

УДК 611.013.395.085.23:615.014.41

В.В.ТИМОН, Т.Ф. ПЕТРЕНКО*, Е.И. ГОНЧАРУК

Криоконсервирование культуры фибробластов эмбрионов человека

UDC 611.013.395.085.23:615.014.41

V.V. TIMON, T.F. PETRENKO*, E.I. GONCHARUK

Cryopreservation of Human Fetal Fibroblast Culture

Исследовали криопротекторные свойства 1,2-пропандиола (1,2-ПД), оксиэтилированного глицерина (ОЭГ; n=5) и эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота при замораживании-оттаивании клеток культуры фибробластов эмбрионов человека (ФЭЧ). Установлено, что 1,2-ПД и ОЭГ обладают слабыми криозащитными свойствами и не обеспечивают сохранность функциональной активности клеток ФЭЧ. Криоконсервирование клеток в ЭС обеспечивало максимальную сохранность клеток и их функциональную активность.

Ключевые слова: культура фибробластов эмбрионов человека, 1,2-пропандиол, оксиэтилированный глицерин.

Досліджували криопротекторні властивості 1,2-пропандіола (1,2-ПД), оксиетильованого гліцерину (ОЕГ; n=5) та ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби при заморожуванні-відтаванні клітин культури фібробластів ембріонів людини. Встановлено, що 1,2-ПД і ОЕГ мають слабкі криозахисні властивості і не забезпечують збереженість функціональної активності клітин ФЕЧ. Криоконсервування клітин в ЕС забезпечувало максимальну збереженість клітин і їх функціональну активність.

Ключові слова: культура фібробластів ембріонів людини, 1,2-пропандіол, оксиетильований гліцерин.

Cryoprotective properties of 1,2-propanediol (1,2-PD), oxyethylated glycerol (OEG; n=5) and fetal calf serum (FCS) when freeze-thaw human fetal fibroblast (HFF) culture were studied. It has been established that 1,2-PD and OEG have weak cryoprotective properties and do not provide the integrity of functional activity of HEF cells. Cell cryopreservation in FCS provided maximum integrity of cells and their functional activity.

Key-words: human fetal fibroblast culture, 1,2-propanediol, oxyethylated glycerol, cryopreservation.

Основная задача криоконсервирования биологического материала – сохранение максимального количества жизнеспособных клеток со свойствами, присущими нативным клеткам. Важным фактором обеспечения сохранности является правильный выбор криопротектора, который по своим свойствам должен отвечать следующим требованиям: быть нетоксичным для клеток, обладать необходимыми защитными свойствами, легко удаляться из среды криоконсервирования и т.д. [3]. При выборе криопротектора для препаратов, используемых для клеточной и тканевой терапии, целесообразно применять такие вещества, которые соответствовали бы этим требованиям, а также позволяли бы упростить процедуру трансплантации клеток.

При криоконсервировании эмбриональных клеток, полученных из тканей различного происхождения, наиболее широко используется диметилсульфоксид (ДМСО) [2, 11-15], но данные [5] свидетельствуют, что при длительном контакте ДМСО с клетками происходят нарушения прони-

A basic task of cryopreservation of biological material is preserving the maximum amount of viable cells with unchanged properties inherent to native cells. Important factor of providing the safety is a correct choice of cryoprotectant which on the properties meets the following requirements: to be non-toxic for cells, to possess necessary protective properties, to be easily removed out of cryopreservation medium, etc. [3]. When selecting a cryoprotectant for the preparations to be used for cell and tissue therapy, it is expedient to apply the solution, which could correspond to the declared requirements, and also would allow the simplifying of cell transplantation procedure.

