



<https://doi.org/10.15407/cryo35.01.003>

УДК 57.086.13:611.018.82.013:611.89:57.085.23

**Г.А. Божок^{1,*}, В.Д. Устиченко¹, О.С. Сидоренко¹, Ю.О. Божкова¹,
Н.М. Алабедацькарім¹, О.В. Пахомов¹, Д.Б. Введенський²,
А.В. Шатілло³, Т.П. Бондаренко^{1,2}, Є.І. Легач¹**

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

² Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

³ ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України»

* bozhokgaru@gmail.com

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ

*Клітини-похідні нервового гребеня утворюються з нейроектодерми на ранніх стадіях ембріогенезу. Внаслідок епітеліо-мезенхімального переходу вони мігрують до периферичних структур та диференціюються у нейрони і глію периферичної нервової системи, меланоцити шкіри, клітини зубної пульпи, нейроендокринні клітини, хрящі та кістки черепа, а також у кілька інших фенотипів. Похідні нервового гребеня мають великий потенціал у регенеративній медицині. Кріоконсервування широко застосовується для довгострокового зберігання біологічного матеріалу, який в подальшому може бути використаний у клінічній практиці. У представленому огляді проаналізовано підходи до кріоконсервування клітин-похідних нервового гребеня, отриманих із різних джерел. Дослідження *in vitro* та *in vivo* демонструють успішність розроблених протоколів кріоконсервування різних клітин-похідних нервового гребеня, що дає можливість створення кріобанків та їх поширеного використання у клінічній практиці.*

Ключові слова: кріоконсервування, нервовий гребінь, 2D-культивування, 3D-культивування, клітини спінальних гангліїв, клітини пульпи зубів, меланоцити, шваннівські клітини.

Нервовий гребінь (НГ) — це транзиторна структура, яка утворюється з нейроектодерми на ранніх стадіях ембріогенезу. Внаслідок епітеліо-мезенхімального переходу клітини-похідні нервового гребеня (КПНГ) мігрують до периферичних структур і диференціюються у такі типи клітин, як нейрони та глія периферичної нервової системи, меланоцити, клітини зубної пульпи, нейроендокринні клітини, хрящі і кістки черепа, а також в кілька інших фенотипів [40, 46, 68].

На теперішній час встановлено, що міграція клітин НГ відбувається хвилеподібно [2, 37, 40]. Відомо, що існує певна кореляція між вихідною локалізацією і періодами міграції КПНГ та їх потенціалом до диференціації [2,

17]. Клітини-похідні НГ утворюються по всій довжині нервової трубки: від проміжного мозку до сакральних відділів нижче рівня соміта 28. Клітини НГ, мігруючи з різних відділів нервової трубки, беруть участь в утворенні різних структур і тому в НГ розрізняють кілька відділів. D. Raible зі співавт. [61, 62] та J.H. Dawes зі співавт. встановили [17], що ранні міграторні субпопуляції клітини диференціюються переважно в сенсорні та симпатичні ганглії, шваннівські клітини та пігментні клітини. З наступного міграторного пулу клітин утворюються гліальні та пігментні клітини. Клітини пізніх стадій міграції диференціюються переважно в меланоцити [17].

Цитування: Божок ГА, Устиченко ВД, Сидоренко ОС, Божкова ЮО, Алабедацькарім НМ, Пахомов ОВ, Введенський ДБ, Шатілло АВ, Бондаренко ТП, Легач ЄІ. Кріоконсервування клітин-похідних нервового гребеня. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(1): 03–13. <https://doi.org/10.15407/cryo35.01.003>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2024. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

У ході міграції до «пункту призначення» відбуваються поступова детермінація та спеціалізація КПНГ. Клітини краніального НГ мігрують в жаберні дуги і обличчя, утворюючи кістки і хрящі обличчя та шиї, пігментні клітини та черепні нерви [25]. Вагальний (на рівні сомів 1–7) і крижовий (нижче соміту 28) відділи НГ утворюють парасимпатичні нерви кишечника. Клітини серцевого відділу НГ мігрують на рівні сомів 1–3 та беруть участь в утворенні перегородок між аортою і легневим стовбуром, а також між правим і лівим шлуночком серця. Клітини-похідні НГ на рівні сомів 6–24 утворюють симпатичні нейрони та мозкову речовину наднирника (соміти 18–24).

Мультипотентні стовбурові клітини НГ (Neural crest stem cells, NCSC) присутні не тільки в НГ ембріонів, але також у різних тканинах плода і навіть у дорослому організмі [41, 45, 49]. У волосяному фолікулі дорослих ссавців було ідентифіковано NCSC [8, 45, 66]. Існують дані, що постнатальні стовбурові клітини НГ мають невисоку швидкість проліферації [8, 74] та диференціюються в більш вузький діапазон підтипів нейронів [38, 48]. Проте потенційно вони можуть бути доступним джерелом стовбурових клітин, які можна використовувати в регенеративній медицині [10, 68, 72].

Кріоконсервування широко застосовується для довгострокового зберігання біологічного матеріалу, в тому числі для подальшого його використання в клінічній практиці [47]. Розроблено різні протоколи кріоконсервування, які в основному відрізняються швидкістю заморожування-відігрівання, використаними кріопротекторами, способами насичення кріозахисним середовищем, щільністю клітин у зразку, способом видалення кріопротектора. Варіювання даними параметрами дозволяє створити протокол кріоконсервування, релевантний для певного типу клітин. Оскільки КПНГ є гетерогенною популяцією клітин, яким притаманна висока пластичність, то для розробки оптимального режиму кріоконсервування важливо розуміти зміни їх кріочутливості в процесі диференціювання.

З урахуванням вищенаведеного у огляді розглядається питання, чи залежить кріостійкість КПНГ від їх походження з певних

відділів нервової трубки (краніального, вагального, тулубного та крижового).

