

Применение метилцеллюлозы для криоконсервирования перевиваемых клеток в бессывороточной среде

С.В. КОШИЙ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, В.Ф. МАРЦЕНЮК, Т.М. ГУРИНА, Л.В. СОКОЛ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Methylcellulose for Cryopreservation of Inoculated Cells in Serum-Free Medium

S.V. KOSHCHYI, A.N. GOLTSEV, I.P. VYSEKANTSEV, V.F. MARTSENYUK, T.M. GURINA, L.V. SOKOL
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Сыворотка крови является обязательным компонентом консервирующих сред, предназначенных для криоконсервирования перевиваемых клеток эукариот. Однако в ряде случаев возникает потребность в получении перевиваемых клеток, криоконсервированных в бессывороточных средах. Высказано предположение, что сыворотку крови в среде криоконсервирования можно заменить метилцеллюлозой (МЦ).

Полимер интересен тем, что, с одной стороны, он применяется в виде биологически нейтрального геля как матрикс для культивирования клеток, с другой – в концентрации 0,1% входит в состав культуральных бессывороточных сред и стимулирует пролиферацию клеток.

Целью работы было изучение защитного эффекта МЦ, вводимой в среду консервирования вместо сыворотки крови, при криоконсервировании перевиваемых клеточных культур. Исследования проводили с тремя культурами перевиваемых клеток: мышинными фибробластами линии L929, эпителиальными клетками почки эмбриона свиньи сублиний СПЭВ-5 и СПЭВ-0,5. Фибробласты L929 и эпителиальные клетки СПЭВ-5 культивировали в среде 199 с добавлением 10 и 5% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота соответственно. Эпителиальные клетки СПЭВ-0,5 были адаптированы к росту в среде 199 с добавлением 0,5% ЭС и 0,1% МЦ. Клетки замораживали в среде 199, содержащей 0,1–1,5% МЦ, с добавлением 5% ДМСО и без него. Образцы охлаждали со скоростью 1 град/мин до –40°C и погружали в жидкий азот. Сохранность клеток оценивали по их окрашиванию 0,4% раствором трипанового синего и способности к адгезии к культуральному стеклу.

Установлено, что среда консервирования, содержащая МЦ и ДМСО, обеспечивает высокие показатели количества сохранных клеток. Максимальную сохранность отмечали в образцах с клетками сублинии СПЭВ-0,5. После замораживания в среде 199 с добавлением МЦ, но без ДМСО, клетки всех трех культур погибали.

Blood serum is a mandatory component of cryopreservation media aimed to cryopreservation of inoculated cells of eukaryotes. However, in some cases there is a necessity to obtain the inoculated cells cryopreserved in serum-free media. It is suggested that serum in the cryopreservation medium can be replaced with methylcellulose (MC).

This polymer is interesting because, on the one hand, it is used as a biologically neutral gel as a matrix for cell culturing, on another hand it is the component of the cultural and serum-free media in 0.1% concentration and stimulates a cell proliferation.

The research aim was to study the protective effect of MC introduced in the cryopreservation medium instead of serum during cryopreservation of inoculated cell cultures. The investigations were performed with 3 cultures of inoculated cells: murine fibroblasts of line L929, epithelial cells of the pig fetal kidney of sublines SPEV-5 and SPEV-0,5. L929 fibroblasts and SPEV-5 epithelial cells were cultured in medium 199 supplemented with 10 and 5% fetal bovine serum (FBS), respectively. SPEV-0,5 epithelial cells were adapted to the growth in medium 199 supplemented with 0.5% FBS and 0.1% MC. The cells were frozen in medium 199 containing 0.1–1.5% MC and in the presence or without 5% DMSO. The samples were cooled with the rate of 1 deg/min down to –40°C and plunged into liquid nitrogen. Cell survival was evaluated by staining with 0.4% trypan blue solution and the ability for adhesion to the culture glass.

We have established that the cryopreservation medium containing MC and DMSO provides high indices of survived cells. Maximal survival was observed in the samples with the cells of SPEV-0.5 subline. After freezing in medium 199 supplemented with MC, but without DMSO the cells of all three cultures died.