

Выбор криозащитной среды для витрификации суспензии эмбриональных фибробластоподобных клеток

Search of Cryoprotective Medium for Vitrification of Fetal Fibroblast-Like Cell Suspension

Определяли состав криозащитных сред, позволяющих исключить кристаллизацию при быстром замораживании и отогреве в стандартных криопробирках, а также исследовали влияние экспозиции и криоконсервирования в этих средах на жизнеспособность эмбриональных фибробластоподобных клеток. В состав витрифицирующихся растворов включали диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), сахарозу и визуально определяли наличие или отсутствие кристаллизации при замораживании и отогреве. Для витрификации суспензии клеток были отобраны два раствора, обозначенные ДЭПС-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% 1,2-ПД, 0,5 М сахарозы) и ДЭПС-2 (10% ДМСО, 15% ЭГ, 15% 1,2-ПД, 1 М сахарозы). После экспозиции в ДЭПС-1 и ДЭПС-2 наблюдалось снижение сохранности и эффективности прикрепления клеток к пластику по сравнению с контролем. После замораживания-отогрева в растворе ДЭПС-2 сохранность клеток снижалась на 30% по сравнению со значениями до замораживания, а в ДЭПС-1 не изменялась, клетки прикреплялись к пластику и пролиферировали. Показана возможность витрификации суспензии эмбриональных фибробластоподобных клеток под защитой многокомпонентных криозащитных сред при быстром замораживании в стандартных пластиковых криопробирках.

Ключевые слова: витрификация, суспензия клеток, эмбриональные фибробластоподобные клетки, сохранность.

Визначали склад криозахисних середовищ, які дозволяють виключити кристалізацію під час швидкого заморожування та відігрівання в стандартних криопробірках, а також досліджували вплив експозиції та криоконсервування в цих середовищах на життєздатність ембріональних фібробластоподібних клітин. До складу розчинів, що вітрифікуються, вводили диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь (ЕГ), 1,2-пропандіол (1,2-ПД), сахарозу і візуально визначали кристалізацію чи її відсутність під час заморожування та відігрівання. Для вітрифікації суспензії клітин було відібрано два розчини: ДЕПС-1 (10% ДМСО, 20% ЕГ, 20% ПД, 0,5 М сахарози) і ДЕПС-2 (10% ДМСО, 15% ЕГ, 15% 1,2-ПД, 1 М сахарози). Після експозиції в ДЕПС-1 і ДЕПС-2 спостерігали зниження збереженості та ефективності прикріплювання клітин до пластику в порівнянні з контролем. Після заморожування-відігрівання в ДЕПС-2 збереженість клітин знижувалась на 30% в порівнянні з показником до заморожування, а в ДЕПС-1 не змінювалась і клітини проліферували в культурі. Показано можливість вітрифікації суспензії ембріональних фібробластоподібних клітин у багатокомпонентних криозахисних середовищах при швидкому заморожуванні в стандартних пластикових криопробірках.

Ключові слова: вітрифікація, суспензія клітин, ембріональні фібробластоподібні клітини, збереженість.

The paper covers the search of cryoprotective medium composition, allowing to avoid the crystal formation during rapid freeze-thawing in standard cryovials, as well as the effect of exposure and freezing-thawing in the media on survival of fetal fibroblast-like cells. The composition of vitrification media included dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD) and sucrose. The applicability of the media was visually assessed by presence or absence of crystal formation during freeze-thawing, and two media were selected for vitrification of cell suspensions: DEPS-1 (10% of DMSO, 20% of EG, 20% of 1,2-PD and 0.5 M of sucrose) and DEPS-2 (10% of DMSO, 15% of EG, 15% of 1,2-PD and 1 M of sucrose). Exposure to DEPS-1 and DEPS-2 led to decrease in cell survival and ability to adhere to plastic. After freeze-thawing in DEPS-2 the cell survival decreased by 30% comparing to the values before freezing, and in DEPS-1 no changes were observed and the cells proliferate in culture. Thus the possibility of fetal fibroblast-like cell suspension to be vitrified in multicomponent cryoprotective media during rapid freezing in standard plastic cryovials was shown.

Key-words: vitrification, cell suspension, fetal fibroblast-like cells, survival.

Витрификация является одним из альтернативных подходов к проблеме криоконсервирования. Витрификация как процесс, в результате которого достигается стеклоподобное затвердевание системы без формирования кристаллов льда, позволяет минимизировать криповреждение клеток [4], а

Vitrification is an alternative approach to conventional cryopreservation. Vitrification is a process of glasslike solidification that completely avoids ice crystal formation and allows to minimize cell injury [4]. At the same time vitrification considerably simplifies and accelerates the cryopreservation process

также значительно ускоряет и облегчает процесс криоконсервирования, поскольку не требует специального дорогостоящего оборудования. Витрификация широко применяется для криоконсервирования яйцеклеток [7, 15, 17], эмбрионов всех стадий развития, включая бластоцисту [11, 24, 25], небольших фрагментов тканей [3, 5], колоний эмбриональных стволовых клеток [6, 19] и инкапсулированных клеток [13]. В работах по витрификации гемопоэтических клеток cordовой крови [14], эндотелиальных клеток линии ECV304 [23], моноцитов [21], остеобластов [16] отмечается перспективность ее применения для криоконсервирования клеточных суспензий. Однако вопросы разработки технологических этапов для витрификации клеточных суспензий остаются актуальными.