Кріоконсервування клітин спінальних гангліїв (міграція з тулубового та крижового відділів нервової трубки)

Спінальні ганглії анатомічно складаються з декількох типів клітин. Вони містять тіла чутливих немієлізованих та мієлізованих нейронів, які передають сенсорну інформацію з периферії в ЦНС [63]. Мантийні гліоцити у складі спінальних гангліїв є спеціалізованими клітинами, що оточують тіла нейронів та забезпечують їх регуляторно-метаболическу підтримку. Також у складі спінальних гангліїв присутні сполучнотканинні клітини ендоневрія та шваннівські клітини, що беруть участь у створенні мієлінової оболонки аксонів.

Неодноразово було встановлено цитотоксичний вплив ДМСО на різні клітини, в тому числі на клітини нейрального походження [13, 30, 60, 75, 77]. Навіть у невеликих концентраціях ДМСО може чинити пошкоджуючу дію. Наприклад, 12-годинна інкубація *in vitro* нейронів неонатальних щурів з ДМСО в концентрації 1 % та вище викликав різке зниження життєздатності нейронів, помітне порушення їх морфологічної будови та зниження експресії маркера NeuN [77]. J.L. Hanslick та співавт. [30] показали, що низька концентрація ДМСО (0,5 і 1 %) призводила до загибелі близько 50 % нейронів гіпокампа щурів. У астроцитах ДМСО в концентрації 1 % після 24-годинної інкубації викликав набухання мітохондрій, порушення мембранного потенціалу, зниження рівнів цитохромів та експресії гліального глутаматного транспортера (GLT-1), а у концентрації 5 % призводив до апоптозу [75]. Також було встановлено, що ДМСО може впливати на метилювання ДНК та модифікацію гістонів шляхом регулювання експресії ферментів епігенетичної модифікації [13].

Результати визначення оптимальної швидкості охолодження для сенсорних нейронів показали, що клітинна збереженість має певну залежність від плинності мембрани і розміру клітин [42]. Встановлено, що під час диференціації сенсорних нейронів відбувається коливання плинності їх мембрани. Саме у той проміжок часу, який характеризується максимальною плинністю мембрани, спостері-

гаються мінімальне утворення внутрішньоклітинного льоду за швидкості охолодження 1 °C / хв та збереження після деконсервування 88 % клітин, здатних до адгезії. За даними K. Yamatoya та співавт. [73] ефективність збереження високодиференційованих нейральних клітин після заморожування була набагато менше, ніж малодиференційованих.

Окрім плинності мембрани, розмір клітини вважається ще одним фактором, що впливає на чутливість клітин, у тому числі й КПНГ, до заморожування. Загальноприйнято, що кріопшкодження безпосередньо пов'язане зі змінами агрегатного стану та фазовими переходами у клітині та позаклітинному оточенні. Досягнення температури нижче нуля спочатку призводить до кристалізації позаклітинної води, після чого настає внутрішньоклітинна кристалізація [23]. Утворення внутрішньоклітинного льоду є однією з головних причин загибелі клітин. Показано, що за однакових досліджуваних умов об'єм клітини, який пов'язаний з внутрішньоклітинною кількістю води, відіграє важливу роль у частоті виникнення внутрішньоклітинної кристалізації [59]. При цьому клітини з більшим діаметром мають підвищену ймовірність утворення внутрішньоклітинного льоду, ніж клітини з меншим діаметром [59]. Це твердження узгоджується з даними R. Li та співавт. [42] щодо коливання діаметра сенсорних нейронів під час їх диференціювання. При цьому, висока кріостійкість спостерігалася у незрілих клітин, які мали найменший розмір серед усіх досліджених.

Встановлено, що після кріоконсервування нейронів спінального ганглія собаки зі швидкістю охолодження 1 °C / хв під захистом 10 % ДМСО і 31 % фетальної телячої сироватки (ФТС) суттєво знижувались життєздатність та їх загальна кількість [64]. Крім цього спостерігалось зменшення соми нейронів та пригнічення здатності до формування відростків *in vitro*.

Кріоконсервування зі швидкістю 0,5–1 °C / хв у присутності 5, 7,5 і 10 % ДМСО та 25 % ФТС зберігало адгезивну здатність клітин спінального ганглія новонароджених поросят, однак призводило до зменшення проліферативної активності під час культивування [4]. Оптимальна концентрація ДМСО, за якої зберігалася життєздатність клітин на рівні 87 % та

їх висока проліферативна активність (85 % відносної площі моношару від інтактного контролю), становила 7,5 %. За цих умов кількість мантійних гліоцитів у культурі складала близько 95 % після розморожування.

Показано, що інкапсуляція у колагеновий гідрогель впливає на результат кріоконсервування спінальних гангліїв курячого ембріона [16]. Кріоконсервування необроблених зразків у присутності 10 % ДМСО і 30 % ФТС при –80 °C з подальшим зануренням у рідкий азот призводило до зниження показника життєздатності клітин у складі ганглія в середньому до 46 %. Однак, якщо спінальні ганглії культивували на поверхні, вкритій колагеновим гідрогелем, життєздатність їх клітин після заморожування складала близько 84 %, ганглії зберігали інтактні морфологічні характеристики, мали високу експресію біомаркерів шваннівських клітин та менший відсоток апоптозу.

Кріоконсервування периферичного нерва та шваннівських клітин

Повільне заморожування як оптимальний підхід до довготривалого зберігання периферичних нервів було запропоновано в кількох наукових роботах [21, 33, 76, 78, 80]. Аналіз джерел вказує на те, що для уникнення утворення внутрішньоклітинного льоду швидкість охолодження, за якої фрагменти нервів зберігають нормальну структуру та достатній вміст шваннівських клітин, має бути у межах 1–4 °C / хв. Крім того, збереженості шваннівських клітин сприяє швидке розморожування кріоконсервованого нерва [80].

