

Простой и экономичный метод криоконсервации экспериментальных клеточных объектов

Л.Т. ВОЛОВА, В.В. РОССИНСКАЯ, Т.В. ЯЦЕНКО, В.В. БОЛТОВСКАЯ
Самарский государственный медицинский университет

Simple and Cost-Effective Method for Experimental Cell Object Cryopreservation

L.T. VOLOVA, V.V. ROSSINSKAYA, T.V. YATSENKO, V.V. BOLTOVSKAYA
Samara State Medical University, Russia

Цель работы – отработка и внедрение простого и экономичного способа криоконсервации клеточных культур.

Исследования проводили на клеточных культурах дермальных фибробластов и фибробластоподобных клеток из стромы гиалинового хряща человека и животных. Материалом для получения клеток служили: крайняя плоть мальчиков 3–14 лет, полученная при операции циркумцизии; абортный материал; кожа новорожденных крысят; суставной гиалиновый хрящ взрослых кроликов. Криоконсервацию выполняли в жидком азоте в сосуде Дьюара (полезный объем 6 л) с 6 цилиндрами. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) марки “хч” в концентрации 5 % от общего объема замораживаемой суспензии. Сравнивали два варианта среды для замораживания клеток: с содержанием сыворотки эмбрионов коров 20% (1 серия) и 70% (2 серия). Клетки замораживали в экспоненциальной и стационарной фазе роста. Культуру клеток криоконсервировали в два этапа: криопробирки помещали в морозильную камеру (–70°C) на 24 ч, затем погружали в жидкий азот для длительного хранения. Исследования проводили в течение 2 лет, при этом первые 6 месяцев культуры размораживали раз в месяц, затем раз в 2 месяца. Всего проведено 254 эксперимента. Состояние культур до и после криоконсервации оценивали при помощи морфологических и морфометрических методов.

Изучение морфофункциональных характеристик клеток после размораживания показало, что при криоконсервации в жидком азоте и использовании в качестве протектора ДМСО лучшие результаты во всех исследованных культурах достигаются во 2-й серии экспериментов (содержание сыворотки в среде для замораживания 70%). В этом случае количество жизнеспособных клеток остается постоянным и составляет 86,7±4,9% в течение всего срока эксперимента. В 1-й серии с содержанием сыворотки 20 % этот показатель сохранялся высоким в течение первых 4 месяцев, после чего интенсивно снижался и к концу второго года составил 48,4±2,1 %. Клетки всех исследованных культур после размораживания сохраняли форму, размеры, ядерно-цитоплазматические отношения, скорость удвоения и плотность монослоя.

Таким образом, использованный нами метод не требует специальной дорогостоящей аппаратуры, эффективен для криоконсервации различных видов культур клеток.

Our research aim was to master and introduce a simple and cost-effective way for cell culture cryopreservation.

Research was carried-out in cell cultures of dermal fibroblasts and fibroblast-like cells from human and animal hyaline cartilage stroma. Cells were procured from the following materials: preputium of 3–15 years' old boys, obtained after circumcision operation; abortive material; newborn rat's skin; joint hyaline cartilage of mature rabbits. Cryopreservation was performed in liquid nitrogen in Dewar vessel (6 l net volume) with 6 cylinders. “Chemically pure” graded dimethyl sulfoxide (DMSO) in 5% concentration of total volume of frozen suspension was used as cryoprotectant. We compared two variants of medium for cell freezing: with 20 and 70% bovine embryo serum (1 and 2 series, correspondingly). Cells were cryopreserved in both exponential and stationary growth phases. Cell culture was cryopreserved in two steps: cryovials were placed in a freezing chamber (–70°C) for 24 hrs, then immersed into liquid nitrogen for a long-term storage. Research was realized within 2 years, herewith the cultures were thawed once per month within the first 6 months, then once per 2 months. There were carried-out 254 experiments in total. Culture state prior to and after cryopreservation was morphologically and morphometrically assessed.

Study of cell morphofunctional characteristics after thawing has demonstrated that under cryopreservation in liquid nitrogen and with DMSO as cryoprotectant the highest results in the whole studied cultures were obtained in the 2nd experimental series (70% serum content in freezing medium). In this case the amount of viable cells remains constant and makes 86.7±4.9% within all experimental term. In the 1st series (20% serum content) this index remained high within the first 4 months, then intensively reduced and was 48.4±2.1% to the second year termination. Cells in all studied cultures after thawing preserved the shape, size, nuclear and cytoplasm ratios, doubling rate and monolayer density.

Thus, the method we used does not require a special expensive equipment, being efficient for different cell culture cryopreservation.