Высокие концентрации криопротекторов, необходимые для витрификации, являются токсичными для клеток, поэтому время их экспозиции в витрифицирующемся растворе не должно превышать 30 с [17]. Это создает трудности при добавлении и удалении криозащитных сред из суспензии клеток. Кроме того, для витрификации необходимы высокие скорости охлаждения, что обычно достигается при использовании криоконтейнеров с высоким поверхностно-объемным отношением, в частности соломинок (cryo straws) [16, 17]. Однако их малый объем не позволяет криоконсервировать и хранить большое количество биоматериала. Высоких скоростей охлаждения также удается достичь при использовании открытых криоконтейнеров, обеспечивающих контакт с жидким азотом, например открытые соломинки (open-pulled straws) [19], криопетли (cryo loops) [10]. В то же время их применение не обеспечивает стерильности [2], что не соответствует современным стандартам работы с биологическим материалом. Использование криопробирок с герметически завинчивающейся крышкой практически полностью исключает риск контаминации при хранении криоконсервированного материала в жидком азоте. Вопрос о возможности применения стандартных криопробирок для витрификации клеточных суспензий остается открытым.

Цель данной работы – определить состав криозащитных сред, позволяющих исключить кристаллизацию при быстром замораживании и отогреве в стандартных криопробирках, а также изучить влияние экспозиции и криоконсервирования в этих средах на жизнеспособность фибробластоподобных клеток.

Материалы и методы

В составе витрифицирующихся растворов комбинировали ДМСО в концентрации 10%, этиленгликоль (ЭГ) – 10, 15, 20 или 25%, 1,2-пропандиол

without the application of expensive equipment. Vitrification protocols are widely used for cryopreservation of oocytes [7, 15, 17], embryos at all stages of development, including blastocyst [11, 24, 25], small tissue samples [3, 5], embryonic stem cells colonies [6, 19] and encapsulated cells [13]. Studies concerned vitrification of cord blood haematopoietic cells [14], endothelial cell line ECV304 [23], monocytes [21], osteoblasts [16] showed availability of vitrification for the cryopreservation of cell suspensions. At the same time technical features of vitrification procedure for cell suspensions have not been worked out yet.

Vitrification requires high concentrations of cryoprotectants which are toxic to cells, so the exposure to the final concentrations of vitrification solution should be reduced to 30 s [17], that results in difficulties with its addition and removal. Moreover to achieve the vitrification, very high cooling rates are required, most often achieved by flash-freezing in liquid nitrogen within containers that possess a high surface-to-volume ratio (cryostraws) [16, 17]. However, the relatively small volume of the straws is unsuited for handling bulk quantities of cryopreserved cells. The application of open containers, which provide contact with liquid nitrogen, such as open-pulled straws [19] and cryo loops [10], also allowed to achieve high cooling rates. At the same time the use of such containers does not allow to keep samples in sterile conditions [2] corresponding to modern standards of biological material processing. The use of hermetically closed cryovials prevents contamination during storage of cryopreserved material in liquid nitrogen. However the questions about possibility of using plastic cryovials for the vitrification of cell suspension are still open.

The aim of this research was to find the composition of cryoprotective media that could exclude ice crystal formation during rapid cooling and thawing in standard cryovials and to investigate the effect of exposure and cryopreservation using these media on viability of fibroblast-like cells.

Materials and methods

Vitrification solution included dimethyl sulfoxide (DMSO) in concentration of 10% w/v, ethylene glycol (EG) – 10, 15, 20 and 25% w/v, 1,2-propane diol (1,2-PD) – 10, 15, 20 and 25% w/v and sucrose – 0.5, 1, 1.5 and 2 M in various combinations. Cryovials (Corning Cat. №2028, Canada), containing 0.5 ml of each vitrification solution were placed into liquid nitrogen. Samples were thawed on water bath at 40°C. Glass-forming ability of solution was assessed by visual observation of ice crystal presence or absence during cooling and thawing [1, 3, 16].

Fibroblast-like cells were isolated by non-enzymatic method [9] from mesodermal tissue of human fetuses of 5 weeks of gestation and cultured in medium

(1,2-ПД) – 10, 15, 20 или 25% и сахарозу – 0,5, 1, 1,5 или 2 М. Витрифицирующиеся растворы готовили гравиметрически, используя физиологический раствор. В криопробирки (Corning Cat. №2028, Canada) вносили по 0,5 мл растворов, после чего их погружали в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 40°C. Стеклообразующую способность раствора оценивали визуально по наличию или отсутствию кристаллизации на этапах замораживания и отогрева [1, 3, 16].

Фибробластоподобные клетки выделяли неферментативным методом [9] из мезодермальных тканей эмбрионов человека 5 недель гестации и культивировали в среде α -MEM (Sigma, США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота (Биолот, Россия), 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина, при 37°C, газовая среда – воздух + 5% CO₂.

Эмбриональный материал использовали с письменного согласия проинформированного донора в соответствии с нормами комиссии по биоэтике ИПКиК НАН Украины. Фибробластоподобные клетки 5-10 пассажа трипсинизировали после достижения культурой 80-90% конfluence и центрифугировали 7 мин при 200 g. Полученный осадок суспендировали в среде культивирования и использовали для дальнейших экспериментов.

Среду добавляли при комнатной температуре в два этапа. На первом этапе 50 мкл суспензии клеток смешивали с 50 мкл криозащитной среды в криопробирках и эквilibрировали 1 мин. Затем к суспензии добавляли 400 мкл криозащитной среды и полученные образцы погружали в жидкий азот. При этом конечные концентрации криопротекторов достигались при смешивании с клеточной суспензией в соотношении 9:1. Промежуток времени после смешивания суспензии с криозащитной средой до погружения в жидкий азот на втором этапе не превышал 15-20 с. Образцы хранили в жидком азоте в течение 24 ч, после чего отогревали на водяной бане при 40°C и отмывали от криозащитной среды. Параллельно изучали влияние экспозиции в витрифицирующихся растворах на жизнеспособность клеток.

