УДК 57.043:576.3

С.В. Кощий*, И.П. Высеканцев, В.Ф. Марценюк, Т.Ф. Петренко, Е.В. Кудокоцева

Использование метилцеллюлозы при культивировании и криоконсервировании перевиваемой культуры СПЭВ

UDC 57.043:576.3

S.V. Koshchiy*, I.P. Vysekantsev, V.F. Martsenyuk, T.F. Petrenko, E.V. Kudokotseva

Using Methylcellulose during Culturing and Cryopreservation of SPEV Passaged Culture

Показана возможность адаптации перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) к росту на среде 199 в присутствии 0,1% метилцеллюлозы (МЦ) со снижением содержания сыворотки до 1%. Отмечены криопротекторные свойства МЦ при криоконсервировании клеток СПЭВ.

Ключевые слова: криоконсервирование, культивирование, метилцеллюлоза, перевиваемая культура, сыворотка.

Показана можливість адаптації перевитих клітин нирки ембріона свині (СПЕВ) до росту на середовищі 199 у присутності 0,1% метилцелюлози (МЦ) зі зниженням вмісту сироватки до 1%. Відзначено кріопротекторні властивості МЦ при кріоконсервуванні клітин СПЕВ.

Ключові слова: кріоконсервування, культивування, метилцелюлоза, перевита культура, сироватка.

The possibility of adaptation of cultured embryonic pig kidney cells (SPEV) to growth in culturing medium 199+0.1% MC with reduced serum content to 1% has been shown. Cryoprotective properties of MC for the cryopreservation of SPEV have been determined.

Key-words: cryopreservation, culturing, methylcellulose, passaged culture, serum.

Для выращивания большинства клеточных линий используют среды с добавлением до 10% сыворотки крупного рогатого скота или эмбриональной сыворотки (ЭС) теленка. Необходимость использования сыворотки, для которой характерны непостоянство сложного состава и ростстимулирующей активности, риск контаминации вирусами и микоплазмами, создает ряд проблем как при культивировании клеток, так и при их замораживании.

Метилцеллюлоза (МЦ), наряду с поливинилпирролидоном и другими синтетическими полимерами, применяется при культивировании клеток животных на средах без сыворотки или с низким ее содержанием. Она используется также как криопротектор в комбинации с ДМСО или для замены ДМСО при криоконсервировании перевиваемых клеток в средах, свободных от сыворотки [4, 5]. Мы изучали возможность культивирования перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) на питательной среде 199 с низким содержанием ЭС при многократном пассировании. В процессе адаптации клеток к росту на средах с низким содержанием сыворотки в ростовую среду добавляли 0,1% МЦ.

Цель работы – изучение влияния состава криозащитной среды (среда 199 с добавлением ДМСО, МЦ, ДМСО с ЭС, МЦ с ДМСО) на жизнеспособность клеток СПЭВ, культивируемых на среде с разным содержанием сыворотки.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клетки СПЭВ (получены в НПО “Биолек”, г. Харьков). Культуру клеток выращивали на среде 199 с 10; 5; 2,5; 1% ЭС в стеклянных матрасах емкостью 0,25 л и пробирках Лейтона при 37°С; коэффициент пересева культур 1:4 – 1:6. Клетки снимали со стекла смесью растворов 0,25% трипсина и 0,02% версена в соотношении 1:5–1:6; время контакта с клетками при 37°С – 10-20 мин. Характер и динамику формирования клеточного монослоя контролировали визуально с использованием инвертированного микроскопа БИОЛАМ П-1 (ЛОМО, Россия).

При криоконсервировании суспензию клеток в криозащитной среде помещали в ампулы (Nunc) объемом 1мл. Пробы замораживали после 20-минутной эквилибрации с криопротектором по двухэтапной программе: I этап – охлаждение со скоростью 1°С/мин до –70°С, II этап – погружение в жидкий азот [2]. После хранения в течение месяца клетки отогревали на водяной бане (37–38°С), подсчитывали количество клеток в камере Горяе-

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* *Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:* ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

ва и определяли их жизнеспособность методом исключения красителя 0,4%-го трипанового синего [1].

Статистическую обработку полученных результатов проводили согласно [3], достоверными считали различия данных при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Культивирование клеток без сыворотки и с низким ее содержанием возможно, в основном, для перевиваемых клеточных линий. Процесс адаптации обычно состоит в поэтапном снижении концентрации сыворотки с последующей заменой оставшегося небольшого количества сыворотки соответствующим набором веществ определенного состава. Мы изучали возможность культивирования клеток СПЭВ на среде 199 с содержанием 2,5 и 1% сыворотки в присутствии 0,1% МЦ.

