

Криоконсервирование фетальных фибробластоподобных клеток человека методом витрификации

Н.А. ГОРОХОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Human Fetal Fibroblast-like Cells by Vitrification

N.A. GOROKHOVA

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

Витрификация является одним из альтернативных способов криоконсервирования. В настоящее время успешно витрифицируют образцы тканей небольшого размера, яйцеклетки, зиготы, эмбрионы ранних стадий, колонии эмбриональных стволовых клеток. Однако вопросы оптимизации данного метода и разработки технологических этапов для витрификации клеточных суспензий остаются актуальными.

Цель работы – определить возможность использования метода витрификации для криоконсервирования суспензии фетальных фибробластоподобных клеток человека.

В состав витрифицирующих растворов (ВР) включали ДМСО 10%; ЭГ (10, 15, 20, 25%); 1,2-ПД (10, 15, 20, 25%) и сахарозу (0,5, 1, 1,5, 2 М), комбинируя их различные концентрации. Скрининг растворов проводили с учетом прозрачности стекла, устойчивости к растрескиванию в азоте и парах азота, а также по отсутствию рекристаллизации при отогреве. Для витрификации фибробластоподобных клеток к клеточной суспензии добавляли в два этапа маточный ВР, затем полученные образцы объемом 0,5 мл в пластиковых криоконтейнерах помещали в жидкий азот. Отогрев образцов проводили на водяной бане при +37°C. Отогретую суспензию отмывали в 0,5М растворе сахарозы и среде 199, дополненной 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой. Для удаления криопротекторов использовали двух- и трехступенчатую отмывку. Жизнеспособность клеток оценивали по трипановому синему и способности клеток к адгезии в условиях культивирования.

Для определения комбинации наименьших эффективных концентраций ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы, позволяющих ВР сохранить необходимые витрификационные свойства, проводили скрининг растворов. Из серии растворов выбрали два, образующие в жидком азоте прозрачное и стойкое стекло, которое плавилось без девитрификации при отогреве. Растворы обозначили ВР-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% ПД и 0,5М сахарозы) и ВР-2 (10% ДМСО, 15% ЭГ, 15% ПД и 1М сахарозы).

Жизнеспособность фибробластоподобных клеток после контакта с ВР и отмывки при двух- и трехступенчатой отмывке составляла соответственно для ВР-1: 77,5±4,7 и 68,9±3,7%; ВР-2: 74,8±4,8 и 68,8±2,8%; после замораживания-отогрева для ВР-1: 65,5±2,7 и 59±3,6%; для ВР-2: 47,1±1,9 и 33,6±3,8%. Клетки сохраняли способность прикрепляться к пластику, при этом после двухступенчатой отмывки они проявляли большую способность к расплыванию.

Таким образом, была показана возможность применения метода витрификации для криоконсервирования клеточных суспензий под защитой ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы.

Vitrification is one of the alternative cryopreservation methods. Nowadays, small tissue samples, oocytes, zygotes, embryos at early stages, colonies of embryonic stem cells are successfully vitrified. However, optimizations tasks of this method and development of technological stages for vitrification of cell suspensions are still actual.

Purpose of work is to find possibility of using the vitrification method for cryopreservation suspension of human fetal fibroblast-like cells.

In composition of vitrifying solutions (VS) included 10% DMSO, EG (10, 15, 20, 25 %); 1,2 – PD (10, 15, 20, 25%); and sucrose (0.5, 1, 1.5, 2 M), with combination of their different concentrations. Solution screening was performed on glass transparency, resistance to cracking in nitrogen and its vapours, as well as on absence of recrystallisation during warming. For vitrification of fibroblast-like cells to cell suspension the stock VS was added in two stages, after that the obtained 0.5 ml samples in plastic cryocontainers were placed into liquid nitrogen. Sample thawing was performed on water bath at +37°C. The thawed suspension was washed-out in 0.5 M solution of sucrose and in medium 199, supplemented with 10 % fetal calf serum. For removal of cryoprotectants two- and three-stage washing-outs were used. The viability of cells was assessed with trypane blue staining and adhesion ability of cells during culturing.

For determination of combination the least effective concentrations of EG, 1.2-PD and sucrose, enabling VS to keep essential vitrifying properties, solution screening was performed. Among the series of solutions two were chosen, those forming in liquid nitrogen the transparent and stable glass, which melted with no devitrification during warming. The solutions were defined as VS-1 (10% DMSO, 20% EG, 20% PD and 0.5 sucrose) and VS-2 (10% DMSO, 15% EG, 15% PD and 1M sucrose).

Viability of fibroblast-like cells after the contact with VS and washing-out during two- and three-step washing-outs made correspondingly to VS-1: 77.5±4.7 and 68.9±3.7%; VS-2: 74.8±4.8 and 68.8±2.8%; after freezing-thawing – for VS-1: 65.5±2.7 and 59±3.6%; for VS-2: 47.1±1.9 and 33.6±3.8%. Cells kept the ability of adhering to plastic, herewith after two-step washing-out they showed higher ability to flattening.

In such a way, there was shown the ability to use vitrification method for cryopreservation of cell suspensions under protection of DMSO, EG, 1.2-PD and sucrose.