During cryopreservation of embryonic cells derived from the tissues derived from the tissues of different origin dimethylsulfoxide (DMSO) is the most widely used [2, 11-15], but the data [5] indicate that its long-term contact with cells results in the impairment of permeability of their membrane and to considerable changes in metabolism and their death. During transplantation of cell suspension comprising DMSO a manifested toxic effect is found [14].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-11, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

цаемости мембран и значительные изменения метаболизма клеток, что приводит к их гибели. При трансплантации суспензии клеток, содержащей ДМСО, отмечается выраженный токсический эффект [14].

Большой интерес для практической медицины представляют криозащитные вещества, не оказывающие выраженного токсического действия на клетки. Одним из таких веществ является 1,2-пропандиол (1,2-ПД), обладающий низкой токсичностью [7, 8] и не требующий отмывки. Он используется в фармацевтической практике как растворитель лекарственных средств [6], для криоконсервирования эритроцитов и перевиваемых клеточных линий [2-4]. Оксипропилированный глицерин (ОЭГ) (n=5) также является низкотоксичным веществом, не требующим отмывки [12].

Криозащитными свойствами обладает и сыворотка крови – она стабилизирует мембрану, защищая её от криоповреждений [11, 16].

Цель работы – изучение цитотоксического действия и криопротекторных свойств ОЭГ (n=5), 1,2-ПД и ЭС для культуры фибробластов эмбрионов человека (ФЭЧ).

Материалы и методы

Исследования проводили на культуре фибробластов человека 3-4 пассажа, полученной из эмбрионов 7-9 недель гестации. Культивирование выполняли по стандартной методике в пластиковых чашках Петри (Spectar, Югославия), инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ (Sanyo, Япония) [1, 9].

Исследуемые криопротекторы ОЭГ и 1,2-ПД были синтезированы, очищены в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины.

Для оценки токсического действия исследуемых веществ и их криопротекторных свойств клетки переводили в суспензионное состояние, обрабатывая монослой смесью растворов Версена и 0,25% трипсина (оба ГУП ИПВЭ им. М.П.Чумакова РАМН) (1:1). Клетки суспендировали в растворе Хенкса в концентрации 2×10⁶/мл. Растворы криопротекторных веществ готовили *ex tempore* на растворе Хенкса в концентрациях 10, 20, 30 и 40%. К суспензии клеток добавляли равный объем приготовленных растворов, доводя до конечной концентрации 5, 10, 15 и 20%. При изучении токсического действия ЭС (HyClone) на клетки использовали 20, 50%-е концентрации в растворе Хенкса и сыворотку без добавок. Токсическое действие исследуемых веществ изучали при температуре 20±1°C на протяжении 1 часа, подсчитывая количество жизнеспособных клеток через каждые 15 мин с использованием окраски трипановым синим [10].

Of great interest for practical medicine are cryoprotective properties not rendering expressed toxic effect on cells. One of these substances is 1,2-propane diol (1,2-PD) having low toxicity and not demanding the washing-out [7, 8]. It is used in pharmaceutical practice as a solvent of medicines [6] for cryopreservation of erythrocytes and inoculated cell lines [2-4]. Oxyethylated glycerol (OEG) (n=5) is also low toxic substance not requiring the washing-out [12].

Cryoprotective properties are also inherent also to blood serum – it stabilizes the membrane thus protecting it from cryodamage.

Research aim is the studying of cytotoxic effect and cryoprotective properties of OEG (n=5), 1,2-PD and ES for human fetal fibroblast (HFF) culture.

Materials and methods

The researches were carried-out in human fibroblast culture of 3-4 passages, obtained from the embryos of the 7-9th weeks of gestation. Culturing was conducted by the standard methods in plastic Petri dishes (Spectar, Yugoslavia) and kept at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in incubator(Sanyo, Japan) [1, 9].

OEG and 1,2-PD cryoprotectants under study were synthesized, purified at the Department of cryoprotectants of the IPC&C of the National Academy of Sciences.

