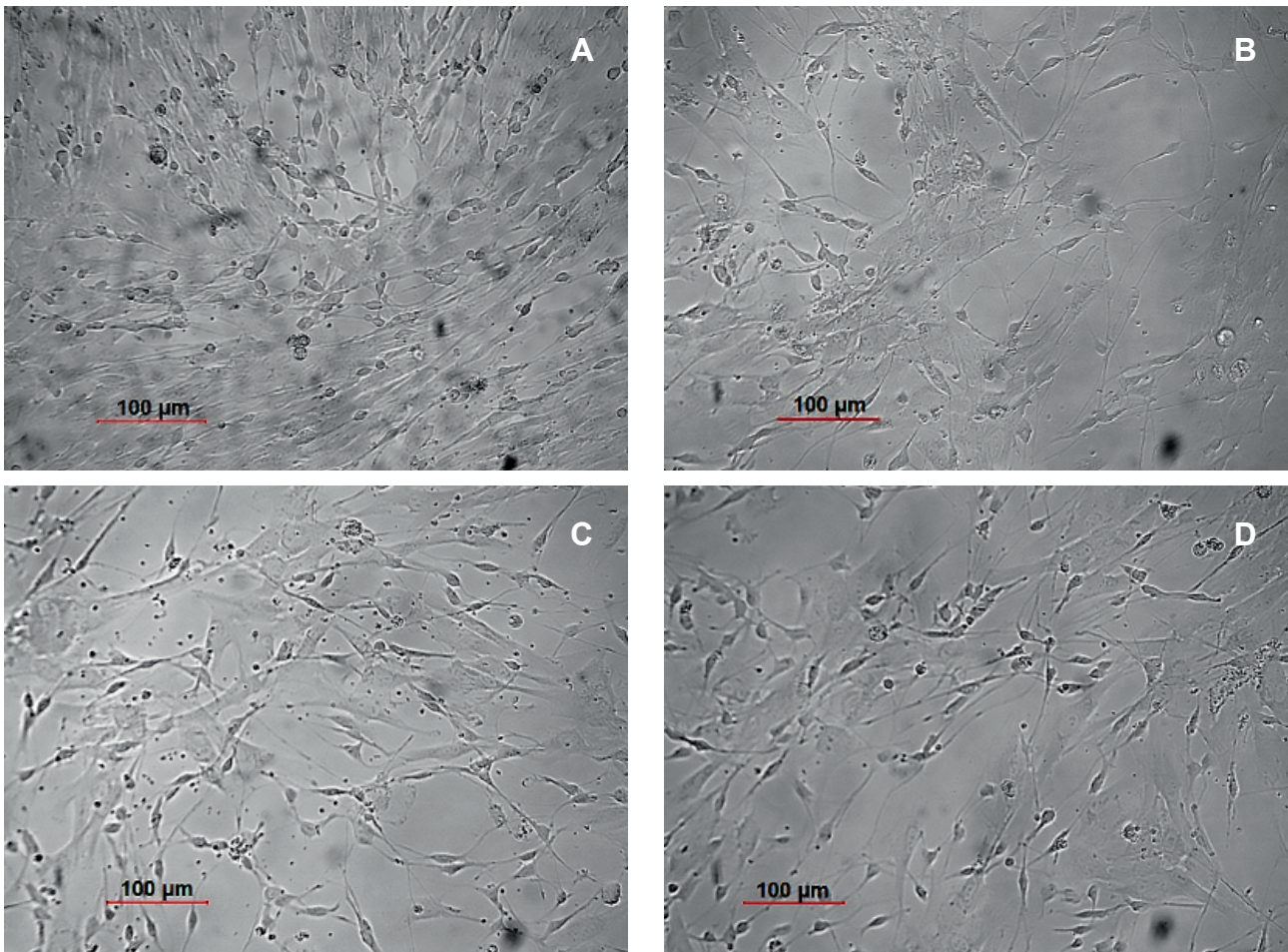


Рис. 3. ККСГ неонатальних поросят на 8-му добу: контрольна культура після пересіву (А); культура після криоконсервування з 5% (В); 7,5% (С); 10% (D) ДМСО та пересіву.

