

УДК 57.043:615.014.41

С.В. Кощий*, А.Н. Гольцев, И.П. Высеканцев,
В.Ф. Марценюк, Т.М. Гурина, Л.В. Сокол

Защитный эффект метилцеллюлозы при криоконсервировании перевиваемых клеток в бесывороточной среде

UDC 57.043:615.014.41

S.V. Koschiy*, A.N. Goltsev, I.P. Vysekantsev,
V.F. Martsenyuk, T.M. Gurina, L.V. Sokol

Protective Effect of Methylcellulose during Cryopreservation of Inoculated Cells in Serum-Free Medium

Реферат: Экспериментально показана возможность замены сыворотки крови в средах для криоконсервирования перевиваемых клеток на метилцеллюлозу (МЦ). Наиболее высокие показатели сохранности клеток после замораживания-отогрева обеспечивало использование в среде консервирования комбинации МЦ с диметилсульфоксидом (ДМСО) в концентрациях 0,1 и 5% соответственно. После замораживания-отогрева в среде, содержащей МЦ и не включавшей ДМСО, количество сохраненных клеток существенно снижалось. Клетки, предварительно культивированные в среде с 0,5% эмбриональной сыворотки (ЭС) и 0,1% МЦ, показали лучшую сохранность после замораживания-отогрева в бесывороточной среде по сравнению с клетками, предварительно культивированными в среде с 10% ЭС.

Ключевые слова: перевиваемые клетки, криоконсервирование, защитная среда, метилцеллюлоза.

Реферат: Експериментально показана можливість заміни сироватки крові в середовищах для криоконсервування клітин, що перевиваються, на метилцелюлозу (МЦ). Найбільш високі показники збереженості клітин після заморожування-відігріву забезпечувало використання середовища консервування з комбінацією МЦ із диметилсульфоксидом (ДМСО) в концентраціях 0,1 і 5% відповідно. Після заморожування-відігріву в середовищі, яке містило МЦ і не мало ДМСО, кількість збережених клітин істотно знижувалася. Клітини, які були попередньо культивовані в середовищі з 0,5% ембріональної сироватки (ЕС) і 0,1% МЦ, показали кращу збереженість після заморожування-відігріву в безсироватковому середовищі в порівнянні з клітинами, які були попередньо культивовані в середовищі з 10% ЕС.

Ключові слова: клітини, які перевиваються, криоконсервування, захисне середовище, метилцелюлоза.

Abstract: There was experimentally shown a possibility to replace blood serum for methylcellulose (MC) in the media for cryopreservation of inoculated cells. Combination of 0.1% MC with 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) in the preservation media provided the highest indices of post-thaw cell survival. Freeze-thawing of cells in the medium contained MC, but without DMSO resulted in a significant reduction of survived cells. The cells, which were pre-cultured in the medium with 0.5% fetal serum (FS) and 0.1% MC, showed higher survival post freeze-thawing in serum-free medium comparing to the cells, which we pre-cultured in the medium with 10% FS.

Key words: inoculated cells, cryopreservation, preservation medium, methylcellulose.

Современные протоколы криоконсервирования перевиваемых клеточных культур предусматривают введение в состав консервирующей среды криопротекторов и сыворотки крови [4, 5]. Сыворотка крови является также обязательным компонентом ростовых сред для культивирования клеточных культур [2, 5]. Криоконсервированные клеточные культуры все шире используются в медицине и биотехнологических процессах [1, 4]. В связи с тем, что сыворотка крови может содержать ряд компонентов, варьирующих по наличию

Current protocols for cryopreservation of inoculated cell cultures involve the introduction of cryoprotectants and blood serum into preservation medium [4, 5]. Blood serum is also a mandatory component of growth media for culturing the cell cultures [2, 5]. Cryopreserved cell cultures are increasingly widely used in medicine and biotechnological processes [1, 4]. Since the blood serum can contain the range of components with concentration varying from batch to batch (immunoglobulins, various proteins and biologically active substances, infectious agents *etc.*) the

Отдел долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах и криомикробиологии и отдел криобиологии системы репродукции, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-11, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: sveta_kos@rambler.ru

Поступила 28.08.2012
Принята в печать 30.01.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №2. – С. 116–123.
© 2013 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Long-Term Storage of Biological Objects at Low Temperatures and Cryomicrobiology, and Department of Cryobiology of Reproductive System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

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

Received August 28, 2012
Accepted January 30, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 2. – P. 116–123.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

и концентрации в разных партиях изготовления (иммуноглобулины, различные белки и биологически активные вещества, инфекционные агенты и т.д.), приобрела актуальность проблема разработки препаратов для клеточной терапии с использованием бессывороточных сред.

