

Сравнительный анализ устойчивости клеточных культур к различным условиям заморозки

М.Н. ШЕТВИН, Е.Л. ФИРСОВА, Т.Н. ПРИТЧИНА, И.А. СУЕТИНА, Р.Я. ПОДЧЕРНЯЕВА
ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, г. Москва

Comparative Analysis of Cell Culture Resistance to Different Freezing Conditions

M.N. SCHETVIN, E.L. FIRSOVA, T.N. PRITCHINA, I.A. SUYETINA, R.YA. PODCHERNYAIEVA
D.I. Ivanovsky R&D Institute of Virology of the Ministry of Health
and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

Существенным аспектом криоконсервирования клеточных культур является сохранение жизнеспособности клеток после размораживания. Это достигается за счет минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда и предотвращения образования очагов концентрированных солей. Однако применение криопротекторов типа глицерина в высоких концентрациях, токсичных для клеток, во многом мешает сохранению их жизнеспособности. Кроме того, хранение замороженных клеток в жидком азоте при -196°C требует специальных методов транспортировки и деконсервации.

Целью данной работы являлось изучение жизнеспособности двух перевиваемых клеточных линий: клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) и клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ) при различных условиях заморозки.

Клетки Vero и ЛЭЧ после стандартного выращивания в культуральных флаконах и снятия раствором версен-трипсина помещали в стандартную среду для криоконсервирования с использованием 10% глицерина и без него. Для замораживания клеток был использован холодильный шкаф (-20°C) и программный замораживатель «Minicool 40 PC». О жизнеспособности клеток (%) судили с помощью их подсчета в камере Горяева и по окраске трипановым синим. Подсчет клеток проводили ежедневно в течение первых 6 часов.

Нами было показано, что после применения 10% глицерина в качестве криопротектора жизнеспособность клеток при -20°C сохранялась на уровне 90–98% на протяжении всего времени наблюдения. Без глицерина через 3 ч жизнеспособность клеток Vero снижалась от 76 до 30%, а клеток ЛЭЧ – от 90 до 20%. Спустя 3 ч нахождения клеток при -20°C наблюдалась гибель обеих клеточных линий.

При хранении в жидком азоте (-196°C) через 6 ч жизнеспособность клеток сохраняется при криоконсервации с 10% глицерином как у Vero (93%), так и у клеток ЛЭЧ (95%). Без добавления глицерина уже после 3 ч жизнеспособность клеток Vero снижается до 70%, а через 6 ч она составляет 60%. Тогда как у клеток ЛЭЧ без глицерина уже через 3 ч жизнеспособность резко снижается и составляет только 10%.

Следовательно, изученные перевиваемые клеточные линии различного происхождения (Vero и ЛЭЧ) отличаются по своей чувствительности к условиям замораживания, и для консервации в жидком азоте клеток ЛЭЧ необходимо применять 10% глицерин. Для деконсервации обеих клеточных линий возможно хранение их при температуре -20°C не более 2 ч до последующего пассирования.

Important aspect in cell culture cryopreservation is to preserve post-thaw cell viability. This is achieved by minimizing the formation of intracellular ice crystals and preventing that of foci of the concentrated salts. However, the application of cryoprotectants such as glycerol in high concentrations, being toxic for cells, does not provide the complete preservation of viability. In addition, the storage of frozen cells in liquid nitrogen at -196°C requires a special technique for transportation and thawing.

This research was targeted to study the viability of two inoculated cell lines: the cells of African green monkey kidney (Vero) and human embryonic lung cells (HEL) after application of various freezing conditions.

The Vero and HEL cells after the standard culturing in cultural flasks and detaching by versene-trypsin solution were placed into the standard medium for cryopreservation with 10% glycerol and the medium without glycerol. For cell freezing we used refrigerator with -20°C and a programmable freezer Minicool 40 PC. The cells viability (%) was assessed by counting in Goryaev's chamber of cells non-stained with trypan blue. Cells were counted every hour within the first 6 hrs of storage.

We demonstrated that when using 10% glycerol as a cryoprotectant, the cell viability at -20°C remained at 90–98% level within the whole observation time. Without glycerol in 3 hrs of storage the Vero and HEL cell viability reduced from 76 to 30 and from 90 to 20%, correspondingly. After cell storage at -20°C we observed a death of both cell lines in 3 hours.

After storage in liquid nitrogen (-196°C) during 6 hrs the cell viability was preserved if the cells were cryopreserved in media with 10% glycerol both in case of Vero (93%) and HEL (95%) cells. Without glycerol already in 3 hrs the Vero cell viability decreased down to 70%, and after 6 hours it made 60%. HEL cell viability sharply decreased and made only 10% in 3 hrs if cells were stored without glycerol.

Consequently, the studied inoculated cell lines (Vero and HEL) differ by their sensitivity to freezing conditions. HEL cell preservation into liquid nitrogen is provided in the case of application of 10% glycerol. During thawing of both cell lines it is possible to store them at -20°C for up to 2 hours prior to following passage.