Fig. 3. DRGCC of neonatal piglets on day 8: control culture after re-plating (A); culture after cryopreservation with 5% (B); 7.5% (C); 10% (D) DMSO and re-plating.

до МГ (рис. 5). Відносна кількість ГС-позитивних клітин у контрольній культурі становила ($80,0 \pm 1,2$)%, а в криоконсервованих зразках відрізнялася залежно від концентрації ДМСО в криозахисному середовищі (рис. 6). Найбільша кількість таких клітин спостерігалася в ККСГ, замороженій у присутності 7,5% ДМСО ($94,5 \pm 5,1$)% від контролю), а у зразках, заморожених у присутності 5 і 10% ДМСО, становила ($67,3 \pm 7,6$) і ($75,4 \pm 6,9$)% від контролю відповідно. Таким чином, обраний режим охолодження за умов використання криозахисного середовища на основі 7,5% ДМСО є найкращим для збереження максимальної кількості МГ.

Відомо, що морфологічні та функціональні властивості клітинних культур, одержаних зі СГ, залежать від умов культивування. Після культивування за відсутності ФТС, але з додаванням поживної домішки N2 і ростових факторів EGF/FGF зі СГ дорослих щурів було отримано мультиклітинні сфероїди, які містили нейральні стовбурові клітини [22]. Метод експлантів доз-

ning neural stem cells were obtained [22]. The method of explants allowed H. Li *et al.* to obtain progenitor cells from DRG, which differentiated not only into different types of glial cells but also into neurons [10]. Exposure of cell culture from rat DRG to Neurobasal nutrient medium with B27 serum substitute enabled A. Svenningsen *et al.* to isolate oligodendrocyte precursor cells [24]. Moreover, they were detected in cultures derived from DRG embryos (E17) and week-old animals, but not adults. Based on this, the authors concluded that the investigated progenitor cells exist in the SG for a limited period.

Cultivation of cells derived from sensory ganglia in the presence of FCS promotes increased growth of SGCs [3, 4, 13, 23]. In our previous work, it has been shown that multicellular spheroids are formed from neonatal piglets under culturing conditions in serum-free media, and in the presence of 10% FCS, the culture looks like a monolayer [1]. Because the subject of these studies was SGCs, we used a nutrient medium with FCS and did not create



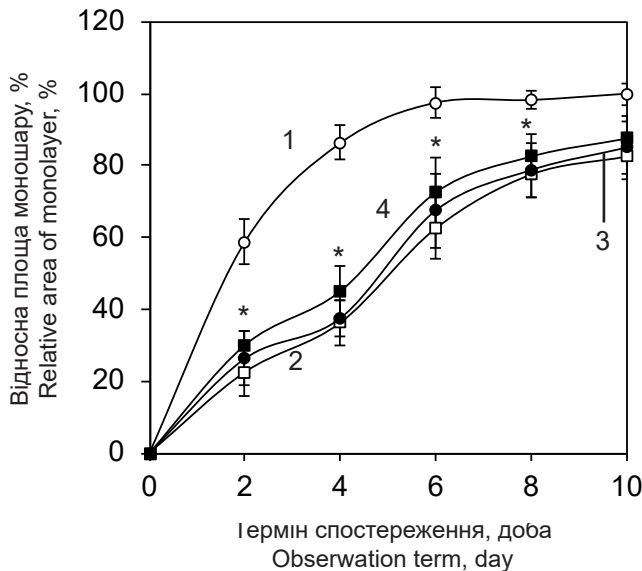


Рис. 4. Відносна площа моношару контрольної та кріоконсервованої в присутності різних концентрацій ДМСО ККСГ після пересіву: крива 1 – контроль, крива 2 – 5% ДМСО, крива 3 – 7,5% ДМСО, крива 4 – 10% ДМСО. * – різниця значуща порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Fig. 4. Relative area of the DRGCC monolayer (control and cryopreserved with different concentrations of DMSO after subculturing): curve 1 – control, curve 2 – 5% DMSO, curve 3 – 7.5% DMSO, curve 4 – 10% DMSO. * – difference is significant compared to the control, $p < 0.05$.