Использовали два способа удаления криозащитной среды. Первый – образцы переносили в 0,5 М раствор сахарозы (разведение 1:10) и центрифугировали при 450 g в течение 10 мин. К полученному осадку медленно добавляли среду 199 (ПанЭко, Россия), дополненную 10% ЭС, и центрифугировали при 450 g в течение 10 мин. Второй способ отмывания исключал центрифугирование после помещения деконсервированной суспензии в раствор сахарозы и осуществлялся следующим образом: образцы переносили в 0,5 М раствор сахарозы (разведение 1:10), а затем к полученной

α -MEM (Sigma, USA), supplemented by 10% of fetal calf serum (FCS; Biolot, Russia), 50 IU/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin, in 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

Fetal material was obtained under written consent of informed donors under regulations of ethical committee of IPC&C NAS of Ukraine. Fibroblast-like cells at 5-10 passages were trypsinised on reaching 80-90% confluence and centrifuged at 200 g during 7 min. Obtained cell pellets were resuspended in culture medium and used for further experiments.

Medium was added in two stages at room temperature. At first stage 50 μ l of cell suspension was mixed with 50 μ l of cryoprotective medium and incubated for 1 min. Then 400 μ l of cryoprotective medium was added and obtained samples were immediately (during 15-20 s) placed into liquid nitrogen. Final concentrations of cryoprotectants were obtained after mixing with cell suspension in ratio 9:1. Samples were stored in liquid nitrogen during 24 hrs, then thawed on water bath at 40°C and washed out from cryoprotective medium. Simultaneously the effect of exposure of cells to vitrification solutions on cell viability was studied.

Two different washing out procedures were used. First procedure consisted in transferring of the samples into 0.5 M sucrose solution (dilution 1:10) and following centrifugation at 450 g during 10 min. Then, pellets were slowly mixed with medium 199 (PanEco, Russia), supplemented by 10% FCS and centrifuged at 450 g during 10 min. Second procedure involved transferring of the samples into 0.5 M sucrose solution (dilution 1:10), slow mixing of the obtained suspension with medium 199, supplemented by 10% FCS (dilution 1:2) and centrifugation at 450 g during 10 min. Cell pellets were resuspended in culture medium.

The cell survival was assessed by trypan blue staining (Sigma, USA) [16]. The cell number was calculated in Neubauer's haemocytometer (USA). The ability of cells to adhere was determined under culture condition during 24 hrs [18].

Results were statistically processed using Student's t-test. Data are presented as $M \pm m$, where M is the mean, and m is the standard error.

Results and discussion

The effectiveness of vitrification process depends basically on composition of vitrification solution. An ideal vitrification solution is characterized by the ability to form stable glass during rapid cooling in combination with low toxicity. The reduction of chemical toxicity of a vitrification solution without diminishing its glass-forming ability may be reached if the cryoprotectants with different mechanisms of toxicity are combined in the solution [3]. DMSO and EG are the basic cryoprotectants in vitrification protocols for different mammal species embryos [8, 25].

суспензии медленно добавляли среду 199, дополненную 10% ЭС (разведение 1:2) и центрифугировали при 450 g в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в среде культивирования.

Сохранность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем трипановым синим (Sigma, США) [16]. Количество клеток подсчитывали в гемоцитометре Neubauer's (США). Способность клеток к адгезии определяли в условиях культивирования в течение 24 ч [18].

Полученные результаты статистически обрабатывали, используя t-тест Стьюдента. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – средняя ошибка.

Результаты и обсуждение

Эффективность процесса витрификации в значительной степени определяется составом витрифицирующегося раствора. Для идеального витрифицирующегося раствора характерна способность формировать стабильное стекло при быстром замораживании в комбинации с низкой токсичностью. Уменьшение степени токсичности витрифицирующегося раствора без снижения его стеклообразующей способности может быть достигнуто при комбинировании в составе раствора криопротекторов с различными механизмами токсичности [3]. ДМСО и ЭГ являются основными криопротекторами в протоколах по витрификации эмбрионов различных видов млекопитающих [8, 25]. Часто используют 1,2-ПД, поскольку он является сильным витрификатором (glass former) [1]. Кроме того, в состав витрифицирующихся растворов включают непроникающие добавки Ficoll 70000 или декстран 69000 [12]. При применении сахаров снижается скорость охлаждения, необходимая для витрификации [20], и таким образом уменьшаются концентрация проникающих криопротекторов и общая токсичность раствора [11].

Основываясь на этом, в состав витрифицирующихся растворов включали ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозу. В составе смеси определяли наименьшие концентрации криопротекторов, позволяющие исключить кристаллизацию при замораживании и отогреве.

Концентрация сахарозы в составе витрифицирующихся растворов, как правило, составляет 0,5 или 1 М [11, 23]. Поэтому эти концентрации сахарозы включали в состав растворов в сочетании с возрастающими концентрациями ЭГ и 1,2-ПД. Как видно из табл. 1, в присутствии 10% ДМСО при комбинировании 0,5 М сахарозы с 10% ЭГ и 10% 1,2-ПД в процессе замораживания наблюдалась кристаллизация. Повышение концентраций ЭГ и

1,2-ПД is frequently used, because of its high glass-forming ability [1]. Besides, non-penetrating additives such as Ficoll 70000 or dextran 69000 [12] are included into vitrification solution. The use of saccharides decreases the cooling rate, required for vitrification [20], thus reduces the concentration of the penetrating cryoprotectants and general toxicity of solution [11].