Для кріоконсервування нервів у якості кріопротекторного агента частіше всього використовуються ДМСО та гліцерин [33, 70, 76, 78, 80]. A. Zalewski та співавт. [76] порівнювали вплив гліцерину, ДМСО та суміші ДМСО з формамідом у співвідношенні 2:1. Найкраща виживаність деконсервованих нервів після алотрансплантації була продемонстрована за умов використання 20 %-ї суміші ДМСО/формамід (час насичення 20 хв, швидкість охолодження 1–1,5 °C / хв). Алотранспланти мали добре збережені гістологічні елементи, в тому числі мієлінові та безмієлінові аксони, шваннівські клітини, ендоневрій, периневрій, кровоносні судини.

S.A. González Porto та співавт. [28] кріоконсервували фрагменти периферичного нерва

щурів у середовищі 199 з 10 % ДМСО соло або з 4 % альбуміну людини (в останньому випадку в процесі розморожування проводили послідовні промивання фізіологічним розчином з додаванням 20 % альбуміну людини). Швидкість охолодження була однаковою для обох груп та складала 1 °С/хв до температури -40°С, потім 5 °С/хв до -140°С. Гістологічне дослідження нерва після кріоконсервування продемонструвало належне збереження його структури в обох групах. Проте показник життєздатності шваннівських клітин у фрагментах нервів був значно вищим за умов додавання альбуміну.

Метод кріоконсервування первинної культури шваннівських клітин, отриманої з периферичного нерва людини, описано у роботах N. Andersen та співавт. [5, 6]. Автори використовували кріозахисне середовище, що складалося з 90 % ФТС та 10 % ДМСО [5] або комерційне середовище для кріоконсервування «Recovery™ Cell Culture Freezing Medium» (Thermo-Fisher, США) [6] та контейнер для заморожування «Mr. Frosty™ Freezing Container», Thermo-Fisher) який забезпечує швидкість заморожування 1°С/хв у морозильній камері при -80°С. Показник життєздатності шваннівських клітин після розморожування складав більше 90 %. Т.Е. Trumble та співавт. [70] також встановили, що 10 % ДМСО є оптимальною концентрацією для кріоконсервування первинної культури шваннівських клітин.

Первинна культура шваннівських клітин може бути отримана не тільки з свіжого, але й з кріоконсервованого нерва. У роботі Р.В. Mason та співавт. [44] фрагменти периферичного нерва поміщали у кріозахисне середовище з 25 % ДМСО та 50 % ФТС у морозильник з температурою -80°С на 24 години, а потім зберігали в рідкому азоті до моменту використання. Шваннівські клітини, отримані з кріоконсервованого нерва, за фенотиповими ознакам та відповіддю на специфічні мітогени були подібні до свіжовиділених клітин.

Кріоконсервування клітин-похідних нервового гребеня шкіри (міграція з краніального, вагального, тулубного та крижового відділів нервової трубки)

Мультипотентні КПНГ зі шкіри ссавців мають потенціал диференціювання у нейрони, глію, гладком'язові клітини та адипоцити [69] і

експресують маркери НГ Slug, Snail, Twist, Pax3 і Sox9 [22]. Вважається, що дермальна папіла є ендogenous нішею для КПНГ у шкірі обличчя [19]. Похідними нервового гребеня є також меланоцити шкіри [14].

На теперішній час КПНГ, отримані з волосяних фолікулів, визнаються перспективним та доступним джерелом мультипотентних стовбурових клітин [24].

Кріоконсервування клітин дорослого волосяного фолікула людини у кріозахисному середовищі на основі 90 % ФТС та 10 % ДМСО дозволило отримати 82,2 % життєздатних клітин, які демонстрували збереження як нейронального, так і гліального потенціалу диференціювання [24]. У роботі W. Сао та співавт. [12] було порівняно кріозахисні середовища з 10 % гліцерину або ДМСО для кріоконсервування цілих фолікулів вібрис миші. Порівняно з гліцирином у середовищі на основі ДМСО краще зберігалися популяції стовбурових клітин та відбувалося функціональне відновлення росту клітин фолікулів після підшкірної трансплантації.

S. Kajiura та співавт. [35, 36] було розроблено оптимальний протокол кріоконсервування цілого волосяного фолікула миші та продемонстровано перевагу повільного заморожування порівняно з вітрифікацією. Кріоконсервування волосяних фолікулів у комерційному кріозахисному середовищі «ТС-Protector medium» (DS Pharma Biomedical Co., Японія) зі швидкістю охолодження, яка забезпечується витримкою кріопробірки у морозильній камері -80 °С упродовж доби, дозволило отримати після розморожування близько 90 % фолікулів, з яких відбувалася міграція клітин. Клітини з деконсервованих фолікулів зберігали здатність до проліферації та експресували маркери стовбурових клітин нестін, Sox2, SSEA-1.

Ізольовані клітини з дермальної папіли волосяного фолікула (вібриси) новонародженого кролика було кріоконсервовано O. Novikova та співавт. [50]. Кріоконсервування клітин зі швидкістю охолодження 1 °С / хв до -80 °С та подальшим зануренням в рідкий азот у кріозахисному середовищі на основі DMEM із додаванням 5 % бичачого сироваткового альбуміну та ДМСО у концентраціях 5–10 % дозволяло зберігати життєздатність клітин

безпосередньо після розморожування на рівні 90–93 %. Однак клітини виявились досить чутливими до токсичного впливу ДМСО у концентрації 10 %, що проявлялося у збільшеній кількості патологій клітинного мітозу, зниженні індексу мітозу на першому пасажі або повному припиненні проліферації клітин на другому пасажі [52].