волив Н. Лі і співавт. [11] отримати зі СГ прогеніторні клітини, які диференціювалися не тільки в різні типи гліальних клітин, але і в нейрони. Витримка культури клітин зі СГ шурів на живильному середовищі Neurobasal із замінником сироватки B27 дозволила А. Svenningsen і співавт. [24] виділити клітини-попередники олігодендроцитів. Причому вони були виявлені в культурах, отриманих зі СГ ембріонів (E17) і тварин тижневого віку, але не у зрілих особин. На підставі цього автори зробили висновок, що досліджувані прогеніторні клітини існують у СГ протягом обмеженого періоду.

Культивування клітин, отриманих із чутливих гангліїв, у присутності ФТС сприяє підвищеному росту МГ [4, 5, 14, 23]. У нашій попередній роботі було показано, що зі СГ неонатальних поросят за умов культивування в безсироваткових середовищах утворюються мультиклітинні сфероїди [2], а в присутності 10% ФТС культура має вигляд моношару [1]. Оскільки об'єктом даних досліджень були МГ, ми використовували живильне середовище з ФТС і не створювали спеціальних умов для підтримки нейронів, що призводило до їх елімінації з культури після пересіву. У результаті отримана субкультура клітин зі СГ неонатальних поросят у ході культивування в присутності ФТС приблизно на 80% складалася з МГ.

special conditions to support the neurons, which led to their elimination from the culture after subculturing. As a result, approximately 80% of neonatal piglets' DRG cell subculture was maintained in the presence of FCS consisted of SGCs.

In the report of V. Belzer *et al.* [3] it has been found that after two days of cultivation, the expression of GS in SGCs derived from the ganglia of adult mice decreased. However, on day 14, we revealed a high expression of GS in both control and cryopreserved DRGCC of neonatal piglets. Such a contradiction may be explained by the use of different species of animals in these studies.

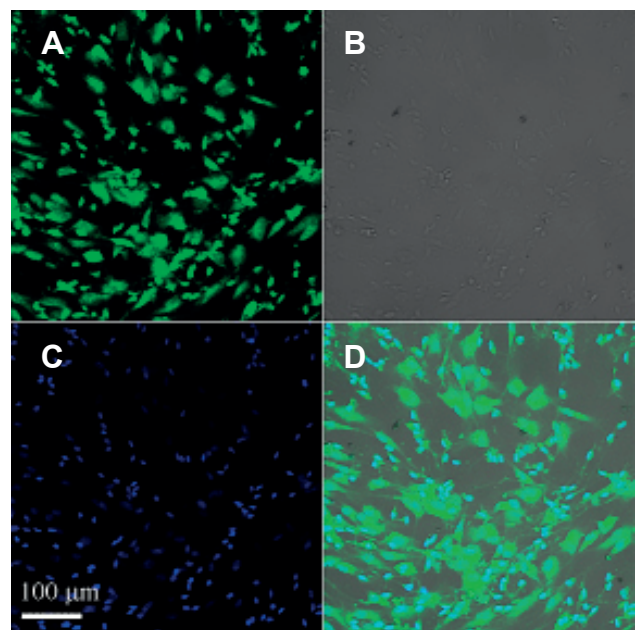


Рис. 5. Візуалізація GS-позитивних клітин у ККСГ неонатальних поросят на 14-ту добу субкультивування: А – зелена флуоресценція; В – синя флуоресценція; С – світло, яке проходить; D – поєднана зелена і синя флуоресценція. Забарвлення Alexa488-кон'югованими антитілами до GS (зелена флуоресценція) і ядер клітин Hoechst 33342 (синя флуоресценція).

Fig. 5. Visualization of GS-positive cells in DRGCC of neonatal piglets on day 14 of sub-culturing: 1 – green fluorescence; 2 – blue fluorescence; 3 – light that passes; 4 – combined green and blue fluorescence. Staining with Alexa488-conjugated antibodies to GS (green fluorescence) and Hoechst 33342 cell nuclei (blue fluorescence).

One of the pressing issues of cryobiology is the cryopreservation of cells derived from DRG. Currently, there are methods of cryopreservation of isolated sensory DRG neurons of dogs and rats in a protective environment based on 10% DMSO and FCS [20, 21]. However, studies aimed at investigating the sensitivity of SGCs to cryopreservation are virtually absent. In addition, it is known

У роботі V. Belzer і співавт. [4] було встановлено, що після дводобового культивування знижується експресія ГС у МГ, отриманих із гангліїв дорослих мишей. Однак на 14-ту добу ми виявили високу експресію ГС як у контрольній, так й кріоконсервованій ККСГ неонатальних поросят. Таке протиріччя може пояснюватися використанням у дослідженнях різних видів тварин.