In this study vitrification solutions consisted of DMSO, EG, 1,2-PD and sucrose. The minimal concentrations of cryoprotectants, which allowed to exclude the crystallization during cooling and thawing were determined in mixes of compounds mentioned.

The concentration of sucrose in vitrification solution is generally 0.5 or 1 M [11, 23]. These sucrose concentrations were combined with increased concentrations of EG and 1,2-PD in solution composition. As it is shown in Table 1, crystal formation during cooling was observed when 0.5 M sucrose was combined with 10% EG and 10% 1,2-PD in the presence of 10% DMSO. The increase of EG and 1,2-PD concentration up to 15% allowed to prevent crystal formation during cooling, but this was observed during thawing. The crystal formation during both cooling and thawing was excluded when 0.5 M sucrose was combined with 20 or 25% EG and 1,2-PD. The application of 1 M of sucrose prevented crystallization during cooling even in case of using 10% EG and 1,2-PD (Table 1). At the same time increase of their (EG and 1,2-PD) concentration to 15% allowed to exclude crystal formation during thawing. So the increase of sucrose concentration allowed to reduce the concentrations of EG and 1,2-PD, required for solution vitrification.

The possibility of reduction of EG and 1,2-PD concentrations to 10% at the expense of increase of sucrose concentration was studied in the further series of experiments. The increase of sucrose concentration up to 2 M in the presence of 10% DMSO, 10% EG and 10% 1,2-PD could not exclude crystallization during thawing.

To minimize toxicity, solutions, which contained lowest concentrations of DMSO, EG, 1,2-PD and sucrose (DEPS-1 and DEPS-2), but could prevent the crystallization during cooling and thawing were used in the further experiments. The composition of solutions is presented in Table 2.

The cell survival and adhesion ability were determined both after exposure with DEPS-1 and DEPS-2 solutions and after freeze-thawing. Intact cells after trypsinization were used as a control group.

The survival of fibroblast-like cells in control group assessed by trypan blue staining was $90.3 \pm 2.9\%$. The cell survival after exposure to the solution DEPS-1 and removal of cryoprotective medium was $71.7 \pm 2.1\%$ for first washing out procedure and $78.3 \pm 2.5\%$ – for second (Fig. a). The cell survival after exposure to

Таблица 1. Визуальный анализ кристаллизации растворов, содержащих различные криопротекторы, при быстром замораживании и быстром отогреве (n=5)
Table 1. Visual analysis of crystallization in solutions, contained different cryoprotectants, during rapid cooling and rapid thawing (n=5).

Показатель Index	Состав раствора Composition of solution							
	10% ДМСО 10% DMSO							
	0,5 М сахарозы 0.5 M of sucrose				1 М сахарозы 1 M of sucrose			
	10% ЭГ 10% 1,2-ПД 10% EG 10% 1,2-PD	15% ЭГ 15% 1,2-ПД 15% EG 15% 1,2-PD	20% ЭГ 20% 1,2-ПД 20% EG 20% 1,2-PD	25% ЭГ 25% 1,2-ПД 25% EG 25% 1,2-PD	10% ЭГ 10% 1,2-ПД 10% EG 10% 1,2-PD	15% ЭГ 15% 1,2-ПД 15% EG 15% 1,2-PD	20% ЭГ 20% 1,2-ПД 20% EG 20% 1,2-PD	25% ЭГ 25% 1,2-ПД 25% EG 25% 1,2-PD
Кристаллизация при замораживании Crystal formation during cooling	+	-	-	-	-	-	-	-
Кристаллизация при отогреве Crystal formation during warming	+	+	-	-	+	-	-	-

Примечание: “+” – приобретение белой окраски и помутнение образца; “-” – образец прозрачный.

Note: “+” – whitening and turbid sample; “-” – transparent sample.

1,2-ПД до 15% позволяло предотвратить кристаллизацию при замораживании, однако образование кристаллов льда наблюдалось при отогреве. Исключить кристаллизацию на этапах замораживания и отогрева удалось при комбинировании 0,5 М сахарозы с 20 или 25% ЭГ и 1,2-ПД. Для растворов с 1 М сахарозы уже при включении ЭГ и 1,2-ПД в концентрациях 10% не наблюдали кристаллизацию при замораживании, а отсутствие кристаллизации при отогреве достигалось при повышении их концентраций до 15% (табл.1). Таким образом, повышение концентрации сахарозы позволяло снизить концентрации ЭГ и 1,2-ПД, необходимые для витрификации растворов.

В следующей серии экспериментов исследовали возможность снизить концентрации ЭГ и 1,2-ПД до 10% за счет повышения концентрации сахарозы. Однако в присутствии 10% ДМСО, 10% ЭГ и 10% 1,2-ПД при повышении концентрации сахарозы даже до 2 М не удалось исключить кристаллизацию при отогреве.

Для минимизации токсичности в последующих экспериментах использовали два раствора, содержащих наименьшие концентрации ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы (ДЭПС-1 и ДЭПС-2) и характеризовавшихся отсутствием кристаллизации при замораживании и отогреве. Состав растворов приведен в табл. 2.

Сохранность и способность клеток к адгезии определяли после экспозиции их в растворах ДЭПС-1 и ДЭПС-2 и после замораживания-отогрева. За контроль принимали клетки, не подвергавшиеся воздействиям после трипсинизации.