Встановлено високу чутливість меланоцитів до пошкоджуючих факторів кріоконсервування [1, 15]. У роботі С.С. Compton та співавт. [15] описано, що збереженість після кріоконсервування у присутності 10 % гліцерину первинної культури меланоцитів, отриманої зі шкіри людини, знизилась на 77 %. Далі за умов багаторазового субкультивування, яке чергувалось із заморожуванням, меланоцити взагалі не зберігалися.

Збереження морфофункціональних властивостей епідермальних меланоцитів людини та їх проліферації *in vitro* після заморожування було встановлено Х. Саї та співавт. [11]. За цих обставин заморожування відбувалося у присутності електростатичного поля високої напруги (high-voltage electrostatic field, HVEF). Зразки охолоджували зі швидкістю близько 0,3–0,7 °C / хв у середовищі, що складалося з DMEM, ФТС та ДМСО у співвідношенні 6:3:1. У випадку, коли використовували напруженість електричного поля 15 кВ/м, життєздатність клітин була найвищою (близько 88 %) порівняно з HVEF необробленим контролем та групами з напруженістю електричного поля 10 або 20 кВ/м. У необробленому контролі після деконсервування клітини мали змінену морфологічну структуру та слабку адгезію до субстрату.

Клітини пульпи зубів (міграція з краніально-го відділу нервової трубки)

Стовбурові клітини, отримані з пульпи третіх молярів, було кріоконсервовано у кріозахисних середовищах на основі 0,5; 1,0 та 1,5 М етиленгліколю, пропіленгліколю або ДМСО зі швидкістю охолодження 1°C/хв до –85°C з подальшим зануренням у рідкий азот [71]. Показник життєздатності клітин, заморожених з 1,0 та 1,5 М ДМСО, який був значно вище, ніж з іншими використаними кріопротекторами у відповідних концентраціях, складав відповідно (90,6 ± 8,9) і (91,0 ± 8,1) %.

В.С. Perry та співавт. [55] заморожували стовбурові клітини пульпи зубів у вигляді суспензії клітин та у складі цілого зуба. Зразки заморожували в присутності 10 % ДМСО зі швидкістю охолодження 1 °C / хв до –85°C та подальшим зануренням у рідкий азот. Відмінність між заморожуванням цих зразків полягала в тому, що кріопротектор до суспензії клітин додавали крапельним шляхом, а у випадку заморожування цілого зуба насичення розчином ДМСО здійснювали за 4 °C протягом години. Показник життєздатності клітин після відігрівання складав 89,5 %. Автори не виявили жодних відмінностей між зразками у їх здатності до диференціювання у остео- та адипогенному напрямках. На відміну від цього у роботі Е.І. Woods та співавт. [71] було встановлено знижене відновлення клітин за отримання їх з третіх молярів, які було кріоконсервовано з 10 % ДМСО (час інкубації у кріозахисному середовищі 2 години за 4 °C). З розморожених зубів ізолювали клітин, однак після 28 діб культивування лише у 20 % випадків було отримано клітини, які прикріплялися та активно проліферували у культурі.

М. Zhurova та співавт. [81] було зроблено припущення, що наявність міжклітинних з'єднань у культурі клітин може сприяти кращій збереженості стовбурових клітин пульпи третіх молярів людини. Експерименти, проведені за допомогою кріомікроскопії, виявили, що заморожування у вигляді суспензії призводило до загибелі близько 86 % клітин, тоді як у вигляді моношару — близько 25,5%. За цих умов клітини мали здатність до експресії білка щільних з'єднань Connexin-43 та зберігали цілісність мембрани, але втрачали здатність до проліферації.

У роботі S.Y. Lee та співавт. [39] було запропоновано підхід до зниження концентрації ДМСО у складі кріозахисного середовища для зберігання стовбурових клітин пульпи зуба. Кріоконсервування за допомогою програмного заморожувача (швидкість охолодження 0,5 °C / хв), з'єднаного з магнітним полем (0,01 мТл), дозволило підвищити рівень життєздатності клітин. Цей показник для клітин, заморожених у присутності 3 % ДМСО та магнітного поля, складала 73 %, тоді як без магнітного впливу — 56 %.

N. Huynh та співавт. [34] показали, що швидкість охолодження має більш значний вплив на збереженість стовбурових клітин пульпи зубів, ніж концентрація кріопротектора. Життєздатність клітин, заморожених із контрольованою швидкістю охолодження 1 °С / хв з 5 та 10 % ДМСО, була майже однаковою (79,7 і 79,0 %, відповідно). Порівняно з цим, за умов швидкого охолодження (занурення у рідкий азот) життєздатність клітин складала 10,8 і 32,1 % відповідно.

N. Pilbauerova та співавт. [56] використовували неконтрольоване заморожування для кріоконсервування стовбурових клітин першого пасажу, отриманих із пульпи зуба людини. За цих умов кріопробірки з клітинними зразками витримували за температури -20 °С протягом 1–1,5 години, потім їх перенесли до морозильної камери з температурою -80 °С та зберігали 6 або 12 місяців. Кріозахисне середовище складалося з повного живильного середовища з додаванням 10 % ДМСО. Після розморожування клітини зберігали характеристики, притаманні інтактним стовбуровим клітинам: фібробластоподібну морфологічну структуру, проліферативну активність, експресію 21 фенотипового маркера. Збереженість клітин, оцінена за трипановим синім, складала від 88 до 91 % в залежності від терміну низькотемпературного зберігання 6 або 12 місяців відповідно.

Ентеральні нервові клітини (міграція з вазального відділу нервової трубки)

У дослідженні S. Neumüller-Klug та співавт. [31] було апробовано декілька режимів кріоконсервування клітин ентеральної нервової системи неонатальних щурів. Показано, що за умов використання швидкості охолодження 1 °С / хв та безсироваткового середовища з 10 % ДМСО зберігалася близько 60 % клітин. Додавання ФТС у концентрації 20 та 90 % до кріозахисного середовища не підвищувало збереженість клітин (45 та 48,5 % відповідно). Клітини взагалі не зберігалися у випадку вітрифікації у комерційному безсироватковому середовищі «StemCell Keep™» (BioVerde, Японія).