Одним із актуальних питань кріобіології є кріоконсервування клітин, отриманих зі СГ. На даний час існують способи кріоконсервування ізольованих чутливих нейронів СГ собак і щурів у захисному середовищі на основі 10% ДМСО та ФТС [20, 21]. Однак дослідження, спрямовані на вивчення чутливості МГ до кріоконсервування, практично відсутні. Крім того відомо, що підвищення концентрації ДМСО в кріозахисних розчинах негативно впливає на структурно-функціональні властивості клітин [9], тому важлива розробка середовищ зі зменшеним вмістом цього кріопротектору. З огляду на вищевикладене, нами були протестовані кріозахисні середовища з концентрацією ДМСО менш 10%.

Встановлено, що ККСГ неонатальних поросят є досить стійкою до пошкодження факторами кріоконсервування. На користь цього факту свідчить висока збереженість клітин (83–87%) відразу після розморожування, яка залежала від концентрації ДМСО. Однак після культивування розморожених клітин концентрація кріопротектору в кріозахисному середовищі не чинила значного впливу на швидкість утворення моношару.

Збереженість МГ залежала від концентрації ДМСО. У культурах після кріоконсервування з 5 та 10% ДМСО відносна кількість МГ зменшувалася на 33 та 25% відповідно порівняно з контролем, а з 7,5% ДМСО вона значуще не відрізнялася від контролю.

Таким чином, отримані результати дозволяють рекомендувати використання ДМСО в концентрації 7,5% у складі захисного середовища для кріоконсервування ККСГ, збагаченої МГ.

Висновки

Кріоконсервування ККСГ у присутності кріопротектору ДМСО за умов повільного охолодження (етап 1 – 0,5 град/хв до -20°C ; етап 2 – 1 град/хв до -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот) дозволяє зберегти 83–87% життєздатних клітин, але знижує швидкість формування моношару в умовах субкультивування.

Доцільне використання кріозахисного середовища на основі 7,5% ДМСО, оскільки порів-

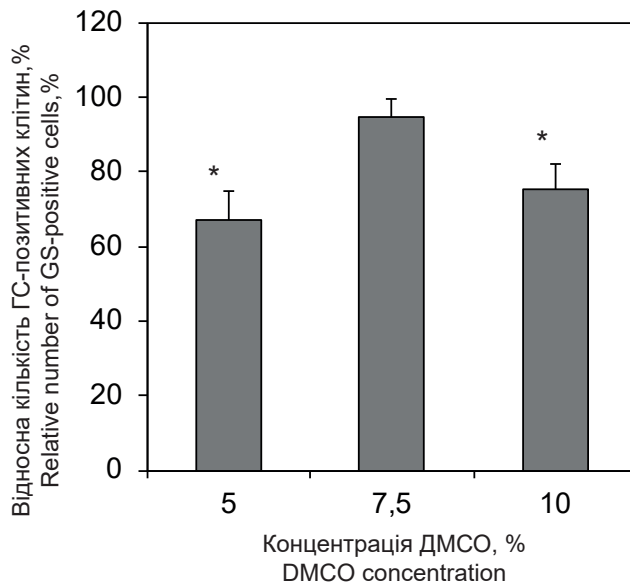


Рис. 6. Відносна кількість ГС-позитивних клітин на 14-ту добу субкультивування ККСГ, кріоконсервованої в середовищах із різними концентраціями ДМСО. За 100% прийнято кількість ГС-позитивних клітин у контрольній ККСГ. * – різниця значуща порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Fig. 6. Relative number of GS-positive cells on day 14 of sub-culturing of DRGCC, cryopreserved in media with different concentrations of DMSO. Number of GS-positive cells in the control DRGCC was assumed as 100%. * – difference is significant compared to the control, $p < 0.05$.

that increasing the concentration of DMSO in cryoprotective solutions adversely affects the structural and functional properties of cells [8], so the development of media with a reduced content of this cryoprotectant is vital. In view of the above, we have tested the cryoprotective media with DMSO concentration of below 10%.