For estimation of toxic effect of the studied substances and their cryoprotective properties the cells were transferred into suspension state by treating the monolayer with the mixture of Versen's solutions and 0.25 % trypsin (1:1) (both by M.N. Chumakov's Institute for Poliomyelitis and Virus Encephalitis of Russian Academy of Medical Sciences). The cells were suspended in Hanks solution to concentration of 2×10⁶/ml. The solutions of cryoprotective substances were prepared *ex tempore* with Hanks solution under concentrations of 10, 20, 30 and 40%. The equal volume of prepared solutions was added to cell suspension to reach final concentrations of 5, 10, 12 and 20%. When studying the toxic effect of FCS (HyClone) on cell viability there were used 20, 50% of concentrations in Henk's medium and 100% serum. Toxic effect of the studied substances was studied at 20±1°C for 1 hr by counting the number of viable cells every 15 min using trypan blue staining [10].

During investigation of cryoprotective properties of 1,2-PD, OEG and FCS the cell suspension with concentration of 1×10⁶/ml was placed into 1 ml cryovials (Nunc). After 15-min equilibration with cryoprotectants the samples were frozen.

Cryopreservation was conducted by the three-stage program with programmable freezer (Special Designing and Technical Bureau at the IPC&C) after 15 min equilibration with cryoprotectant. At the first stage the cells were cooled with the rate of 1°C/min down to

При изучении криопротекторных свойств 1,2-ПД, ОЭГ и сыворотки суспензию клеток с концентрацией 1×10^6 /мл помещали в криоампулы (Nunc) объёмом 1 мл. После 15-минутной эквilibрации с криопротекторами пробы замораживали.

Криоконсервирование проводили по трёхэтапной программе в программном замораживателе (СКТБ с ОП ИПКиК НАНУ). Клетки охлаждали на первом этапе со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -20°C , на втором – со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -80°C , на третьем – погружали в жидкий азот [10].

Образцы отогревали на водяной бане при температуре 41°C . После отогрева суспензию клеток отмывали от криопротектора, высевали в чашки Петри и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . За ростом клеток в культуре ежедневно наблюдали с помощью инвертированного бинокулярного микроскопа Биолам П2 (ЛОМО).

Жизнеспособность клеток после криоконсервирования оценивали по окрашиванию витальным красителем трипановым синим [1], сохранность пролиферативных свойств клеток – по сроку формирования монослоя [9].

Контролем служила нативная суспензия клеток культуры ФЭЧ.

Статистическую достоверность различий между группами оценивали методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что при эквilibрации клеток в растворе Хенкса с ОЭГ в концентрациях 5, 10, 15 и 20% показатели жизнеспособности клеток достоверно не изменялись. Через 120 мин количество жизнеспособных клеток составляло $90 \pm 1,5\%$, что достоверно не отличалось от контроля.

В суспензиях клеток в растворе Хенкса с добавлением 5, 10 и 15% 1,2-ПД количество жизнеспособных клеток оставалось на том же уровне, что и в контрольных образцах в течение всего времени наблюдения. При повышении содержания 1,2-ПД до 20%, начиная с 15-й минуты, количество жизнеспособных клеток снижалось до $78,0 \pm 1,9\%$, а к концу эквilibрации до $60,0 \pm 1,2\%$ (рис. 1).

При этом наблюдали морфологические изменения клеток в виде наличия везикул разных размеров, что является ответной реакцией клеток на неблагоприятные условия. Данные морфологические изменения имели временный характер и исчезали через 60-120 мин после удаления криопротектора из среды, но часть клеток все же погибала, о чем свидетельствовало снижение количества жизнеспособных клеток в суспензии.

Для поддержания оптимального роста клеток неотъемлемой частью ростовой среды является

-20°C , at the second stage – with the rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$ to -80°C with following plunging into liquid nitrogen [10].

The samples were thawed on water bath at 41°C . After thawing the cell suspension was washed-out of cryoprotectant, seeded into the Petri dishes and incubated at 37°C on air with 5% CO_2 . Cell growth in culture was monitored daily with the help of inverted binocular microscope Biolam P2 (LOMO, Russia).