Хромафінні клітини (міграція з тулубового відділу нервової трубки)

Кріоконсервування фетальних хромафінних клітини у вигляді агрегатів у присутності 10 %

ДМСО і 10 % сироватки (швидкість охолодження 1 °С / хв) дозволяло зберегти основні фенотипові маркери (наприклад, експресію тирозингідроксилази) [67]. Також розморожені клітини були здатні до формування нейритів у відповідь на введення в середовище культивування фактору росту нервів (nerve growth factor, NGF).

Встановлено, що низькі швидкості охолодження (0,3–1 °С / хв) сприяють збереженню клітин, отриманих із надниркових залоз новонароджених поросят [9, 53, 65]. Для отримання первинної культури клітин надниркових залоз було перевірено два способи. Перший спосіб полягав в отриманні з наднирників суспензії клітин та її кріоконсервуванні з використанням кріозахисного середовища на основі 10 % ДМСО з додаванням ФТС (швидкість охолодження 1 °С / хв). Це дозволило отримати близько 80 % життєздатних клітин, які у подальшому поміщали в умови культивування [65]. За другим способом проводили кріоконсервування фрагментів надниркових залоз у середовищі з 10 % ДМСО за різними швидкостями охолодження (0,3; 1; 5; 40 та >100 °С / хв), а після розмороження отримували клітини для подальшого культивування [9]. Найвищі показники життєздатності (біля 90 %) та виходу клітин було одержано після використання швидкостей охолодження 0,3–1 °С / хв. За цих умов морфологічні особливості деконсервованих клітин, їх здатність до адгезії та експресія фенотипових маркерів хромограніну А та βІІІ-тубуліну значуще не відрізнялися від інтактних клітин [9, 53].

Кріоконсервування 3D-культур клітин-похідних нервового гребеня

На теперішній час відомо, що 3D-культури (сфероїди, нейросфери) мають ряд переваг над моношаровими культурами, оскільки завдяки тривимірній організації клітини зберігають властивості, притаманні органу, з якого вони отримані. У таких умовах клітини експресують гени та мають морфологічну будову, близьку до природної; виявляють властивості більш ранніх прогеніторів; мають фізіологічні характеристики реалізації основних клітинних функцій (метаболізму, клітинного циклу, клітинної адгезії, проліферації, диференціювання, міграції, апоптозу тощо).

3D-культри КПНГ більш природно відтворюють цитологічне мікрооточення клітин нервової системи, їх механічні та біохімічні особливості, міжклітинні нейро-гліальні зв'язки та передачу сигналів, тобто є більш реалістичними моделями в порівнянні з моношаром [20, 54]. Нейросфери складаються з клітин на різних стадіях диференціювання (стовбурові клітини, проліферуючі нейрони-попередники, постмітотичні нейрони та глія), про що свідчить наявність маркерів стовбурових та прогеніторних клітини (нестин, віментин), нейронів (бета-III-тубулін), гліальних клітин (кислий гліальний фібрилярний білок, GFAP), олігодендроцитів (olig2) [7, 26, 29, 58].

Стандартним протоколом кріоконсервування нейросфер є охолодження зі швидкістю 1 °C / хв [18, 43, 79] у кріозахисному середовищі на основі ДМСО [27, 32, 43, 79]. У роботі S. Neumüller-Klug та співавт. [31] було порівняно результати заморожування нейросфер, отриманих із ентеральної нервової системи, в залежності від складу кріозахисного середовища. Встановлено, що кріоконсервування зі швидкістю охолодження 1 °C / хв у кріозахисному середовищі з 10 % ДМСО в присутності 20 і 90 % ФТС дозволяє зберегти 39,7 і 40,3 % нейросфер відповідно. Встановлено, що клітини зберігали властивості до збудження у відповідь на специфічну стимуляцію. Середовище з 10 % ДМСО без сироватки було менш ефективним і забезпечувало збереження лише 27,3 % нейросфер. Кріоконсервування у безсироватковому середовищі «StemCell Keer™» шляхом вітрифікації зменшувало кількість збережених нейросфер приблизно до 10 %.

Кріоконсервування з використанням ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10 % та режиму охолодження зі швидкістю 0,5 °C / хв до -20 °C на етапі I та швидкістю 1 °C / хв до -80 °C на етапі II з подальшим зануренням у рідкий азот дозволили зберегти основні властивості сфероїдів, отриманих із первинної культури клітин спінальних гангліїв (здатність сфероїдів до адгезії; морфологічний склад клітин у складі сфероїдів та їх здатність до міграції) [3], хоча відбувалося зниження цих показників.

Е.М. Plaksina та співавт. [57] оцінили режими кріоконсервування сфероїдів, отримані

з клітин наднирників неонатальних свиней. У режимах використовували швидкість охолодження 1 °C / хв та кріозахисні середовища на основі 5, 7 та 10 % ДМСО з додаванням 25 % ФТС. Такі характеристики кріоконсервованих сфероїдів, як здатність до адгезії, міграції клітин та утворення моношару, найкраще зберігалися у випадку використання 10 % ДМСО. За цих умов додавання ФТС до кріозахисного середовища не мало істотного впливу на результат кріоконсервування.

Сфероїди, отримані з дермальної папіли, було кріоконсервовано у роботі О.У. Novikova та співавт. [51] з використанням швидкості охолодження 1 °C / хв, середовища з 5 або 10 % ДМСО та 5 % ФТС. Після консервування за обох концентрацій кріопротектора сфероїди зберігали морфологічну цілісність, однак мали менший діаметр, що було обумовлено частковою загибелю клітин після розморожування.

Отже, вищезазначені роботи демонструють, що КПНГ можуть бути успішно кріоконсервовані у складі сфероїдів, якщо використовуються низькі швидкості охолодження (0,5–1 °C / хв) та кріопротектор ДМСО у концентраціях 5–10 %.

