

Жизнеспособность клеток после экспозиции и быстрого замораживания-отогрева в многокомпонентных витрифицирующих растворах

Н.А. ГОРОХОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cell Viability After Exposure and Rapid Freeze-Thawing in Polycapnent Vitrifying Solutions

N.A. GOROKHOVA

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

Ранее были определены растворы, включающие ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозу, которые при быстром замораживании и отогреве не образовывали кристаллов льда (Горохова Н.А., 2006). Применение этих растворов для криоконсервирования клеточных суспензий методом витрификации требует изучения их влияния на жизнеспособность клеток.

Цель работы – определить жизнеспособность эмбриональных фибробластоподобных клеток после экспозиции в витрифицирующих растворах и последующего быстрого замораживания-отогрева.

В работе использовали растворы ДЭПС-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% 1,2-ПД и 0,5 М сахарозы) и ДЭПС-2 (10% ДМСО, 15% ЭГ, 15% 1,2-ПД и 1М сахарозы). Витрифицирующий раствор добавляли к суспензии эмбриональных фибробластоподобных клеток при комнатной температуре в два этапа. Замораживание-отогрев образцов объемом 0,5 мл проводили в стандартных криопробирках Corning, которые помещали в жидкий азот и хранили в течение 24 ч, после чего отогревали на водяной бане при 40°C. Для удаления криозащитной среды использовали двухэтапное (способ 1) или одноэтапное (способ 2) отмывание. Сохранность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим, жизнеспособность – по эффективности прикрепления клеток к поверхности пластика и характеру поведения в условиях культивирования.

В контрольной группе сохранность эмбриональных фибробластоподобных клеток составляла 90,3±2,9%, а эффективность прикрепления в течение 24 ч культивирования – 96,9±1,2%. После экспозиции клеток в растворе ДЭПС-1 и удаления криозащитной среды их сохранность составляла 71,7±2,1% при первом способе отмывания и 78,3±2,5% - при втором, а эффективность прикрепления – 75,6±6,5 и 72,9±6,2% соответственно. После экспозиции клеток в растворе ДЭПС-2 сохранность составляла 71,8±2,6 и 78,4±3,5%, а эффективность прикрепления – 80,2±2,1 и 69,5±7,6% соответственно. После замораживания-отогрева в среде ДЭПС-1 сохранность клеток не изменялась, а в ДЭПС-2 снижалась в 1,7 раза при использовании обоих способов отмывания. Эффективность прикрепления после замораживания-отогрева под защитой ДЭПС-1 снижалась на 20%, а ДЭПС-2 – на 35% по отношению к данному показателю после экспозиции. Клетки, криоконсервированные под защитой ДЭПС-1, проявляли большую способность к распластыванию и пролиферации.

We have previously determined the DMSO, EG, 1,2-PD and sucrose-containing solutions without forming ice crystals under rapid freeze-thawing (N.A. Gorokhova, 2006). Applying these solutions for cell suspension cryo-preservation using the vitrification method requires studying their effect on cell viability.

This research was aimed to determine the viability of embryonic fibroblast-like cells after exposure in vitrifying solutions and following rapid freeze-thawing.

The DEPS-1 (10% DMSO, 20% EG, 20% 1,2-PD and 0.5 M sucrose) and DEPS-2 (10% DMSO, 15% EG, 15% 1,2-PD and 1 M sucrose) solutions have been used in this research. Vitrifying solution was added into an embryonic fibroblast-like cell suspension in two-step at room temperature. Samples with 0.5 ml volume were frozen-thawed in Corning standard cryovials, placed into liquid nitrogen and stored for 24 hrs, then thawed on water bath at 40°C. Either two-step (way 1) or one-step washing-out procedures were applied for cryoprotective medium removal. Cell integrity was assessed by trypan blue staining and the viability was done by cell attachment efficiency to a plastic surface and behaviour character under culturing.

In the control group the integrity of embryonic fibroblast-like cells made 90.3±2.9%, and the attachment efficiency within 24 hrs of culturing was 96.9±1.2%. After cell exposure in DEPS-1 solution and cryoprotective medium removal using the first and second washing-out ways the cell integrity was 71.7±2.1 and 78.3±2.5%, correspondingly, but the attachment efficiency was 75.6±6.5 and 72.9±6.2%, correspondingly. After cell exposure in DEPS-2 solution the integrity was 71.8±2.6 and 78.4±3.5% and the attachment efficiency was 80.2±2.1 and 69.5±7.6%, respectively. After freeze-thawing in DEPS-1 solution the cell integrity was unchanged but reduced in 1.7 times in DEPS-2 when using both washing-out ways. The attachment efficiency after freeze-thawing under DEPS-1 and DEPS-2 protections reduced by 20 and 35%, correspondingly, in respect to this index after exposure. The cells cryopreserved under DEPS-1 protection manifested higher flattening and proliferative ability.