Viable cells before and after cryopreservation were estimated by staining of trypan blue vital dye [1], the integrity of proliferative properties of cells was done on the term of monolayer formation [9].

Native suspension of HFF culture cell served as the control.

The significance of the changes between groups was estimated using Student's method.

Results and discussion

It was established that during equilibration of cells in Henk's solution with OEG under concentrations of 5, 10, 15 and 20% the cell viability index significantly and statistically did not change. In 120 min the number of viable cells made $90 \pm 1.5\%$ that did not differ from the control.

In the cell suspensions in Hanks solution with adding 5, 10 and 15% 1,2-PD the number of viable cells remained at the same level if compared with the control samples within the observation time. With a rise in 1,2-PD content up to 20% starting from the 15th min, the amount of viable cells decreased down to $78 \pm 1.9\%$ and to the end of equilibration down to $60 \pm 1.2\%$ (Fig. 1).

Herewith, morphological changes in cells were observed as presence vesicles of different sizes, that we believe is a response of cells to unfavourable conditions. These morphological changes were temporal and disappeared 60-120 min after the removal of cryoprotectant out of the medium, but the part of cells died that was confirmed with the reduced concentration of viable cells in suspension.

Fetal calf serum is an integral part of growth medium to maintain an optimal cell growth. Adding of 5-20% FCS provides necessary conditions for the growth and proliferation of HFF cells. Cell contact with 50 and 100% FCS may have a toxic effect [9].

It has been established that the used FCS did not render cytotoxic effect on HFF independently of its percent content that was confirmed with the absence of significant differences of cell viability with the control values.

In the experimental series on cryopreservation with OEG and 1,2-PD there were used concentrations not rendering the toxic effect on cells (5; 10 and 15%) as well as FCS under concentrations of 20, 50, and 100%.

ЭС. Добавление 5-20% ЭС обеспечивает необходимые условия для роста и пролиферации клеток ФЭЧ. Контакт клеток с 50% и 100% сывороткой может оказывать токсическое действие [9].

Было установлено, что используемая сыворотка не оказывала цитотоксического действия на клетки ФЭЧ независимо от ее процентного содержания, о чем свидетельствовали показатели жизнеспособности клеток, достоверно не отличающиеся от контроля.

В серии экспериментов по криоконсервированию с ОЭГ и 1,2-ПД были использованы концентрации, не оказывающие токсического действия на клетки (5; 10 и 15%), а также ЭС в концентрациях 20, 50 и 100%.

Введение в среду консервирования 1,2-ПД в концентрациях 5, 10 и 15% обеспечивало максимальную сохранность клеток ($86 \pm 3,2\%$) при замораживании ФЭЧ, достоверных различий в показателях жизнеспособности между образцами, замороженными под защитой этого криопротектора в указанных концентрациях, и показателями контроля не отмечалось (рис. 2).

При использовании в качестве криопротектора ОЭГ в концентрациях 5, 10 и 15% количество сохраненных клеток составляло $4,2 \pm 0,5$, $17,1 \pm 1,4$ и $23,5 \pm 2,2\%$ соответственно, что достоверно ниже контрольных показателей.

Криоконсервирование клеток в растворе Хенкса с 20% ЭС обеспечивало сохранность $33,1 \pm 2,9\%$ клеток. При повышении концентрации ЭС до 50% количество жизнеспособных клеток увеличивалось в 1,7 раза и составляло $55,4 \pm 4,9\%$. Однако эти показатели были достоверно ниже контрольных. При криоконсервировании клеток в 100% ЭС количество жизнеспособных клеток составляло $87,3 \pm 3,4\%$, что не отличалось от контроля.

Сравнительная оценка пролиферативных свойств клеток, замороженных под защитой 1,2-ПД, ОЭГ и ЭС с контрольной культурой показала, что при культивировании криоконсервированных образцов формирование моноослой запаздывало, а в некоторых случаях моноослой не образовывался.