ВИСНОВКИ

Мультипотентність та значний регенераторний потенціал стовбурових/прогеніторних КПНГ обумовили підвищений інтерес спеціалістів у їх клінічному використанні, особливо у галузі персоналізованої регенеративної медицини. З огляду на цей факт актуальною є розробка режимів кріоконсервування як важливого етапу процесингу клітин поряд з їх отриманням та культивуванням. Однак на сучасному етапі існує замало робіт, присвячених кріоконсервуванню КПНГ.

У представленому огляді було зроблено спробу систематизувати дані, отримані під час кріоконсервування КПНГ. Зрозуміло, що еволюційно запрограмоване різноманіття цих клітин та гетерогенність їх стовбурових / прогеніторних субпопуляцій, які зберігаються у дорослому організмі, ускладнюють цю задачу. Похідні НГ досить сильно морфологічно відрізняються в залежності від кінцевої диференціації, отже, вихідною ознакою

для систематизації нами було обрано відмінності КПНГ за їх локалізацією та міграцією вздовж рострокаудальної осі. Аналіз результатів дозволяє зробити висновок, що кріочутливість КПНГ у більшій мірі залежить від ступеня їх диференціювання, ніж від походження з певного відділу НГ. У більшості випадків КПНГ успішно було кріоконсервовано за допомогою низьких швидкостей охолодження (0,5–1 °C / хв) та кріозахисних середовищ із ДМСО у концентраціях від 5 до 10 %.

Насамкінець можна відзначити, що дослідження *in vitro* та *in vivo* демонструють успішність розроблених протоколів кріокон-

сервування різних клітин-похідних нервового гребеня, що дає можливість створення кріобанків та поширити їх використання у клінічній практиці. Незважаючи на те, що терапія за допомогою КПНГ має великі перспективи, необхідно враховувати безпеку та потенційні ризики, пов'язані з цим підходом. Перш ніж ці клітини зможуть бути головним або допоміжним терапевтичним засобом, потрібні комплексні дослідження їх властивостей (туморогенність, імуногенність, здатність до дедиференціювання тощо) та впливу кріоконсервування на ці та інші клітинні характеристики.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abe S, Fujita T, Takami Y. Disappearance of Langerhans cells and melanocytes after cryopreservation of skin. *Br J Plast Surg*. 1995; 48(6): 405–9.
2. Alhashem Z, Camargo-Sosa K, Kelsh RN, Linker C. Trunk neural crest migratory position and asymmetric division predict terminal differentiation. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 Jun 8 [cited 2025 Jan 30]; 10: 887393. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.887393/full>
3. Ali S, Bozhok G. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from primary culture of newborn piglet spinal ganglion cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29(4): 354–64.
4. Ali S, Moiseieva N, Bozhok G. Cryopreservation of cell culture derived from dorsal root ganglia of neonatal pigs. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020; 30(2): 158–68.
5. Andersen ND, Monje PV. Isolation, culture, and cryopreservation of adult rodent Schwann cells derived from immediately dissociated teased fibers. *Methods Mol Biol*. 2018; 1739: 49–66.
6. Andersen ND, Srinivas S, Piñero G, Monje PV. A rapid and versatile method for the isolation, purification and cryogenic storage of Schwann cells from adult rodent nerves. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2025 Jan 30]; 6: 31781. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep31781>
7. Bez A, Corsini E, Curti D, *et al.* Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res*. 2003; 993(1-2): 18–29.
8. Boroujeni S, Koontz A, Tseropoulos G, *et al.* Neural crest stem cells from human epidermis of aged donors maintain their multipotency *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Jul 5 [cited 2025 Jan 30]; 9(1): 9750. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-46140-9>
9. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, *et al.* Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. *Cryobiology*. 2016; 73(2): 152–61.
10. Burns AJ, Goldstein AM, Newgreen DF, *et al.* White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. *Dev Biol*. 2016; 417(2): 229–51.
11. Cai X, Li P, Chen B, *et al.* Effect of high-voltage electrostatic field on cryopreservation of human epidermal melanocytes. *E3S Web of Conferences* [Internet]. 2021 Jan 27 [cited 2025 Jan 30]; 233, 02039. Available from: https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/pdf/2021/09/e3sconf_iaecst20_02039.pdf
12. Cao W, Li L, Tran B, *et al.* Extensive hair shaft growth after mouse whisker follicle isolation, cryopreservation and transplantation in nude mice. *PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 30 [cited 2025 Jan 30]; 10(12): e0145997. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0145997>
13. Cheng H, Han Y, Zhang J, *et al.* Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on DNA methylation and histone modification in parthenogenetically activated porcine embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2022; 34(8): 598–607.
14. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A. Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. *Open Life Sciences*. 2013; 8(4): 315–30.
15. Compton CC, Warland G, Kratz G. Melanocytes in cultured epithelial grafts are depleted with serial subcultivation and cryopreservation: implications for clinical outcome. *J Burn Care Rehabil*. 1998; 19(4): 330–6.
16. Cui ZK, Li SY, Liao K, *et al.* Characteristics of neural growth and cryopreservation of the dorsal root ganglion using three-dimensional collagen hydrogel culture versus conventional culture. *Neural Regen Res*. 2021; 16(9): 1856–64.