Внимание исследователей привлекла возможность замены сыворотки крови в составе консервирующей среды на метилцеллюлозу (МЦ) – гетерогенный полимер с высокометилированными гидрофобными участками и низкометилированными гидрофильными зонами. Водные растворы МЦ обладают способностью к созданию гелеобразной структуры в растворе [14]. Для этого полимера характерны доступность, низкая стоимость, биосовместимость, биодegradация обычными метаболическими путями, отсутствие иммуногенности, отрицательного действия на адгезию и пролиферацию клеток, а также сходство с натуральным экстрацеллюлярным матриксом [15]. Метилцеллюлоза применяется в виде биологически нейтрального геля (в концентрации 1,0–3,0%) как матрица для культивирования нормальных и опухолевых клеток в тканевой инженерии [12]. Установлено, что МЦ в концентрации 0,1% при введении в состав культуральных бессывороточных сред способствует повышению устойчивости мембраны клеток к механическим стрессам и стимулирует пролиферацию клеток [2, 10, 13]. Показана возможность применения МЦ в комбинации с диметилсульфоксидом (ДМСО) для криоконсервирования перевиваемых клеточных культур, культивируемых в свободной от сыворотки среде [3, 11], первичных культур астроцитов [17], мезенхимальных стволовых клеток человека [16].

На основании вышесказанного целью работы было изучение сохранности перевиваемых клеток после криоконсервирования в бессывороточной среде, содержащей МЦ в разных концентрациях.

Материалы и методы

Исследования проводили с тремя культурами перевиваемых клеток: мышинными фибробластами линии L929 и двумя сублиниями эпителиальных клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ-5, СПЭВ-0,5. Фибробласты линии L929, полученные из коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), культивировали в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота («Биолот», Россия). Клетки СПЭВ-5, полученные из коллекции ННЦ «ИЭКВМ» УААН (Харьков), выращивали в среде 199 с добавлением 5% ЭС. Сублиния клеток СПЭВ-0,5, адаптированная к росту в среде 199 с

issue of developing the preparations for cell-based therapy on the base of serum-free media is significant.

Methylcellulose (MC), heterogenic polymer with highly methylated hydrophobic regions and lowly methylated hydrophilic zones attracted the attention of researchers as a possible alternative for blood serum in the preservation medium. Aqueous solutions of MC are able to form gel structures in the solution [14]. This polymer is characterized by availability, low cost, biocompatibility, biodegradation by common metabolic ways, absence of immunogeneity, negative effect on cell adhesion and proliferation as well as similarity to natural extracellular matrix [15]. Methylcellulose is applied as biologically neutral gel (in concentration of 1.0–3.0%) being a matrix for culture of normal and tumor cells in tissue engineering [12]. It was revealed that MC of 0.1% concentration added into the culture serum-free media contributed to the rise in cell membrane resistance to mechanic stress and stimulated cell proliferation [2, 10, 13]. The possibility of using MC combined with dimethyl sulfoxide (DMSO) was reported for cryopreservation of inoculated cell cultures cultured in serum-free medium [3, 11], primary cultures of astrocytes [17], human mesenchymal stromal cells [16].

In view of the above, the research aim was to study the survival of inoculated cells after cryopreservation in serum-free medium containing MC in different concentrations.

Materials and methods

The investigations were performed with three cultures of inoculated cells: murine fibroblasts of L929 line and two sublines of epithelial cells of porcine embryo kidney SPEV-5, SPEV-0.5. Fibroblasts of L929 line obtained from the collection of the Ivanovsky Institute of Virology of the Russian Academy of Medical Sciences (Moscow, Russia) were cultured in medium 199 with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biolog, Russia). Cells of SPEV-5 line obtained from the collection of the Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of the National Academy of Agricultural Sciences (Kharkov, Ukraine) were grown in medium 199 with 5% FBS. Cell subline SPEV-0.5 adapted to the growth in medium 199 with 0.5% FBS and 0.1% MC was previously derived by us [3, 8]. Cell adaptation was performed by stepwise decrease of FBS concentration in culture medium by 0.5–1%. Each decrease of FBS concentration was carried out following 6–10 passages. Concentration of MC during adaptation period was 0.1%. Cell cultures were grown in glass cultural flasks of 0.2 l volume (area of culture