Нативная культура формирует моноослой на 3-4-е сутки. При культивировании клеток после криоконсервирования с 1,2-ПД в концентрациях 5, 10 и 15% формирование моноослой происходило на 8-9-е сутки, что на 4-5 суток позже, чем в контроле. Такое запаздывание формирования моноослой связано с тем, что уже на начальных этапах культивирования половина клеток из посеянных не прикреплялась к субстрату. Высокие показатели жизнеспособности при витальном окрашивании не подтверждаются данными по пролиферативной активности.

Культивирование клеток после криоконсервирования с ОЭГ в исследуемых концентрациях

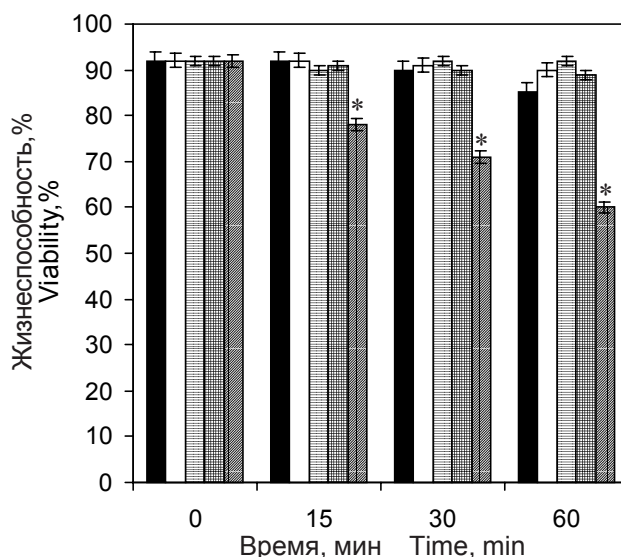


Рис. 1. Жизнеспособность клеток культуры ФЭЧ (n=6) после экспозиции в растворах 1,2-ПД: ■ – контроль; □ – 5%; ▤ – 10%; ▥ – 15%; ▧ – 20%; * – статистически достоверные различия с контрольными показателями, $P < 0,05$.

Fig. 1. Viability of HFF culture (n=6) after exposure to the following solutions: ■ – Hanks solution; □ – 5% 1,2-PD; ▤ – 10% 1,2-PD; ▥ – 15% 1,2-PD; ▧ – 20% 1,2-PD; * – significant differences as compared with control data, $P < 0.05$

Introduction of 1,2-PD into the medium under concentrations of 5, 10 and 15% provided the maximum integrity of cells ($86 \pm 3.2\%$) during freezing of HFF, no statistically significant differences in viability data between the samples frozen with this cryoprotectant under the concentrations mentioned and the control were found (Fig. 2).

When using OEG as a cryoprotectant under 5, 10 and 15% concentrations the cell survival index made 4.2 ± 0.5 , 17.1 ± 1.4 and $23.5 \pm 2.2\%$, correspondingly that was significantly lower than the control values.

Cell cryopreservation in Hanks solution with 20% FCS provided the integrity of $33.1 \pm 2.9\%$ cells. When increasing FCS concentration up to 50% the number of viable cells enhanced in 1.7 times and made $55.4 \pm 4.9\%$. However these indices were statistically and significantly lower than the control ones. During cell cryopreservation in 100% FCS the cell viability made $87 \pm 3\%$, that did not differ from the control.

Comparative estimation of proliferative properties of cells frozen with 1,2-PD, OEG and FCS with the control culture has shown that during culturing of frozen-thawed samples the formation of monolayer was delayed and in some cases the monolayer was not formed.