Сохранность фибробластоподобных клеток, оцененная по окрашиванию трипановым синим, в

the solution DEPS-2 was not significantly different compared to DEPS-1 and comprised 71.8 ± 2.6 and $78.4 \pm 3.5\%$ for first and second methods of cryoprotectants removal, correspondingly (Fig. a). Fibroblast-like cells in control group possessed high ability of adherence to culture flask plastic. After the exposure to the solutions DEPS-1 and DEPS-2 cells retained their ability to adhere, however the effectiveness of attachment did not reach the level of control group.

There was no significant loss of cell number after cryopreservation of cells under protection of DEPS-1 and DEPS-2 and both washing out methods. The survival of cells, cryopreserved under protection of DEPS-1 did not differ from the survival after exposure to this solution and comprised 70.6 ± 2.8 for first washing out procedure and $70.6 \pm 2.7\%$ for second (Fig. b). At the same time, survival of cells, cryopreserved with DEPS-2 decreased in 1.6-1.7 times relatively to the washing out procedure being used ($39.9 \pm 4.1\%$ and $45.2 \pm 1.6\%$ after first and second procedure, correspondingly). The effectiveness of cell attachment to the surface of culture flask decreased in great extent after cryopreservation under protection of both DEPS-1 and DEPS-2. However cells cryopreserved under protection of DEPS-1 showed higher ability of flattening and proliferation during further culture. The formation of small ice crystals was revealed during thawing of cell suspension cryopreserved under protection of DEPS-2.

In the present study, by combination of different concentrations of EG, 1,2-PD and sucrose in the presence of 10% DMSO we determined the composition of cryoprotective media, which allowed to prevent crystallization during rapid cooling and thawing in plastic cryovials. The question about the application

Таблица 2. Состав растворов, выбранных для витрификации фибробластоподобных клеток
Table 2. Composition of solution for vitrification of fibroblast-like cells

Раствор Solution	ДМСО DMSO		ЭГ EG		1,2-ПД 1,2-PD		Сахароза Sucrose	Суммарная концентрация криопротекторов, моль/л Total concentration of cryoprotectants, mol/l
	%	моль/л mol/l	%	моль/л mol/l	%	моль/л mol/l	моль/л mol/l	
ДЭПС-1 DEPS-1	10	1,4	20	4	20	2,6	0,5	8,5
ДЭПС-2 DEPS-2	10	1,4	15	2,4	15	2	1	6,8

контрольной группе составляла $90,3 \pm 2,9\%$. После экспозиции клеток в растворе ДЭПС-1 и удаления криозащитной среды сохранность клеток составляла $71,7 \pm 2,1\%$ при первом способе отмывания и $78,3 \pm 2,5\%$ – при втором (рис. а). Сохранность клеток после экспозиции в ДЭПС-2 составляла $71,8 \pm 2,6$ и $78,4 \pm 3,5\%$ соответственно (рис. а). Статистически значимых различий по влиянию экспозиции в ДЭПС-1 и ДЭПС-2 на сохранность клеточной суспензии выявить не удалось. Фибробластоподобные клетки контрольной группы обладали высокой способностью прикрепляться к поверхности культурального пластика. После экспозиции в растворах ДЭПС-1 и ДЭПС-2 клетки сохраняли способность к адгезии, однако эффективность прикрепления не достигала уровня контрольной группы.

После замораживания-отогрева с использованием ДЭПС-1 и ДЭПС-2 и обоих способов отмывания значительной потери клеток не наблюдали. При этом сохранность клеток для ДЭПС-1 не отличалась от значений этого показателя после экспозиции клеток в растворе и составляла при первом способе отмывания $70,6 \pm 2,8$ и $70,6 \pm 2,7\%$ – при втором (рис. б). При использовании ДЭПС-2 сохранность деконсервированных клеток снижалась при первом способе отмывания в 1,6 раза по сравнению со значениями после экспозиции клеток в растворе и составляла $39,9 \pm 4,1\%$, при втором – в 1,7 раза и составляла $45,2 \pm 1,6\%$. После замораживания-отогрева эффективность прикрепления клеток к поверхности культурального флакона в значительной степени снижалась при использовании как ДЭПС-1, так и ДЭПС-2. Однако клетки, криоконсервированные под защитой ДЭПС-1, проявляли большую способность к распластыванию и пролиферировали при дальнейшем культивировании. Было обнаружено, что при отогреве суспензии клеток, криоконсервированных под защитой ДЭПС-2, наблюдалось образование мелких кристаллов льда.

При комбинировании различных концентраций ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы в присутствии 10% ДМСО были определены смеси криопротекторов, в кото-

of standard plastic cryovials is substantial for the development of cryopreservation protocols for cell suspensions. At the same time data concerning the application of standard plastic cryovials for the vitrification of cell suspensions was not published for the present moment.