В предварительных экспериментах определяли влияние 0,1% МЦ в ростовой среде на пролиферацию клеток. Клетки культивировали с одинаковой посевной концентрацией 1×10^5 клеток/мл и различным составом питательных сред. Характер и динамику клеточного монослоя контролировали визуально с помощью светового микроскопа ежедневно в течение 5 суток. Результаты исследования динамики роста клеток от момента посева до выхода на стационарную фазу приведены в табл. 1. В образцах 1, 5, 7, 8 формировался полноценный монослой примерно одновременно с контролем. В образце 3, питательная среда которого состояла из среды 199 с 2,5% ЭС, на 4-е сутки наблюдалась деградация монослоя. Культивирование клеток только на среде 199 (образец 1), среде 199 с 1% МЦ (образец 2), на среде 199 с содержанием сыворотки меньше 1% (образец 6) приводило к деструктивным изменениям в формировании монослоя уже на 2-е сутки: клетки, прикрепившиеся к поверхности стекла на 1-е сутки, постепенно переходили в суспензию.

Присутствие МЦ в образцах 5 и 8, культивируемых с пониженным содержанием сыворотки, стимулировало рост клеток, плотность популяции клеток на см^2 была на уровне с контролем. Таким образом, полученные результаты показали возможность применения 0,1% МЦ для культивирования клеток СПЭВ в среде 199 с низким содержанием сыворотки и обусловили необходимость адаптации клеток.

Клетки СПЭВ адаптировали к росту на среде 199 с 2,5 и 1% сыворотки путем снижения концентрации сыворотки в 2 раза после нескольких пассажей и добавления в ростовую среду с низким содержанием сыворотки 0,1% МЦ. Результаты непрерывного пассирования клеток в течение 4-х месяцев на этих средах свидетельствуют о сохранении их пролиферативной активности. Клетки формировали плотный монослой через 48–72 ч при посеве $0,8–2,2\times10^5$ клеток/мл, который сохранялся без изменений в течение 3-х суток. Урожай клеток с 0,25 л матраса во всех вариантах составлял $1,2–4\times10^7$ клеток. Примером влияния 0,1% МЦ на

Таблица 1. Влияние состава питательной среды на пролиферацию клеток СПЭВ

Номер образца	Тип сосуда для культивирования	Добавка к среде 199	Динамика формирования монослоя в сутки,%					Плотность популяции, кл./см^2
			1	2	3	4	5	
1	Пробирка Лейтона	Контроль: 5% ЭС	20 – 30	95	100	100	100	$2,2\times10^5$
2	Пробирка Лейтона	–	20 – 30	5--10	Отдельно прикрепл. клетки	–	–	–
3	Пробирка Лейтона	2,5% ЭС	30	85	95	95	80	$1,2\times10^5$
4	Пробирка Лейтона	0,1% МЦ	20	10	Отдельно прикрепл. клетки	–	–	–
5	Пробирка Лейтона	1,25% ЭС + 0,1% МЦ	30 – 35	75 – 80	95-98	100	100	$2,4\times10^5$
6	Пробирка Лейтона	0,6% ЭС + 0,15% МЦ	20	35	20	–	–	–
7	Матрас 0,25 л	Контроль: 5% ЭС	40	85	100	100	100	$1,7\times10^5$
8	Матрас 0,25 л	2,5% ЭС + 0,1% МЦ	40	75	100	100	100	$2,3\times10^5$

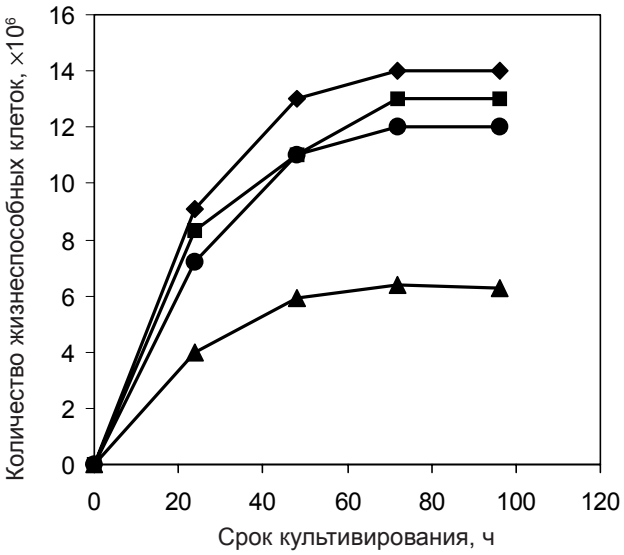

Рис. 1. Пролиферация клеток СПЭВ, культивируемых в разных средах: ● – среда 199 + 5% ЭС; ▲ – среда 199 + 2,5% ЭС; ■ – среда 199 + 1% ЭС + 0,1% МЦ; ▲ – среда 199 + 2,5 % ЭС + 0,1% МЦ.

пролиферацию клеток СПЭВ являются кривые динамики урожайности клеток до формирования монослоя, культивируемых в средах с различным содержанием сыворотки (рисунок). Характер приведенных кривых свидетельствует о том, что присутствие 0,1% МЦ стимулировало рост клеток, их урожайность при одинаковой посевной концентрации была на 20–30% выше по сравнению с питательной средой без МЦ. Таким образом, сохранение биологической активности и способности к пролиферации клеток на среде с 1% сыворотки и 0,1% МЦ свидетельствует о возможности поддержания их роста, а также о перспективе культивирования клеток СПЭВ в среде без сыворотки.