Native culture forms the monolayer to the 3-4th day. During culturing of cells after cryopreservation with 1,2-PD under concentrations of 5, 10 and 15% the monolayer formation occurred to the 8-9th day that was 4-5 days later than in the control. This delay in monolayer formation is related to the fact that even at early stages of culturing the half of cells of those

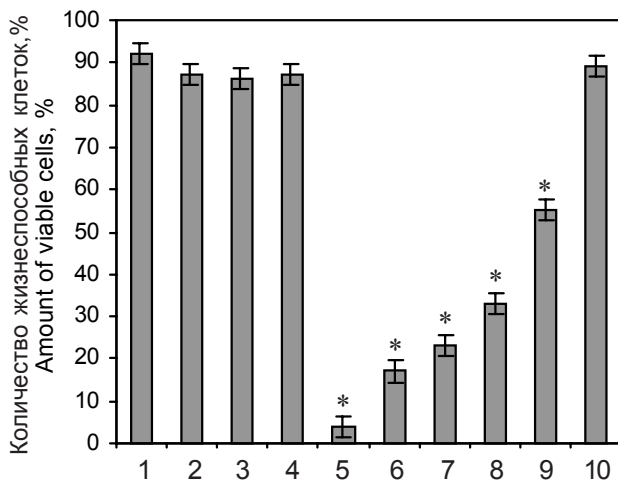


Рис. 2. Показатели жизнеспособности клеток после криоконсервирования (n=4): 1 – контроль; 2 – 5% 1,2-ПД; 3 – 10% 1,2-ПД; 4 – 15% 1,2-ПД; 5 – 5% ОЭГ; 6 – 10% ОЭГ; 7 – 15% ОЭГ; 8 – 20% ОЭГ; 9 – 50% ЭС; 10 – ЭС; * – статистически достоверные различия с контрольными показателями, P<0,05.

Fig. 2. Indices of cell viability after cryopreservation (n=4): 1 – control; 2 – 5% 1,2-PD; 3 – 10% 1,2-PD; 4 – 15% 1,2-PD; 5 – 5% OEG; 6 – 10% OEG; 7 – 15% OEG; 8 – 20% OEG; 9 – 50% FCS; 10 – FCS; * – significant differences comparing to the control values, P<0.05.

показало, что клетки утратили адгезивные свойства и способность к пролиферации.

Клетки после криоконсервирования с ЭС отставали в росте от контроля на 3-4 суток, но на 6-7-е сутки формировался плотный монослой (рис.3).

Принцип защитных свойств сыворотки, вероятно, основан на её сходстве с криопротекторами смешанного типа, действие которых связано влиянием низко- и высокомолекулярных фракций вещества. Таким образом, сыворотка может использоваться не только как дополнение к среде для криоконсервирования с криопротектором, но и как самостоятельная альтернативная среда. Эти данные имеют практическое значение, так как позволяют предположить возможность использования сыворотки пациента для криоконсервирования аутоклеток при отдалённой по сроку трансплантации. Высокая жизнеспособность клеток после криоконсервирования и отсутствие необходимости в отмывке клеток после отогрева позволяют создать новый клеточный препарат.

Выводы

При использовании трехэтапного метода криоконсервирования клеток культуры фибробластов эмбрионов человека с 15-минутной экспозицией в растворе криопротекторов отмечено, что оксиэтилированный глицерин (n=5) не обладает криопротекторными свойствами, обеспечивающими сохранение пролиферативной активности клеток ФЭЧ. 1,2-пропандиол сохраняет целостность

inoculated were not adhered to substrate. High indices of viability at vital staining are not confirmed with the data on proliferative activity.

Cell culturing after cryopreservation with OEG in the studied concentrations have shown that the cells lost adhesive properties and ability for proliferation.

The cells after cryopreservation with FCS are also retarded in growth from the control by 3-4 days, but to the 6-7 days a dense monolayer was formed (Fig. 3).

Principle of serum protective properties, is likely based on its similarity with cryoprotectants of miscellaneous type, the action of which is related to a combined influence of low-molecular and high-molecular substance fractions. Thus the serum can be used not only as supplement to the medium for cryopreservation with a cryoprotectant, but also as independent alternative medium. These data are of practical value as they allow to suppose the opportunity of using the patient serum for autological cryopreservation at distant on the term transplantation. High cell viability after cryopreservation and the absence of the need in washing of cells after thawing allows to create the new cell preparation.