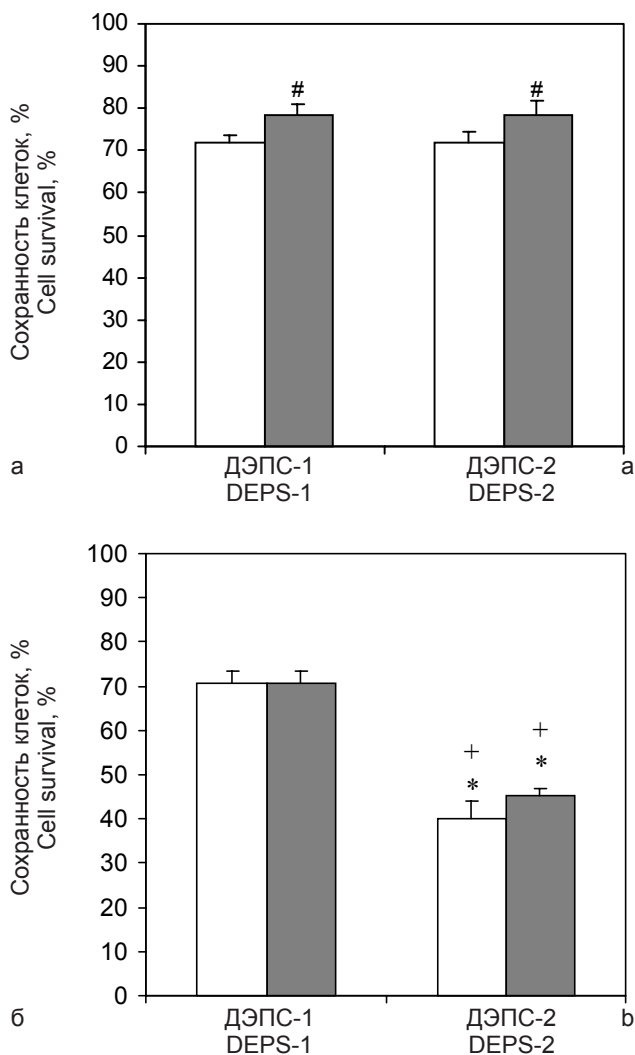
The solutions DEPS-1 and DEPS-2 were selected for the vitrification of cell suspensions. The exposure of fibroblast-like cells to the solutions DEPS-1 and DEPS-2 resulted in decrease of cell survival and adhesion compared to control. The same effect of high concentrations of cryoprotectants required for vitrification was described in several studies. In [16] the substantial reduction of osteoblasts viability was observed after increase of DMSO and 1,2-PD concentrations to 30%. Studies [22, 23] showed the decrease of proliferative activity of endothelial cell line ECV304 after exposure to 45% solutions of DMSO, 1,2-PD, EG and 2,3-butane diol. The damaging effect of high concentrations of cryoprotectants takes place due to both their toxicity and osmotic injury of cells during cryoprotectants addition, exposure and washing out from vitrification solution. The drastic change of osmotic pressure on plasma membrane can be minimized during cryoprotectant removal by introduction to the washing solution osmotically inactive, non-penetrating compounds (e.g. sucrose). Sucrose concentration may vary in wide range from 0.2 [19] to 1 M [7]. In the present study, the application of 0.5 M sucrose allowed to achieve 70-78% cell survival after exposure to the vitrification solution with both methods of cryoprotective medium removal.

The cell survival after exposure to the DEPS-1 and DEPS-2 solutions decreased in the same manner. The determination of this index after freeze-thawing allowed to reveal the important difference in effectiveness of studied solutions. The cell survival after freeze-thawing in DEPS-2 decreased for 30% in comparison with survival after exposure. At the same time the survival was not changed in case of DEPS-1 application. The decrease of the survival in DEPS-2 group was the result of crystallization during samples thawing possibly due to the destabilisation of

рых при быстром замораживании и отогреве в пластиковых криопробирках не развивалась кристаллизация. Вопрос о применении стандартных пластиковых криопробирок является существенным при разработке протоколов криоконсервирования для суспензий клеток. Однако данные о применении пластиковых криопробирок для витрификации суспензий клеток в литературе отсутствуют.

Растворы ДЭПС-1 и ДЭПС-2 были отобраны для последующих экспериментов по витрификации суспензии клеток. Экспозиция фибробластоподобных клеток в растворах ДЭПС-1 и ДЭПС-2 приводила к снижению сохранности и способности клеток к адгезии по сравнению с контролем. Подобный эффект высоких концентраций криопротекторов, необходимых для витрификации, описан в ряде работ. Так, в работе [16] отмечалось значительное снижение жизнеспособности остеобластов при повышении концентрации ДМСО и 1,2-ПД до 30%. В работах [22, 23] показано снижение пролиферативной активности эндотелиальных клеток линии ECV304 после экспозиции в 45%-х растворах ДМСО, 1,2-ПД, ЭГ и 2,3-бутандиола. Повреждающее действие высоких концентраций криопротекторов обусловлено как их токсичностью, так и осмотическим повреждением клеток на этапах добавления криопротекторов, экспозиции с ними, а также на этапе отмыывания от витрифицирующегося раствора. Резкое изменение осмотического давления на плазматическую мембрану на этапе удаления криопротекторов можно уменьшить введением в отмыывочный раствор таких осмотически активных, непроникающих в клетку соединений, как сахароза. При этом концентрация сахарозы может варьировать в широких пределах: от 0,2 [19] до 1 М [7]. В настоящей работе применение 0,5 М сахарозы позволило добиться сохранности клеток на уровне 70-78 % после экспозиции в витрифицирующихся растворах при обоих способах отмыывания криозащитной среды.

Сохранность клеток после экспозиции в растворах ДЭПС-1 и ДЭПС-2 снижалась одинаково. Определение этого показателя после замораживания-отогрева позволило выявить существенную разницу в эффективности исследуемых растворов. Если после замораживания-отогрева в ДЭПС-2 сохранность клеток снижалась на 30% по отношению к показателю после экспозиции, то в ДЭПС-1 – не изменялась. Снижение сохранности в ДЭПС-2 происходит за счет кристаллизации при отогреве образцов, что может быть обусловлено дестабилизацией аморфного состояния в результате разведения раствора ДЭПС-2 при дегидратации клеток. Кроме того, клетки и их фрагменты могут выступать в качестве центров кристалли-



Сохранность фибробластоподобных клеток после экспозиции в витрифицирующемся растворе (а) и последующего замораживания-отогрева (б) (n=8): □ – первый способ отмыывания от криопротектора; ■ – второй способ отмыывания от криопротектора; # – $p < 0,05$ по отношению к значению показателя при первом способе отмыывания; * – $p < 0,05$ по отношению к значению показателя после экспозиции; + – $p < 0,05$ по отношению к значению показателя после криоконсервирования под защитой ДЭПС-1.