Сохранность перевиваемых культур в жидком азоте в криозащитных средах без сыворотки – важная задача в создании банка клеток, адаптированных к росту в среде без сыворотки. При замораживании использовали клетки СПЭВ, адаптированные к культивированию с различным содержанием сыворотки. Клетки после снятия со стекла суспендировали в среде 199 и постепенно добавляли в нее равный объем приготовленной *ex tempore* на среде 199 криозащитной среды. Конечная концентрация клеток и криопротекторов в образцах перед замораживанием приведены в табл. 2. Контролем при замораживании служила среда 199 + 5% ДМСО + 10% ЭС для клеток, выращенных на питательной среде с 10% ЭС.

Из приведенных в табл.2 данных следует,что криоконсервирование культивируемых с 5; 2,5; 1% сыворотки линий клеток СПЭВ на среде с 5% ДМСО и соответствующим содержанием сыворотки обеспечивало высокую сохранность клеток. Постепенное снижение концентрации сыворотки в ростовой среде при культивировании позволило получить для адаптированной к росту с 1% сыворотки линии СПЭВ количество жизнеспособных клеток 92,0±3,7, что достоверно выше контроля. Также не наблюдалось различий в процентном содержании жизнеспособных клеток для предва-

Таблица 2. Жизнеспособность клеток СПЭВ после замораживания-отогрева

Номер образца	Криозащитная среда	Концентрация клеток в 1 мл	Жизнеспособность клеток, x±Sx, %
Состав культивируемой среды: среда 199 + 10 % ЭС (5 пассажей)			
1	10% ЭС	$7{,}0\times10^5$	38,0±4,6
2	5% ДМСО	$7{,}0\times10^5$	62,3±1,9
3	10% ДМСО + 10% ЭС	$7{,}0\times10^5$	67,0±3,0
4	5% ДМСО + 10% ЭС	$7{,}0\times10^5$	93,7±2,7
Состав культивируемой среды: среда 199 + 5% ЭС (16 пассажей)			
1	10% ДМСО + 5% ЭС	$3{,}8\times10^5$	83,1±4,0
2	5% ДМСО + 5% ЭС	$3{,}8\times10^5$	94,5±2,6
3	5% ДМСО + 0,1% МЦ	$3{,}8\times10^5$	89,2±4,8
4	5% ЭС+ 0,1% МЦ	$3{,}8\times10^5$	45,1±3,9
Состав культивируемой среды: среда 199+2,5% ЭС + 0,1% МЦ (8 пассажей)			
1	5% ДМСО + 2% ЭС	$3{,}2\times10^6$	88,0±4,5
2	5% ДМСО + 0,1% МЦ	$3{,}2\times10^6$	90,5±5,0
3	2% ЭС + 0,1% МЦ	$3{,}2\times10^6$	59,2±4,4
Составкультивируемой среды: среда 199 + 1% ЭС + 0,1% МЦ (6 пассажей)			
1	5% ДМСО + 1% ЭС	$2{,}0\times10^6$	92,0±3,7
2	5% ДМСО + 0,1% МЦ	$2{,}0\times10^6$	91,0±4,2
3	1% ЭС + 0,1% МЦ	$2{,}0\times10^6$	48,7±2,9

рительно адаптированных линий после замораживания-отогрева в среде без сыворотки с 5% ДМСО + 0,1% МЦ. Количество сохранных клеток 89,2±4,8; 90,5±5,0; 91,0±4,2% было несколько ниже по сравнению с контролем, но достаточным для замораживания клеток без сыворотки в качестве инокулята.

Таким образом, введение в среду консервирования 0,1% МЦ вместо сыворотки во всех случаях способствовало повышению показателей сохранности клеток после криоконсервирования.

Выводы

1. Установлено, что введение 0,1% МЦ в ростовую среду позволяет адаптировать клетки СПЭВ к культивированию на среде 199 с низким содержанием сыворотки.

2. Экспериментально показано, что МЦ обладает криопротекторными свойствами при криоконсервировании перевиваемых клеток СПЭВ.

Литература

1. *Культура животных клеток.* Методы / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
2. *Методы культивирования клеток.* Сб. научных трудов / Под ред. Г.П. Пинаева.– Л.: Наука, 1988.– 313 с.
3. *Статистична обробка* результатів біологічних експериментів: Навч. посібник.– Донецьк, 1999.– 186 с.
4. *Schroder M., Friedl P.* A protein-free solution as replacement for serum in trypsinization protocols for anchorage-dependent cells // Meth. Cell Sci.– 1997.– Vol. 19.– P. 137–147.
5. *Merten O.W., Petres S., Couve E.* A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells // Biologicals.– 1995.– Vol. 23.– P. 185–189.

Поступила 1.07.2008