17. Dawes JHP, Kelsh RN. Cell fate decisions in the neural crest, from pigment cell to neural development. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 16 [cited 2025 Jan 30]; 22(24): 13531. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/24/13531>
18. Deshpande K, Saatian B, Martirosian V, et al. Isolation of neural stem cells from whole brain tissues of adult mice. *Curr Protoc Stem Cell Biol* [Internet]. 2019 Feb 5 [cited 2025 Jan 30]; 49(1): e80. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpsc.80>
19. Driskell RR, Clavel C, Rendl M, et al. Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *J Cell Sci*. 2011; 124(8): 1179–82.
20. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol*. 2014; 12: 207–18.
21. Fansa H, Lassner F, Kook PH, et al. Cryopreservation of peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve*. 2000; 23(8): 1227–33.
22. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(11): 1082–93.
23. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 2004; 25: 375–88. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/contentone/cryo/cryo/2004/00000025/00000006/art00001?crawler=true>
24. Gho CG, Schomann T, de Groot SC, et al. Isolation, expansion and neural differentiation of stem cells from human plucked hair: a further step towards autologous nerve recovery. *Cytotechnology*. 2016; 68(5): 1849–58.
25. Gilbert SF. *Developmental biology*. 6th edition, Sunderland, USA: Sinauer Associates; 2000, 709 p. ISBN-13 978-0878932436
26. Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, et al. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec*. 2013; 296: 1435–52.
27. Giraldo E, Bonilla P, Mellado M, et al. Transplantation of human-fetal-spinal-cord-derived NPCs primed with a polyglutamate-conjugated Rho/ROCK inhibitor in acute spinal cord injury. *Cells* [Internet]. 2022 Oct 20 [cited 2025 Jan 30]; 11(20): 3304. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/20/3304>
28. González Porto SA, Domenech N, González Rodríguez A, et al. The addition of albumin improves Schwann cells viability in nerve cryopreservation. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(4): 507–17.
29. Gurok U, Steinhof C, Lipkowitz B, et al. Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation. *J Neurosci*. 2004; 24: 5982–6006.
30. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis*. 2009; 34: 1–10.
31. Heumüller-Klug S, Maurer K, Tapia-Laliena MÁ, et al. Impact of cryopreservation on viability, gene expression and function of enteric nervous system derived neurospheres. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2023 Jun 12 [cited 2025 Jan 30]; 11: 1196472. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10291272/pdf/fcell-11-1196472.pdf>
32. Hiramatsu S, Morizane A, Kikuchi T, et al. Cryopreservation of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurospheres for clinical application. *J Parkinsons Dis*. 2022; 12(3): 871–84.
33. Hirasé Y, Kojima T, Uchida M, et al. Cryopreserved allogeneic vessel and nerve grafts: hindlimb replantation model in the rat. *J Reconstr Microsurg*. 1992; 8(6): 437–43, discussion 445–6.
34. Huynh N, Le SH, Doan VN, et al. Simplified conditions for storing and cryopreservation of dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2013; 84: 74–81.
35. Kajiura S, Mii S, Aki R, et al. Cryopreservation of the hair follicle maintains pluripotency of nestin-expressing hair follicle-associated pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21(8): 825–31.
36. Kajiura S, Mii S, Aki R, et al. Protocols for cryopreservation of intact hair follicle that maintain pluripotency of nestin-expressing hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells. *Methods Mol Biol*. 2016; 1453: 173–8.
37. Krispin S, Nitzan E, Kalcheim C. The dorsal neural tube: a dynamic setting for cell fate decisions. *Dev Neurobiol*. 2010; 70(12): 796–812.
38. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, et al. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002; 35: 657–69.
39. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2012; 196(1): 23–33.
40. Leonard CE, Taneyhill LA. The road best traveled: neural crest migration upon the extracellular matrix. *Semin Cell Dev Biol*. 2020; 100: 177–85.
41. 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.
42. Li R, Walsh P, Truong V, et al. Differentiation of human iPSCs into sensory neurons exhibits developmental stage-specific cryopreservation challenges. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Dec 14 [cited 2025 Jan 30]; 9: 796960. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.796960/full>
43. Ma XH, Shi Y, Hou Y, et al. Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. *Cryobiology*. 2010; 60: 184–91.