The survival of fibroblast-like cells after exposure to the vitrification solution (a) and following freezing-thawing (b) (n=8): □ – first washing-out procedure; ■ – second washing-out procedure; # – $p < 0,05$ in comparison to the index for first washing out procedure; * – $p < 0,05$ in comparison to the index after exposure; + – $p < 0,05$ in comparison to the index after cryopreservation under DEPS-1 protection.

amorphous state by dilution of solution DEPS-2 during cell dehydration. Moreover cells and its fragments could play role as the centers of crystallization. The higher total molar concentration as well as higher concentrations of EG and 1,2-PD in DEPS-1 solution allowed to exclude crystallization in the presence of cells. The obtained data showed that cell injury after the application of DEPS-1 was the result of toxicity of solution components, required for vitrification,

зации. Более высокая суммарная молярная концентрация, а также более высокие концентрации ЭГ и 1,2-ПД в составе раствора ДЭПС-1 позволили исключить кристаллизацию в присутствии клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что повреждение клеток при использовании ДЭПС-1 обусловлено в основном токсичностью компонентов раствора, необходимых для витрификации, а при использовании ДЭПС-2 как токсичностью раствора, так и повреждающим воздействием кристаллизации на этапе замораживания-отогрева.

Выводы

В настоящей работе были определены смеси ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы, которые не образовывали кристаллов льда при быстром замораживании и отогреве и позволяли сохранить жизнеспособность фибробластоподобных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения метода витрификации для криоконсервирования фибробластоподобных клеток и могут быть основой для разработки методов криоконсервирования тканеинженерных конструкций.

Литература

1. Baudot A., Odagescu V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions // *Cryobiology*.— 2004.— Vol. 48, N3.— P. 283-294.
2. Bielanski A., Nadin-Davis S., Sapp T., Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen // *Cryobiology*.— 2000.— Vol. 40, N2.— P. 110-116.
3. de Graaf I.A.M., Draaisma A., Schoeman O. et al. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification // *Cryobiology*.— 2007.— Vol. 54, N1.— P. 1-12.
4. Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A. et al. Vitrifications as an approach to cryopreservation // *Cryobiology*.— 1984.— Vol. 21, N4.— P. 407-426.
5. Fujita T., Takami Y., Ezoe K. et al. Successful preservation of human skin by vitrification // *J. Burn. Care Rehabil.*— 2000.— Vol. 21, N4.— P. 304-309.
6. Heng B.C., Kuleshova L.L., Bested S.M. et al. The cryopreservation of human embryonic stem cells // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2005. — Vol 41, Pt. 2. — P. 97-104.
7. Hotamisligil S., Toner M., Powers R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol // *Biol. Reprod.*— 1996.— Vol. 55, N1.— P. 161-168.
8. Kasai M., Hamaguchi Y., Zhu S.E. et al. High survival of rabbit morulae after vitrification in ethylene glycol-based solution by a simple method // *Biol. Reprod.*— 1992.— Vol. 46, N6.— P. 1042-1046.
9. Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Fuller B. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes // *Cell Biol. Int.*— 2002.— Vol. 26, N11.— P. 1003-1006.
10. Kuleshova L.L., Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling // *Fertil. Steril.*— 2002.— Vol. 78, N3.— P. 449-454.

while after the application of DEPS-2 it was additionally enhanced by the damaging action of crystallization during freeze-thawing.

Conclusion

Therefore the determined mixes of DMSO, EG, 1,2-PD and sucrose prevented ice crystal formation during rapid cooling and thawing and allowed to save in great extent the viability of fibroblast-like cells. The obtained results showed the availability of vitrification for cryopreservation of fibroblast-like cells and may be used as the base for the development of cryopreservation method for tissue-engineered constructions.

References

1. Baudot A., Odagescu V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions // *Cryobiology*.— 2004.— Vol. 48, N3.— P. 283-294.
2. Bielanski A., Nadin-Davis S., Sapp T., Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen // *Cryobiology*.— 2000.— Vol. 40, N2.— P. 110-116.
3. de Graaf I.A.M., Draaisma A., Schoeman O. et al. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification // *Cryobiology*.— 2007.— Vol. 54, N1.— P. 1-12.
4. Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A. et al. Vitrifications as an approach to cryopreservation // *Cryobiology*.— 1984.— Vol. 21, N4.— P. 407-426.
5. Fujita T., Takami Y., Ezoe K. et al. Successful preservation of human skin by vitrification // *J. Burn. Care Rehabil.*— 2000.— Vol. 21, N4.— P. 304-309.
6. Heng B.C., Kuleshova L.L., Bested S.M. et al. The cryopreservation of human embryonic stem cells // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2005. — Vol 41, Pt. 2. — P. 97-104.
7. Hotamisligil S., Toner M., Powers R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol // *Biol. Reprod.*— 1996.— Vol. 55, N1.— P. 161-168.
8. Kasai M., Hamaguchi Y., Zhu S.E. et al. High survival of rabbit morulae after vitrification in ethylene glycol-based solution by a simple method // *Biol. Reprod.*— 1992.— Vol. 46, N6.— P. 1042-1046.
9. Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Fuller B. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes // *Cell Biol. Int.*— 2002.— Vol. 26, N11.— P. 1003-1006.
10. Kuleshova L.L., Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling // *Fertil. Steril.*— 2002.— Vol. 78, N3.— P. 449-454.
11. Kuleshova L. L., MacFarlane D. R., Trounson A. O. et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes // *Cryobiology*.— 1999.— Vol. 38, N2.— P. 119-130.
12. Kuleshova L.L., Shaw J.M., Trounson A.O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation // *Cryobiology*.— 2001.— Vol. 43, N1.— P. 21-31.
13. Kuleshova L.L., Wang X.W., Wu Y.N. et al. Vitrification of encapsulated hepatocytes with reduced cooling and warming rates // *Cryo-Letters*.— 2004.— Vol. 25, N4.— P. 241-254.
14. Kurata H., Takakuwa K., Tanaka K. Vitrification of hematopoietic progenitor cells obtained from human cord blood // *Bone Marrow Transplant.*— 1994.— Vol. 14, N2.— P. 261-263.