0,5% ЭС и 0,1% МЦ, была получена нами ранее [3,8]. Для адаптации клеток поэтапно снижали концентрацию ЭС в культуральной среде на 0,5–1%. При каждом снижении концентрации ЭС проводилось 6–10 пассажей. Концентрация МЦ в течение адаптации составляла 0,1%. Клеточные культуры выращивали в стеклянных культуральных флаконах объемом 0,2 л (площадь культуральной поверхности 43 см²). Клеточные культуры пересевали через 2–3 суток после образования в культуральных флаконах конфлюэнтного монослоя. Посевная доза во флакон составляла $(0,8–2,0) \times 10^5$ кл/мл. Клетки линий L929 и СПЭВ-5 смывали со стекла смесью 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го раствора Версена (оба раствора получены из ГУПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия) в соотношении 1:4–1:5, а клетки линии СПЭВ-0,5 – 0,02%-м раствором Версена. Характер и динамику формирования клеточного монослоя контролировали визуально с использованием инвертированного микроскопа БИОЛАМ П-1 (ЛОМО, Россия).

Раствор МЦ в концентрации 2% (МЦ-100, ОАО «УсольеХимпром», Россия) предварительно готовили на ростовой среде 199: навеску сухой МЦ стерилизовали в автоклаве 20 мин при 121°C, растворяли в среде 199, перемешивали, оставляли на сутки при комнатной температуре, затем флаконы помещали в холодильник (4°C) до полного растворения МЦ. Этот раствор МЦ вносили в консервирующие среды до конечных концентраций 0,1 и 1,5%.

Консервирующие среды готовили на основе среды 199, в которую добавляли ДМСО, ЭС и МЦ в следующих концентрациях и комбинациях: 5% ДМСО + 5% ЭС; 5% ДМСО + 0,5% ЭС; 5% ДМСО + 0,1% МЦ; 5% ДМСО + 1,5% МЦ; 5% ДМСО + 1,5% МЦ; 0,1% МЦ; 1,5% МЦ; 5% ДМСО. Один образец клеток, консервируемых в среде 199 с добавлением 5% ДМСО и 0,1% МЦ, перед внесением в среду консервирования дважды отмывали от ростовой среды. Остальные образцы клеток осаждали центрифугированием (1500 г) в течение 10 мин и переносили в консервирующие среды без отмывания.

Клеточные суспензии вносили в криобирки («Nunc», Дания) с рабочим объемом 1 мл. Образцы замораживали в программном замораживателе («Cryoson», Германия) со скоростью охлаждения 1 град/мин до –40°C, затем погружали в жидкий азот. После хранения при –196°C в течение 4-х месяцев образцы отогревали на водяной бане при 37°C. Для удаления среды консервирования к клеткам после размораживания медленно добавляли среду 199 в конечном соотношении 10:1. После этого клетки осаждали центрифугированием и осадок ресуспендировали в 1 мл среды культивирования.

surface was 43 cm²). Cell cultures were reinoculated in 2–3 days after formation of confluent monolayer in cultural flasks. Seeding dose in flask made $(0.8–2.0) \times 10^5$ cells/ml. L929 and SPEV-5 cells were detached with the mixture of 0.25% trypsin solution and 0.02% Versen solution (both solutions were obtained from the Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides of the Russian Academy of Medical Sciences, Russia) in 1:4–1:5 ratio, and the cells of SPEV-0.5 line were detached with 0.02% Versen solution. Character and dynamics of cell monolayer formation were imaged with inverted microscope BIOLAM P-1 (LOMO, Russia).

MC solution of 2% concentration (MC-100, JSC Usoliekhimprom, Russia) was preliminary prepared in growth medium 199: weighed portion of dry MC was sterilized in autoclave for 20 min at 121°C, dissolved in medium 199, agitated, left for 24 hours at room temperature, then the flasks were placed in the freezer (4°C) until complete dissolution. This MC solution was added to preservation media to reach the final concentrations of 0.1 and 1.5%.

Preservation media were prepared on the base of medium 199 supplemented with DMSO, FBS and MC in the following concentrations and combinations: 5% DMSO + 5% FBS; 5% DMSO + 0.5% FBS; 5% DMSO + 0.1% MC; 5% DMSO + 1.5% MC; 5% DMSO + 1.5% MC; 0.1% MC; 1.5% MC; 5% DMSO. One sample of the cells prior to introducing into medium 199 supplemented with 5% DMSO and 0.1% MC was twice washed from growth medium. Other cell samples were sedimented by centrifuging (1500 g) during 10 min and transferred into preservation media without washing.