DRGCC of neonatal piglets has been established to be quite a resistant to damage by cryopreservation factors. This fact is evidenced by the high safety of cells (83–87%) immediately after thawing, which was dependent on DMSO concentration. However, after culturing the thawed cells, concentration of cryoprotectant in cryoprotective medium did not significantly affect the rate of monolayer formation.

SGCs preservation depended on DMSO concentration. In cultures after cryopreservation with 5 and 10% DMSO, the relative amount of SGCs decreased by 33 and 25%, respectively, compared with the control, and with 7.5% DMSO it was not significantly different from the control.

Thus, the obtained results allow us to recommend the use of 7.5% DMSO as part of a protective medium for cryopreservation of the DRGCC enriched with SGCs.



няно з контролем досягаються максимальні показники: кількість життєздатних клітин – 87,7%, відносна кількість МГ – 94,5%.

Література

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; 30: 49–59.
2. 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; 28: 76–86.
3. Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, et al. Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2007; 32 (2): 97–107.
4. Belzer V, Shraer N, Hanani M. Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia. *Neuron Glia Biol*. 2010; 6 (4): 237–43.
5. Capuano A, De Corato A, Lisi L, et al. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. *Molecular Pain*. 2009; 5:43.
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*. 2015; 96: e52543. [Cited 02.05.2019]. Available from: <https://www.jove.com/video/52543/dorsal-root-ganglia-neurons-differentiated-adipose-derived-stem-cells>
7. Feldman-Goriachnik R, Wu B, Hanani M. Cholinergic responses of satellite glial cells in the superior cervical ganglia. *Neurosci Lett*. 2018; 671: 19–24.
8. Fernandes MR, Pedroso AR. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Rev Assoc Med Bras [Internet]*. 2017 Nov [cited 2019 June 20]; 63(11): 923–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302017001100923&lng=en.
9. Hornberger K, Yu G, McKenna D, et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: Emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46 (3): 188–96.
10. Humphray SJ, Scott CE, Clark R, et al. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biology*. 2007; 8 (7): R139.
11. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells*. 2007; 25 (8): 2053–65.
12. Lin YT, Chen JC. Dorsal Root Ganglia Isolation and Primary Culture to Study Neurotransmitter Release. *J Vis Exp [Internet]*. 2018 [cited 02.05.2019]; 140: e57569. Available from: <https://www.jove.com/video/57569/dorsal-root-ganglia-isolation-primary-culture-to-study>.
13. Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc*. 2007; 2 (1): 152–60.
14. Meller K. The reaggregation of neurons and their satellite cells in cultures of trypsin-dissociated spinal ganglia. *Cell Tiss. Res*. 1974; 152 (2): 175–83.
15. Miller KE, Richards BA, Kriebel RM. Glutamine-, glutaminyl synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Brain Res*. 2002; 945 (2): 202–11.

Conclusions

The DRGCC cryopreservation in the presence of DMSO cryoprotectant under slow cooling conditions (stage 1 – 0.5 deg/min to -20°C ; stage 2 – 1 deg/min to -80°C with further immersion into liquid nitrogen) allowed the preserving of 83–87% viable cells, but reduced the rate of monolayer formation under sub-culturing conditions.

The cryoprotective medium based on 7.5% DMSO is advisable to be used, since the maximum values were reached in comparison with the control: the number of viable cells was 87.7%, the relative amount of SGCs made 94.5%.