11. *Kuleshova L. L., MacFarlane D. R., Trounson A. O. et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes // *Cryobiology*.– 1999.– Vol. 38, N2.– P. 119-130.
12. *Kuleshova L.L., Shaw J.M., Trounson A.O.* Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation // *Cryobiology*.– 2001.– Vol. 43, N1.– P. 21-31.
13. *Kuleshova L.L., Wang X.W., Wu Y.N. et al.* Vitrification of encapsulated hepatocytes with reduced cooling and warming rates // *Cryo-Letters*.– 2004.– Vol. 25, N4.– P. 241-254.
14. *Kurata H., Takakuwa K., Tanaka K.* Vitrification of hematopoietic progenitor cells obtained from human cord blood // *Bone Marrow Transplant*.– 1994.– Vol. 14, N2.– P. 261-263.
15. *Kuwayama M.* Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method // *Theriogenology*.– 2007.– Vol. 67, N1.– P. 73-80.
16. *Liu B.L., McGrath J., McCabe L., Baumann M.* Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes // *Cell Preservation Technology*.– 2002.– Vol. 1, N1.– P. 33-44.
17. *Martino A., Songsasen N., Leibo S.P.* Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling // *Biol. Reprod.*– 1996.– Vol. 54, N5.– P. 1059-1069.
18. *Pegg D.E.* Viability assays for preserved cells, tissues, and organs // *Cryobiology*.– 1989.– Vol. 26, N3.– P. 212-231.
19. *Reubinoff B.E., Pera M.E., Vajta G., Trounson A.O.* Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method // *Hum. Reprod.* – 2001. – Vol.16, N10. – P. 2187-2194.
20. *Sutton R.L.* Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides // *Cryobiology*.– 1992.– Vol. 29, N5.– P. 585-598.
21. *Takahashi T., Hirsh A., Erbe E.F. et al.* Vitrification of human monocytes // *Cryobiology*.– 1986.– Vol. 23, N2.– P. 103-115.
22. *Wusteman M.C., Pegg D.E., Robinson M.P. et al.* Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties // *Cryobiology*.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 24-37.
23. *Wusteman M.C., Pegg D.E., Wang L.H., Robinson M.P.* Vitrification of ECV304 cell suspensions using solutions containing propane-1,2-diol and trehalose // *Cryobiology*.– 2003.– Vol. 46, N2.– P. 135-145
24. *Yokota Y., Sato S., Yokota M. et al.* Successful pregnancy following blastocysts vitrification: case report // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N8.– P. 1802-1803.
25. *Yoshino J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T.* Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification // *Cryobiology*.– 1993. – Vol. 30, № 4. – P. 413-422.
15. *Kuwayama M.* Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method // *Theriogenology*.– 2007.– Vol. 67, N1.– P. 73-80.
16. *Liu B.L., McGrath J., McCabe L., Baumann M.* Response of murine osteoblasts and porous hydroxyapatite scaffolds to two-step, slow freezing and vitrification processes // *Cell Preservation Technology*.– 2002.– Vol. 1, N1.– P. 33-44.
17. *Martino A., Songsasen N., Leibo S.P.* Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling // *Biol. Reprod.*– 1996.– Vol. 54, N5.– P. 1059-1069.
18. *Pegg D.E.* Viability assays for preserved cells, tissues, and organs // *Cryobiology*.– 1989.– Vol. 26, N3.– P. 212-231.
19. *Reubinoff B.E., Pera M.E., Vajta G., Trounson A.O.* Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method // *Hum. Reprod.* – 2001. – Vol.16, N10. – P. 2187-2194.
20. *Sutton R.L.* Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides // *Cryobiology*.– 1992.– Vol. 29, N5.– P. 585-598.
21. *Takahashi T., Hirsh A., Erbe E.F. et al.* Vitrification of human monocytes // *Cryobiology*.– 1986.– Vol. 23, N2.– P. 103-115.
22. *Wusteman M.C., Pegg D.E., Robinson M.P. et al.* Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties // *Cryobiology*.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 24-37.
23. *Wusteman M.C., Pegg D.E., Wang L.H., Robinson M.P.* Vitrification of ECV304 cell suspensions using solutions containing propane-1,2-diol and trehalose // *Cryobiology*.– 2003.– Vol. 46, N2.– P. 135-145
24. *Yokota Y., Sato S., Yokota M. et al.* Successful pregnancy following blastocysts vitrification: case report // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15, N8.– P. 1802-1803.
25. *Yoshino J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T.* Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification // *Cryobiology*.– 1993. – Vol. 30, № 4. – P. 413-422.

Accepted in 19.12.2006

Поступила 19.12.2006