Cell suspensions were transferred in cryovials (Nunc, Denmark) with 1 ml handling volume. The samples were frozen in programmable freezer (Cryoson, Germany) with the cooling rate of 1 deg/min down to –40°C, then plunged into liquid nitrogen. After storage at –196°C during 4 months the samples were thawed in water bath at 37°C. To remove preservation medium post thaw the cell samples were diluted with medium 199 in 10:1 final ratio. Thereafter the cells were sedimented by centrifuging and the sediment was resuspended in 1 ml of culture medium.

The cell survival was assessed by standard method of supravital staining with 0.4% trypan blue solution characterizing the integrity of cell membranes. Index of survival was calculated as the ratio of number of non-stained cells to their total number. In addition we assessed the cell ability to adhere to the cultural glass and calculated adhesion index, *i.e.* relation of number of adhered cells to total number of cells after 24 hrs of incubation in 0.2 l cultural glass flasks [2, 6].



Сохранность клеток определяли стандартным методом суправитального окрашивания 0,4%-м раствором трипанового синего, характеризующим целостность клеточных мембран. Показатель сохранности вычисляли как отношение числа неокрашенных клеток к их общему количеству. Также оценивали способность клеток адгезировать к культуральному стеклу и вычисляли индекс адгезивности, т. е. отношение числа прикрепившихся клеток к общему числу клеток через 24 ч инкубирования в стеклянных культуральных флаконах объемом 0,2 л [2, 6].

Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2007, при сравнении средних – t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [7].

Результаты и обсуждение

После криоконсервирования клеток линий СПЭВ-5 и СПЭВ-0,5 в среде, содержащей 5% ДМСО и 5% ЭС, количество сохранных клеток и их индекс адгезивности не изменялись (рисунок, А, В). Индекс адгезивности нативных клеток до перевода в консервирующую среду для линии СПЭВ-5 составлял – $(94,8 \pm 3)\%$; для линии СПЭВ-0,5 – $(95,7 \pm 3,1)\%$. Снижение концентрации ЭС до 0,5% привело к уменьшению количества сохранных клеток после криоконсервирования до 54,6 и 58,3% соответственно. Индекс адгезивности клеток достоверно снижался после переноса их в среду, содержащую 5% ДМСО и 0,5% ЭС, а также после замораживания-отогрева.

После замены ЭС в среде консервирования на МЦ в концентрации 0,1% количество сохранных клеток СПЭВ-5 после криоконсервирования уменьшилось до 89,2%, а линии СПЭВ-0,5 – не изменилось. Индекс адгезивности после перевода в среду, содержащую 5% ДМСО и 0,1% МЦ, уменьшился у клеток линии СПЭВ-5 и далее не изменялся у клеток обеих линий после отогрева. Когда в эту же среду внесли клетки, дважды отмытые от ростовой среды, количество сохранных клеток линии СПЭВ-5 уменьшилось после криоконсервирования до 84,2%, а линии СПЭВ-0,5 – не изменилось. У отмытых клеток линии СПЭВ-5 после криоконсервирования в этой среде индекс адгезивности снижался. В среде, содержащей 5% ДМСО и 1,5% МЦ, количество сохранных клеток линии СПЭВ-5 после криоконсервирования составило около 68%, линии СПЭВ-0,5 – около 80%. У клеток обеих линий после перевода в среду криоконсервирования индекс адгезивности снижался, а у клеток линии СПЭВ-5 после замораживания-отогрева наблюдалось его дополнительное снижение.

For statistical data processing we used Microsoft Office Excel 2007 software, to compare the means we used Student's t-criterion. The differences were considered as significant at $p < 0.05$ [7].