44. Mason PW, Attema BL, DeVries GH. Isolation and characterization of neonatal Schwann cells from cryopreserved rat sciatic nerves. *J Neurosci Res.* 1992; 31(4): 731–44.
45. Mehrotra P, Tseropoulos G, Bronner ME, Andreadis ST. Adult tissue-derived neural crest-like stem cells: Sources, regulatory networks, and translational potential. *Stem Cells Transl Med.* 2020; 9(3): 328–41.
46. Méndez-Maldonado K, Vega-López GA, Aybar MJ, Velasco I. Neurogenesis from neural crest cells: molecular mechanisms in the formation of cranial nerves and ganglia. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Aug 7 [cited 2025 Jan 30]; 7(8): 635. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2020.00635/full>
47. Meneghel J, Kilbride P, Morris GJ. Cryopreservation as a key element in the successful delivery of cell-based therapies—a review. *Front Med.* 2020 [cited 2025 Jan 30]; 7: 592242. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2020.592242/pdf>
48. Motohashi T, Aoki H, Chiba K, *et al.* Multipotent cell fate of neural crest-like cells derived from embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25(2): 402–10.
49. 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.
50. Novikova OY, Bondarenko TP. Characteristics of native and cryopreserved culture of dermal papilla of newborn rabbits vibrissa. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*, 2019, (3), 54–7.
51. Novikova OY, Bondarenko TP, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from rabbit dermal papilla cells. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019; 29(2), 177.
52. Novikova OY, Bozhok GA, Bondarenko TP. Effect of incubation with dimethyl sulfoxide on the mitotic cycle of cell culture of rabbit dermal papilla. *RABM* [Internet]. 2019 Oct 5 [cited 2025 Jan 30]; 5: Pgs.6. Available from: <https://www.hataso.com/journals%2Frabm%2Farticles%2F528>
53. Novikova OY, Sidorenko OS, Bozhok GA, Bondarenko TP. Cryopreservation effect on chromogranin a expression in neonatal pig adrenal cell culture. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019; 29(4): 344–53.
54. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 839–45.
55. Perry BC, Zhou D, Wu X, *et al.* Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14(2): 149–56.
56. Pilbauerova N, Schmidt J, Soukup T, *et al.* The effects of cryogenic storage on human dental pulp stem cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 23 [cited 2025 Jan 30]; 22(9): 4432. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4432>
57. Plaksina EM, Sidorenko OC., Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from newborn piglet adrenal glands. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27(4): 322–33.
58. Platel JC, Gordon V, Heintz T, Bordey A. GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia.* 2009; 57: 66–78.
59. Prickett RC, Marquez-Curtis LA, Elliott JA, McGann LE. Effect of supercooling and cell volume on intracellular ice formation. *Cryobiology.* 2015; 70(2):156–63.
60. Rabow Z, Morningstar T, Showalter M, *et al.* Exposure to DMSO during infancy alters neurochemistry, social interactions, and brain morphology in long-evans rats. *Brain Behav* [Internet]. 2021 Apr 10 [cited 2025 Jan 30]; 11(5): e02146. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/brb3.2146>
61. Raible DW, Eisen JS. Regulative interactions in zebrafish neural crest. *Development.* 1996; 122(2): 501–7.
62. Raible DW, Eisen JS. Restriction of neural crest cell fate in the trunk of the embryonic zebrafish. *Development.* 1994; 120: 495–503.
63. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas with correlated cell and molecular biology*, 8th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2018. 1072 p.
64. Schwarz S, Spitzbarth I, Baumgärtner W, *et al.* 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 2025 Jan 30]; 20(5): 1058. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1058>
65. Sidorenko, O. S., Bozhok, G. A., Legach, E. I., Gurina, T. M. Study of possibility to obtain and cryopreserve adrenal cell primary culture of newborn piglets. *Probl Cryobiol Cryomed.*, 2011, 21(1), 58–67.
66. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, *et al.* Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn.* 2004; 231(2): 258–69.
67. Silani V, Pizzuti A., Strada O., *et al.* Cryopreservation of human fetal adrenal medullary cells. *Brain Res.* 1988; 454 (1-2): 383–6.
68. Soto J, Ding X, Wang A, Li S. Neural crest-like stem cells for tissue regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2021; 10(5): 681–93.
69. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(9): 778–84.

70. Trumble TE, Whalen JT. The effects of cryosurgery and cryoprotectants on peripheral nerve function. *J Reconstr Microsurg*. 1992; 8(1): 53–8; discussion 59–60.
71. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009; 59(2): 150–7.
72. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical potential and current progress of dental pulp stem cells for various systemic diseases in regenerative medicine: a concise review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Mar 6 [cited 2025 Jan 30]; 20(5): 1132. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1132>
73. Yamatoya K, Nagai Y, Teramoto N, Kang W, Miyado K, Nakata K, Yagi T, Miyamoto Y. Cryopreservation of undifferentiated and differentiated human neuronal cells. *Regen Ther*. 2022; 19: 58–68.
74. Yu H, Kumar SM, Kossenkov AV, *et al.* Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2010; 130(5): 1227–36.
75. Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, *et al.* Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Sep 19 [cited 2025 Jan 30]; 9(9): e107447. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0107447>
76. Zalewski AA, Fahy GM, Azzam NA, Azzam RN. The fate of cryopreserved nerve isografts and allografts in normal and immunosuppressed rats. *J Comp Neurol*. 1993; 331(1): 134–47.
77. Zhang C, Deng Y, Dai H, *et al.* Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res Bull*. 2017; 128: 34–9.
78. Zhang S, Zhou Y, Xian H, *et al.* Nerve regeneration in rat peripheral nerve allografts: An assessment of the role of endogenous neurotrophic factors in nerve cryopreservation and regeneration. *Eur J Neurosci*. 2022; 55(8): 1895–916.
79. Zhou H, Yang H, Lu L, *et al.* A modified protocol for the isolation, culture, and cryopreservation of rat embryonic neural stem cells. *Exp Ther Med* [Internet]. 2020 Oct 6 [cited 2025 Jan 30]; 20(6): 156. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.9285>
80. Zhu Z, Qiao L, Zhao Y, Zhang S. Optimal freezing and thawing for the survival of peripheral nerves in severed rabbit limbs. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(11): 7801–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4270531>.
81. Zhurova M, Woods EJ, Acker JP. Intracellular ice formation in confluent monolayers of human dental stem cells and membrane damage. *Cryobiology*. 2010; 61(1): 133–41..

Надійшла 13.08.2024

Прийнята до друку 20.02.2025

G.A. Bozhok¹, V.D. Ustychenko¹, O.S. Sydorenko¹, Yu.O. Bozhkova¹, N.M. Alabedalkarim¹,
O.V. Pakhomov¹, D.B. Vvedenskyi², A.V. Shatillo³, T.P. Bondarenko^{1,2}, Ye.I. Legach¹

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

³ P.V. Voloshyn Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy
of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

* bozhokgaru@gmail.com

CRYOPRESERVATION OF NEURAL CREST-DERIVED CELLS

Neural crest-derived cells are formed from neuroectoderm at early stages of embryogenesis. As a result of the epitheliomesenchymal transition, they migrate to peripheral structures and differentiate into neurons and glia of the peripheral nervous system, skin melanocytes, dental pulp cells, neuroendocrine cells, cartilage and bones of the skull and several other phenotypes. Neural crest derivatives have great prospects for application in regenerative medicine. Cryopreservation is widely used for long-term storage of biological material, enabling its application in clinical practice. Here, we have analyzed the approaches to cryopreservation of neural crest-derived cells procured from different sources. The *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate the effectiveness of the developed protocols for cryopreservation of various neural crest-derived cells, which opens the way for establishing cryobanks and expanding the use of these cells in clinical practice. ,

Key words: cryopreservation, neural crest, 2D- culture, 3D-culture, dorsal root ganglion cells, dental pulp cells, melanocytes, Schwann cells.