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.
2. Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR et al. Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2007; 32 (2): 97–107.
3. Belzer V, Shraer N, Hanani M. Phenotypic changes in satellite glial cells in cultured trigeminal ganglia. *Neuron Glia Biol*. 2010; 6 (4): 237–43.
4. Capuano A, De Corato A, Lisi L, et al. Proinflammatory-activated trigeminal satellite cells promote neuronal sensitization: relevance for migraine pathology. *Molecular Pain*. 2009; 5: 43.
5. 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*. 2015; 96: e52543. [Cited 02.05.2019]. Available from: <https://www.jove.com/video/52543/dorsal-root-ganglia-neurons-differentiated-adipose-derived-stem-cells>
6. Feldman-Goriachnik R, Wu B, Hanani M. Cholinergic responses of satellite glial cells in the superior cervical ganglia. *Neurosci Lett*. 2018; 671: 19–24.
7. Fernandes MR, Pedroso AR. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Rev Assoc Med Bras [Internet]*. 2017 Nov [cited 2019 June 20]; 63(11): 923–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302017001100923&lng=en.
8. Hornberger K, Yu G, McKenna D, et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: Emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46 (3): 188–96.
9. Humphray SJ, Scott CE, Clark R, et al. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biology*. 2007; 8 (7): R139.
10. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells*. 2007; 25 (8): 2053–65.
11. Lin YT, Chen JC. Dorsal Root Ganglia Isolation and Primary Culture to Study Neurotransmitter Release. *J Vis Exp [Internet]*. 2018 [cited 02.05.2019]; 140: e57569. Available from: <https://www.jove.com/video/57569/dorsal-root-ganglia-isolation-primary-culture-to-study>.
12. Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in



16. 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.
17. Ogawa R, Fujita K, Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Biol Open*. 2017; 6 (5): 602–18.
18. Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, et al. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist*. 2009; 15 (5): 450–63.
19. Poulsen JN, Larsen F, Duroux M, et al. Primary culture of trigeminal satellite glial cells: a cell-based platform to study morphology and function of peripheral glia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014; 6 (1): 1–12.
20. Schwarz S, Spitzbarth I, Baumgärtner W, Lehmbecker A. Cryopreservation of canine primary dorsal root ganglion neurons and its impact upon susceptibility to paramyxovirus infection. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Feb 28 [cited 02.05.2019]; 20 (5): 1058. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1058>.
21. Seggio AM, Ellison KS, Hynd MR, et al. Cryopreservation of transfected primary dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci Methods*. 2008; 173 (1): 67–73.
22. Singh RP, Cheng YH, Nelson P, et al. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells. *Cell Transplant*. 2009; 18 (1): 55–68.
23. Smith RA, McInnes IB. Phase contrast and electron microscopical observations of adult mouse dorsal root ganglion cells maintained in primary culture. *J Anat*. 1986; 145:1–12.
24. Svenningsen A, Colman DR, Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors. *Fex Neuron Glia Biol*. 2004; 1 (1): 85–93.
25. Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009; 33 (6): 784–92.
26. 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; 14 (2): 339–45.
- studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc*. 2007; 2 (1): 152–60.
13. Meller K. The reaggregation of neurons and their satellite cells in cultures of trypsin-dissociated spinal ganglia. *Cell Tiss. Res*. 1974; 152 (2): 175–83.
14. Miller KE, Richards BA, Kriebel RM. Glutamine-, glutaminyne-synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylaseimmunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Brain Res*. 2002; 945 (2): 202–11.
15. 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.
16. Ogawa R, Fujita K, Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Biol Open*. 2017; 6 (5): 602–18.
17. Ohara PT, Vit JP, Bhargava A, et al. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist*. 2009; 15 (5): 450–63.
18. 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.
19. Poulsen JN, Larsen F, Duroux M, et al. Primary culture of trigeminal satellite glial cells: a cell-based platform to study morphology and function of peripheral glia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014; 6 (1): 1–12.
20. Schwarz S, Spitzbarth I, Baumgärtner W, Lehmbecker A. Cryopreservation of canine primary dorsal root ganglion neurons and its impact upon susceptibility to paramyxovirus infection. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Feb 28 [cited 02.05.2019]; 20 (5): 1058. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1058>.
21. Seggio AM, Ellison KS, Hynd MR, et al. Cryopreservation of transfected primary dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci Methods*. 2008; 173 (1): 67–73.
22. Singh RP, Cheng YH, Nelson P et al. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells. *Cell Transplant*. 2009; 18 (1): 55–68.
23. Smith RA, McInnes IB. Phase contrast and electron microscopical observations of adult mouse dorsal root ganglion cells maintained in primary culture. *J Anat*. 1986; 145:1–12.
24. Svenningsen A, Colman DR, Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors. *Fex Neuron Glia Biol*. 2004; 1 (1): 85–93.
25. Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009; 33 (6): 784–92.
26. 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; 14 (2): 339–45.