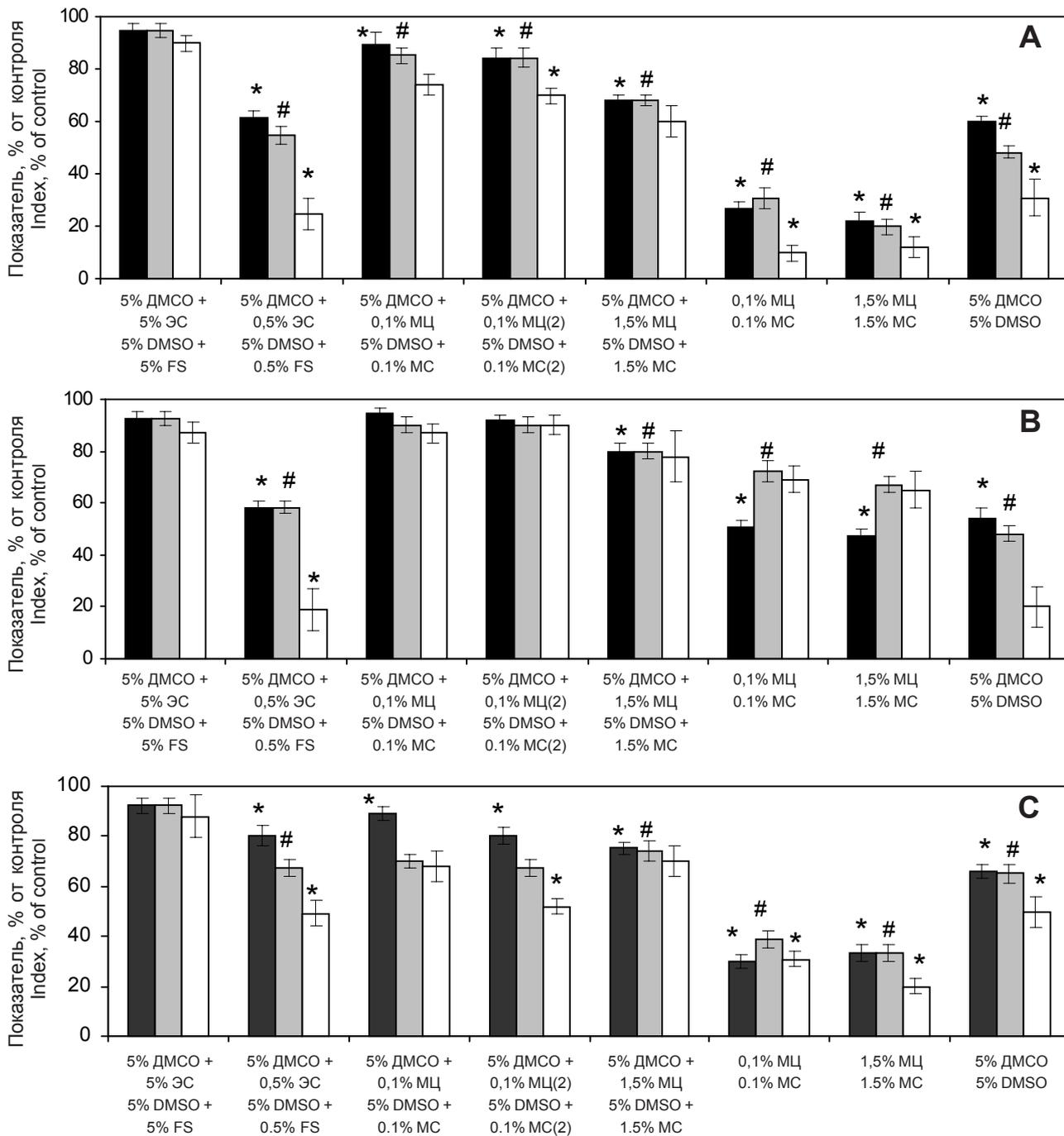
Results and discussion

After cryopreservation of SPEV-5 and SPEV-0.5 cells in the medium containing 5% DMSO and 5% FBS the number of survived cells and their index of adhesion were not changed (Figure A, B). Adhesion index of cells prior to transfer into preservation medium for SPEV-5 line was $(94.8 \pm 3)\%$; for SPEV-0.5 it made $(95.7 \pm 3.1)\%$. After decrease of FBS concentration down to 0.5% the number of survived cells post thaw lowered down to 54.6 and 58.3%, respectively. Adhesion index of cells significantly decreased after their transfer to the medium containing 5% DMSO and 0.5% FBS as well as after freeze-thawing.

When FBS in preservation medium was replaced by MC in 0.1% concentration the number of survived SPEV-5 cells after cryopreservation decreased down to 89.2%, and the one of SPEV-0.5 did not change. Adhesion index after transfer into the medium containing 5% DMSO and 0.1% MC was decreased in SPEV-5 cells and later it was not changed in the cells of both lines post thaw. When this medium was supplemented with the cells twice washed of the growth medium, the number of survived cells of SPEV-5 line was reduced post thaw down to 84.2%, and the one of SPEV-0.5 line was not changed. The washed cells of SPEV-5 line had a decreased adhesion index after freeze-thawing in this medium. In the medium containing 5% DMSO and 1.5% MC the number of survived cells of SPEV-5 line post thaw made 68%, the one of SPEV-0.5 line was about 80%. The cells of both lines after transfer into cryopreservation medium had a decreased adhesion index, and the cells of SPEV-5 line were observed to have additional reduction of the index post thaw.