Conclusions

When using the three-step cryopreservation method for culture of human fetal fibroblasts with 15 min exposure to cryoprotectant solution it was established that oxyethylated glycerol (n=5) has no cryoprotective properties providing the preservation of proliferative activity of HFF cells. 1,2-propane diol preserve the integrity of cell plasma membrane but does not provide a preservation of proliferative properties of HFF cells. Fetal calf serum has cryoprotective properties, providing high functional activity of HFF after freeze-

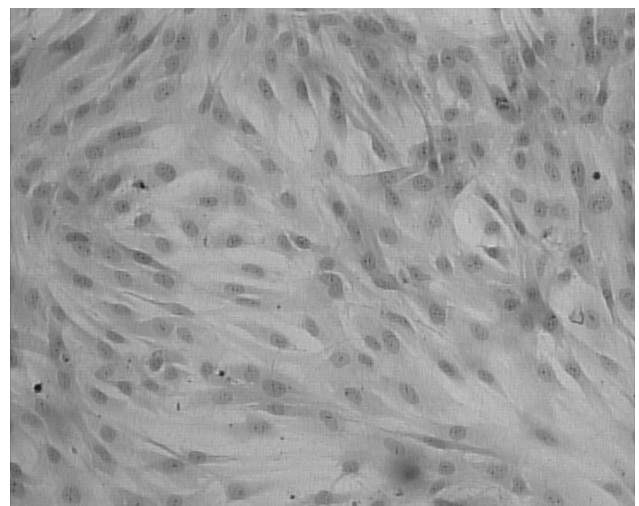


Рис. 3. Культура ФЭЧ после криоконсервирования с ЭС (7-8 сутки культивирования). Окраска гематоксилин-эозин, ×300.

Fig. 3. HFF culture after cryopreservation with FCS (7-8 days of culturing). Staining with hematoxylin-eosin, ×300.

плазматической мембраны, однако не обеспечивает сохранность пролиферативных свойств ФЭЧ. Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота обладает криопротекторными свойствами, сохраняя высокую функциональную активность клеток ФЭЧ после криоконсервирования и может применяться для замораживания культуры ФЭЧ без дополнительных синтетических веществ.

Авторы искренне благодарят зав. отделом криопротекторов ИПКиК НАН Украины д.м.н. А.М. Компаниец за предоставленные криопротекторы.

Литература

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков.– М.: Мир, 1983.– 264 с.
2. *Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С.* Криоконсерванты.– Киев: Наук. думка, 1979.– 100 с.
3. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 200 с.
4. *Верховская Л.З., Олейник С.Т.* Криоконсервирование постоянных клеточных линий с применением 1,2-пропандиола // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. научных трудов.– Харьков, 1990.– С. 21-24.
5. *Глушко Т.А.* Особенности пролиферации клеточных культур после контакта с криопротекторами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 14 с.
6. *Гучок В.М., Зборовская Э.А.* О токсичности α -пропиленгликоля // Криобиология.– 1981.– №8.– С. 46-49.
7. *Кравченко Л.П., Кареева Л.В.* Применение 1,2-пропандиола для криоконсервирования изолированных клеток печени // Тезисы докладов второй Всесоюзной конференции "Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов".– Т. 1.– Харьков, 1984.– С. 42.
8. *Куртова А.В., Зуева Е.Е., Фрегатова Л.М.* Методы банкирования пуповинной крови // Иммунология.– 2005.– Т. 6.– С. 577-591.
9. *Культура животных клеток. Методы* / Под ред. Р. Френши.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
10. *Методы культивирования клеток.* Сб. научных трудов / Под. ред. Г.П. Пинаева.– Л.: Наука, 1988.– 287 с.
11. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
12. *Чеканова В.В., Ханина Л.А., Луговой В.И., Петренко Т.Ф.* Цитотоксичность и криопротекторная активность оксиэтилированных амидов при криоконсервировании перевиваемой культуры // Пробл. криобиологии.– 1995.– №1.– С. 37-41.
13. *Dhodapkar M., Goldberg S.L., Tefferi A., Gertz M.A.* Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral stem cell infusion // *Am. J. Hematol.*– 1994.– Vol. 45, N2.– P. 187-188.
14. *Corsini J., Hacker C., Bare C.* Serum-free cryopreservation of five mammalian cell lines in either a pelleted or suspended state // *Biol. Proced. Online.*– 2004.– Vol. 6.– P. 61-66.
15. *Hubel A.* Cryopreservation of HPCs for clinical use // *Transfusion.*– 2001.– Vol. 41, N5.– P. 579-580.