After freeze-thawing of the studied cell cultures in the media with monocomponent additives of 0.1 or 1.5% MC and 5% DMSO, the number of survived cells of both lines was lower than in the preservation media with two-component additives. The survival of SPEV-5 cells after freeze-thawing in the medium with 5% DMSO was significantly higher if compared to the media containing MC. Adhesion index in the cells of both lines was decreased after transfer into the media with monocomponent additives, in SPEV-5 cells it was lowered after cryopreservation in all the media with monocomponent additives, and in SPEV-0.5 cells it was in the medium with 5% DMSO.





Сохранность и индекс адгезивности перевиваемых клеток линий СПЭВ-5 (А), СПЭВ-0,5 (В) и L929 (С) после замораживания-отогрева в различных средах: ■ – количество сохранных клеток после замораживания-отогрева, %; □ – индекс адгезивности клеток до замораживания, %; □ – индекс адгезивности клеток после замораживания-отогрева, %. (2) – образцы с клетками, которые дважды отмывали перед переводом в консервирующую среду; * – уровень доверительной вероятности различий между количеством сохранных клеток и индексами адгезивности до и после криоконсервирования, $p < 0,05$; # – уровень доверительной вероятности различий между индексом адгезивности клеток до и после перевода в среду консервирования, $p < 0,05$.

Survival and adhesion index of inoculated cells of SPEV-5 (A), SPEV-0.5 (B) and L929 (C) after freeze-thawing in different media: ■ – number of survived cells after freeze-thawing, %; □ – adhesion index of cells prior to freezing, %; □ – adhesion index of cells after freeze-thawing, %; (2) – samples with the cells twice washed before transfer into preservation medium; * – the level of significance of differences between the number of survived cells and adhesion indices prior to and after cryopreservation, $p < 0.05$; # – the level of significance of differences between the adhesion index of cells prior to and after transfer into preservation medium, $p < 0.05$.



После замораживания-отогрева исследуемых клеточных культур в средах с монокомпонентными добавками, содержащими 0,1 и 1,5% МЦ и 5% ДМСО, количество сохранных клеток обеих линий было ниже, чем в средах консервирования с двухкомпонентными добавками. Сохранность клеток линии СПЭВ-5 после замораживания-отогрева в среде с 5% ДМСО была существенно выше по сравнению со средами, содержащими МЦ. Индекс адгезивности у клеток обеих линий снижался после перевода в среды с монокомпонентными добавками, у клеток линии СПЭВ-5 – после криоконсервирования во всех средах с монокомпонентными добавками, а у клеток линии СПЭВ-0,5 – в среде с 5% ДМСО.

В экспериментах с клетками линии L929 были получены данные, аналогичные для клеток линии СПЭВ-5. Индекс адгезивности нативных клеток до переноса их в консервирующую среду для линии L929 составлял $96,5 \pm 2,3\%$. Наиболее высокие показатели сохранности этих клеток обеспечивало криоконсервирование в среде, содержащей 5% ДМСО и 5% ЭС, и в среде с 5% ДМСО и 0,1% МЦ. После уменьшения концентрации ЭС до 0,5% и повышения концентрации МЦ до 1,5% сохранность клеток после замораживания-отогрева снижалась. Показатели сохранности клеток линии L929 после замораживания-отогрева в средах с монокомпонентными добавками были ниже, чем в средах с 5% ДМСО и ЭС либо МЦ. Данный показатель после замораживания-отогрева в среде с 5% ДМСО превышал таковой в средах с 0,1 и 0,5% МЦ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для криоконсервирования клеточных культур можно использовать многокомпонентные консервирующие среды, в которых ЭС заменена на МЦ. Обязательным условием, обеспечивающим эффективность таких сред для криоконсервирования, является наличие в их составе ДМСО. Если криозащитный эффект среды, содержащей ЭС, снижался с уменьшением концентрации сыворотки с 5 до 0,5%, то в проведенных нами экспериментах со средами, содержащими МЦ, он снижался по мере увеличения концентрации МЦ с 0,1 до 1,5%.

Механизм криозащитного действия МЦ предстоит изучить. Мы предполагаем, что МЦ связывает часть воды и тем самым влияет на процессы кристаллизации во внеклеточном растворе. Кроме того, при культивировании клеток линии СПЭВ-0,5 МЦ, находящаяся в среде культивирования, вероятно, может выполнять роль структурно-механического барьера и защищать клетки от внешних воз-

In the experiments with L929 cells we have obtained the data similar to SPEV-5 cells. Adhesion index of native cells prior to their transfer into preservation medium for L929 line made $96.5 \pm 2.3\%$. The highest indices of survival of these cells were provided by freeze-thawing in the medium containing 5% DMSO and 5% FBS and in the medium with 5% DMSO and 0.1% MC. After decreasing the FBS concentration down to 0.5% and increasing the MC concentration up to 1.5% the cell survival after freeze-thawing was increased. The indices of L929 cells survival after freeze-thawing in the media with monocomponent additives were lower than in the media with 5% DMSO and FBS or MC. This index after freeze-thawing in the medium with 5% DMSO exceeded the one in the media with 0.1 and 0.5% MC.

The obtained results attest the fact that it is possible to use multicomponent preservation media wherein FBS is replaced by MC for cryopreservation of cell cultures. An essential condition providing the efficiency of such media for cryopreservation is the presence of DMSO in their composition. The cryoprotective effect of the medium containing FBS was decreased with the lowering of serum concentration from 5 down to 0.5%, whereas in our researches it was decreased with the augmentation of MC concentration from 0.1 up to 1.5%.

Mechanism of MC cryoprotective effect is still to be discovered. We suggest that MC bounds a part of water and thereby affects the crystallization processes in extracellular medium. Moreover, during culture of SPEV-0.5 cells MC could function as a structure-mechanic barrier and protect the cells from external impacts associated with crystallization processes. The results obtained in the experiments with the samples of cells exposed to freeze-thawing after double washing from growth medium indicate to the favor of this assumption. The molecules of MC presumably preserved on the surface of cells prevented cell aggregation due to hydrophilic properties of MC and contributed to their higher adhesion to the surface of cultural flask. This suggestion is conformed to the results of Medzon and Merchant [9] who reported that MC was either on or near the surface of cells and interacted with mono- and divalent cations. Before freezing of the washed SPEV-5 and L929 cultures the serum from culture medium was washed-out and did not affect the following freezing. Peculiarities of MC effect on the processes of intracellular ice formation and mechanisms of decrease in cell survival followed the increasing the MC concentration in preservation medium are to be studied.



действий, связанных с процессами кристаллизации. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты, полученные в экспериментах с образцами клеток, подвергавшимися замораживанию-отогреву после двукратной отмывки от ростовой среды. Предположительно сохранившиеся на поверхности клеток СПЭВ-0,5 молекулы МЦ за счет своих гидрофильных свойств предотвращали агрегацию клеток и способствовали их более высокой адгезии к поверхности культурального флакона. Это предположение согласуется с результатами E.L. Medzon и D.J. Merchant [9], которые показали, что молекулы МЦ присутствуют на или около поверхности клеток и взаимодействуют с моно- и дивалентными катионами. При замораживании отмываемых культур СПЭВ-5 и L929 сыворотка из культуральной среды была отмываема и не влияла на последующее замораживание. Возможность влияния МЦ на процессы внутриклеточного кристаллообразования и механизмы снижения сохранности клеток с увеличением концентрации МЦ в среде консервирования до настоящего времени не изучены.

Выводы

1. Показана возможность эффективного криоконсервирования перевиваемых клеточных культур в бессывороточной среде на основе культуральной среды 199 с добавлением ДМСО и МЦ.
2. Криозащитные свойства среды с монокомпонентной добавкой МЦ значительно уступают криозащитным свойствам среды, содержащей ДМСО и МЦ.
3. Увеличение концентрации МЦ в криозащитных средах с 0,1 до 1,5% приводит к снижению количества сохраненных клеток.
4. Предшествующее криоконсервированию культивирование клеток в ростовой среде, содержащей МЦ, способствует их более высокой сохранности в процессе замораживания в бессывороточной среде. Максимальное число сохраненных клеток было получено для СПЭВ сублинии 0,5.

Литература

1. Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф., Ананьина А.Е. и др. Криоконсервирование промышленных и коллекционных штаммов микроорганизмов // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. А.Н. Гольцева. – Харьков, 2012. – С. 401–440.
2. Голубев Д.Б., Соломин А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. – М.: Медицина, 1976. – 224 с.
3. Коцкий С.В., Высеканцев И.П., Петренко Т.Ф. Пролиферация и криоконсервирование клеток СПЭВ, культивируемых

Conclusions

1. It was shown the possibility of effective cryopreservation of inoculated cell cultures in serum-free medium based on medium 199 supplemented with DMSO and MC.
2. Cryoprotective properties of medium with monocomponent additive MC were significantly lower if compared with the ones of the medium containing DMSO and MC.
3. Increasing the MC concentration in cryoprotective media from 0.1 up to 1.5% led to the decrease of survived cells number.
4. Cell culture in growth medium containing MC prior to freeze-thawing contributed to their higher survival during freezing in serum-free medium. Maximal number of survived cells was achieved for SPEV-0.5 cells.