Поступила 31.10.2006

thawing and can be used for HFF culture cryopreservation without synthetic additives.

Authors express their sincere gratitude to the head of Department of Cryoprotectants at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Dr. A.M. Kompaniets for cryoprotectant providing.

References

1. *Adams R.* Cell culture for biochemists.– Moscow: Mir, 1983.– 264 p.
2. *Belous A.M., Shargo M.I., Pushkar N.S.* Cryopreservatives.– Kiev: Naukova dumka, 1979.– 100 p.
3. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev. Naukova dumka, 1994.– 200 p.
4. *Verhovskaya L.Z., Oleynik S.T.* Cryopreservation of permanent cell lines with the use of 1,2-propanediol // Physical and chemical properties and biological action of cryo-protectant. Collection of scientific papers.– Kharkov, 1990.– P. 21-24.
5. *Glushko T.A.* Peculiarities of proliferation of cell cultures after a contact with cryoprotectants: Author's abstract of the cand. of biol. sciences.– Kharkov, 1986.– 14 p.
6. *Guchok V.M., Zborovskaya E.A.* About toxicing of α -propylene glycol // *Kriobiologiya.*– 1981.– N8.– P. 46-49.
7. *Kravchenko L.P., Kareva L.V.* Application of 1,2-propane diol for cryopreservation of isolated liver cells // Proc. the Second All-Union Conference "Mechanisms of Cryodamage and Cryoprotection of Biological Objects".– Vol. 1.– Kharkov, 1984.– P. 42.
8. *Kurtova A.V., Zueva E.E., Fregatova L.M.* Methods of cord blood banking // *Immunologia.*– 2005.– Vol. 6.– P. 577-591.
9. *Animal's cell culture. Methods* / Ed. by R. Frenshi.– Moscow: Mir, 1989.– 333 p.
10. *Methods of cell culturing.* Collection of scientific works / Ed. by G.P. Pinaev.– Lvov: Nauka, 1988.– 287 p.
11. *Pushkar N.S., Shargo M.I., Belous A.M., Kalugin J.V.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1978.– 204 p.
12. *Chekanova V.V., Khanina L.A., Lugovoy V.I., Petrenko T.F.* Cytotoxicity and cryoprotectants activity of oxyethylated amide under cryopreservation of inoculated culture // *Problems of Cryobiology.*– 1995.– N1.– P. 37-41.
13. *Dhodapkar M., Goldberg S.L., Tefferi A., Gertz M.A.* Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral stem cell infusion // *Am. J. Hematol.*– 1994.– Vol. 45, N2.– P. 187-188.
14. *Corsini J., Hacker C., Bare C.* Serum-free cryopreservation of five mammalian cell lines in either a pelleted or suspended state // *Biol. Proced. Online.*– 2004.– Vol. 6.– P. 61-66.
15. *Hubel A.* Cryopreservation of HPCs for clinical use // *Transfusion.*– 2001.– Vol. 41, N5.– P. 579-580.

Accepted in 31.10.2006