References

1. Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F., Anan'ina A.E. et al. Cryopreservation of industrial and collection strains of microorganisms // Actual Problems of Cryobiology and Cryomedicine / Ed. by A.N. Goltsev. – Kharkov, 2012. – P. 401–440.
2. Golubev D.B., Solomin A.A., Medvedeva M.N. Guidelines for application of cell cultures in virology. – Moscow: Meditsina, 1976. – 224 p.
3. Koschiy S.V., Vysekantsev I.P., Petrenko T.F. Proliferation and cryopreservation of SPEV cells, cultured in the medium with low content of serum // Biofizika Zhyvoy Kletki. – 2008. – Vol. 9. – P. 70–71.
4. Cryopreservation of cell suspensions / Ed. by A.A. Tsutsaeva. – Kiev: Naukova Dumka, 1983. – 240 p.
5. Culture of animal cells. Methods / Ed. by R. Freshney. – Moscow: Mir, 1989. – 333 p.
6. Laboratory investigation methods in clinic: Manual / Ed. by V.V. Menshikov. – Moscow: Meditsina, 1987. – 368 p.
7. Prisedsky Yu.G. Statistical processing of results of biological experiments: Manual. – Donetsk, 1999. – 210 p.
8. Ukraine Patent N58224 IPC C12 N5/2. Method of adaptation of adhesive cells to growth in serum-free media / S.V. Koschiy, A.M. Goltsev, I.P. Vysekantsev; Filed 13.08.2010; Publ. 11.03.2011. Bull. N7.
9. Medzon E.L., Merchant D.J. Interaction of the LM cell surface with methylcellulose and vaccinia virus. Mode of action and implications for large scale vaccine production // In Vitro. – 1971. – Vol. 7, Issue 1. – P. 46–58.
10. Merchant D.J., Hellman K.B., Schneider H. et al. Protection of animal cells with methylcellulose // Bact. Proc. – 1962. – P. 141.
11. Merten O.W., Petres S. and Couve E. A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells // Biologicals. – 1995. – Vol. 23. – P. 185–189.
12. Nair L.S., Laurencin C.T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2006. – Vol. 102. – P. 47–90.
13. Onho T., Kurita K., Abe S. et al. A simple freezing medium for serum-free cultured cells // Cytotechnology. – 1988. – Vol. 1. – P. 257–260.
14. Sannino A., Demitri C., Madaghiele M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications // Materials. – 2009. – Vol. 2. – P. 353–373.



- на среде с низким содержанием сыворотки // Биофизика живой клетки. – 2008. – Т.9. – С.70–71.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под. общ. ред. А.А.Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
 5. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989.– 333 с.
 6. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под. ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
 7. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник. – Донецьк, 1999. – 210 с.
 8. Патент №58224 України, МПК С 12 N 5/2. Спосіб адаптації адгезійних клітин до росту в середовищі без сироватки / Кошій С.В., Гольцев А.М., Висеканцев І.П.; заявл. 13.08.2010; опубл. 11.03.2011. Бюл. №7.
 9. Medzon E.L., Merchant D.J. Interaction of the LM cell surface with methylcellulose and vaccinia virus. Mode of action and implications for large scale vaccine production // *In Vitro.* – 1971. – Vol. 7, Issue 1. – P.46–58.
 10. Merchant D.J., Hellman K.B., Schneider H. et al. Protection of animal cells with methylcellulose // *Bact. Proc.* – 1962. – P. 141.
 11. Merten O.W., Petres S. and Couve E. A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells // *Biologicals.* – 1995. – Vol. 23. – P. 185–189.
 12. Nair L.S, Laurencin C.T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2006. –Vol. 102. – P. 47–90.
 13. Onho T., Kurita K., Abe S. et al. A simple freezing medium for serum-free cultured cells // *Cytotechnology.* – 1988. – Vol. 1. – P. 257–260.
 14. Sannino A., Demitri C., Madaghiale M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications // *Materials.* – 2009. – Vol. 2. – P. 353–373.
 15. Tate M.C., Shear D.A., Hoffmann S.W. et al. Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury // *Biomaterials.* – 2001. – Vol. 22, №10. – P. 1113–1123.
 16. Thirumala S., Gimble J.M., Devireddy R.V. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells // *Stem Cells Dev.* – 2010. – Vol. 19, №4. – P. 513–522.
 17. Yoshida T., Takeuchi M. Primary culture and cryopreservation of mouse astrocytes under serum-free conditions // *Cytotechnology.* – 1991. – Vol. 5, №2. – P. 99–106.