



# Криоконсервирование первично трипсинизированных клеток фибробластов эмбрионов кур с использованием разных криопротекторов

С. П. Лазарева<sup>1</sup>, Б. Л. Манин<sup>2</sup>, Н. С. Мудрак<sup>3</sup>, Д. Б. Андрейчук<sup>4</sup>

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9540-0001>, e-mail: [lazareva@arriah.ru](mailto:lazareva@arriah.ru)

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5253-1491>, e-mail: [manin\\_bl@arriah.ru](mailto:manin_bl@arriah.ru)

<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9788-9197>, e-mail: [mudrak@arriah.ru](mailto:mudrak@arriah.ru)

<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru)

## РЕЗЮМЕ

Криоконсервирование является оптимальным способом хранения клеток при сверхнизких температурах. Для уменьшения гибели клеток от воздействия низких температур к суспензии клеточной культуры добавляют криопротекторы. Сочетания различных криопротекторов образуют криозащитные среды. В качестве криопротекторов могут быть применены этиленгликоль, глицерин, диметилсульфоксид, сахароза, декстран, пропиленгликоль, альбумин, поливинилпирролидон и сыворотка крови. При проведении работ по криоконсервированию необходимо подобрать криопротектор, обеспечивающий наибольшую выживаемость клеток после хранения и оттаивания. В данной статье представлены результаты экспериментов по сравнению эффективности диметилсульфоксида, этиленгликоля и глицерина при криоконсервировании первично трипсинизированных клеток фибробластов эмбрионов кур. В результате эквilibрации клеточной суспензии (инкубирования при комнатной температуре) с сывороткой и указанными криопротекторами разных концентраций для замораживания были выбраны варианты суспензий, содержащие различные соотношения криопротекторов и сыворотки. Ранее было установлено, что по истечении 12 месяцев наблюдения при использовании в качестве криопротектора диметилсульфоксида наибольшее количество выживших клеток (46%) наблюдалось в суспензии, содержащей 20% фетальной сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Количество выживших клеток при наличии в составе криозащитной смеси 10% фетальной сыворотки и 5% этиленгликоля было несколько ниже и составило 36% по истечении 12 месяцев наблюдения. Было показано, что глицерин обладает слабыми протективными свойствами по отношению к клеткам фибробластов эмбрионов кур. Спустя 8 месяцев хранения количество выживших клеток в суспензии, содержащей 10% сыворотки и 5% глицерина, составило 22%, при последующем хранении живых клеток в данной смеси не выявляли. Пролиферативные свойства клеток и чувствительность их к вирусам сохранялись на протяжении 12 месяцев эксперимента.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, клетки фибробластов эмбрионов кур, криопротекторы

**Благодарности:** Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

**Для цитирования:** Лазарева С. П., Манин Б. Л., Мудрак Н. С., Андрейчук Д. Б. Криоконсервирование первично трипсинизированных клеток фибробластов эмбрионов кур с использованием разных криопротекторов. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (2): 163–168. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-163-168.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Лазарева Светлана Петровна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: [lazareva@arriah.ru](mailto:lazareva@arriah.ru).

## Cryopreservation of primary trypsinized fibroblast cells of chicken embryos using various cryoprotectants

S. P. Lazareva<sup>1</sup>, B. L. Manin<sup>2</sup>, N. S. Mudrak<sup>3</sup>, D. B. Andreychuk<sup>4</sup>

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9540-0001>, e-mail: [lazareva@arriah.ru](mailto:lazareva@arriah.ru)

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5253-1491>, e-mail: [manin\\_bl@arriah.ru](mailto:manin_bl@arriah.ru)

<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9788-9197>, e-mail: [mudrak@arriah.ru](mailto:mudrak@arriah.ru)

<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, e-mail: [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru)

## SUMMARY

Cryopreservation is the optimal way to store cells at ultra-low temperatures. Cryoprotectants are added to cell culture suspension to reduce cell death due to exposure to low temperatures. Cryoprotective media contain combinations of various cryoprotectants. Ethylene glycol, glycerin, dimethyl sulfoxide, sucrose, dextran, propylene glycol, albumin, polyvinylpyrrolidone and blood serum can be used as cryoprotectants. For cryopreservation it is necessary to select a cryoprotectant that

ensures the highest survival of cells after storage and thawing. The paper presents the results of experiments on comparing the effectiveness of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerin in cryopreservation of primary trypsinized chicken embryo fibroblasts. As a result of cell suspension equilibration (incubation at room temperature) with serum and the specified cryoprotectants at different concentrations, the suspension variants containing different cryoprotectant and serum ratios were selected for freezing. Previously, it was found that after 12 months of observation, when using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant, the largest number of surviving cells (46%) was observed in a suspension containing 20% fetal serum and 10% dimethyl sulfoxide. The amount of surviving cells if 10% fetal serum and 5% ethylene glycol were included in the cryoprotective mixture was slightly lower and amounted to 36% after 12 months of observation. Glycerin is shown to have weak protective properties as regards chicken embryo fibroblast cells. After 8 months of storage, the amount of surviving cells in a suspension containing 10% serum and 5% glycerin was 22%, no live cells were found in this mixture if stored longer. The proliferative properties of cells and their sensitivity to viruses remained within the 12 months of the experiment.

**Keywords:** cryopreservation, chicken embryo fibroblast cells, cryoprotectants

**Acknowledgements:** The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

**For citation:** Lazareva S. P., Manin B. L., Mudrak N. S., Andreychuk D. B. Cryopreservation of primary trypsinized fibroblast cells of chicken embryos using various cryoprotectants. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 163–168. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-163-168.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Svetlana P. Lazareva, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: lazareva@arriah.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Криоконсервирование широко используется для длительного хранения живых клеток, тканей, органелл, органов и целых организмов при сверхнизких температурах в течение длительного периода времени (от нескольких месяцев до нескольких лет). В частности, криоконсервирование является оптимальным способом хранения культур клеток кишечнорастворимых [1] и других живых организмов, спермы и эмбрионов млекопитающих и т. д. Также проведен ряд работ по усовершенствованию методов замораживания репродуктивного материала рыб [2, 3]. В последние годы разрабатываются и совершенствуются методы криоконсервирования клеток и тканей человека. Так, сотрудниками ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (г. Санкт-Петербург) был усовершенствован безаппаратный метод криоконсервирования эритроцитов [4]. Учеными Японии был разработан метод криоконсервирования культуры эндотелиальных клеток роговицы глаза человека [5].

Немаловажными являются и разработки по криоконсервированию культур клеток животных и изучению биологических свойств клеток, подвергавшихся заморозке. Сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) были разработаны методы криоконсервирования перевиваемой культуры клеток ВНК-21, первично трипсинизированной культуры клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК), содержащей вирус болезни Марека, первичной культуры клеток костного мозга свиней [6–8]. Специалистами ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань) была проведена работа по изучению биологических свойств перевиваемой культуры клеток легких эмбриона крупного рогатого скота (ЛЕК), подвергнутой криоконсервированию в течение продолжительного времени [9]. Кроме того, опубликованы результаты исследования по криоконсервированию клеток фибробластов эмбрионов кур бройлерной породы [10].

Для проведения работ по криоконсервированию культур клеток важным аспектом является оптимальный подбор криопротектора – вещества, защищающего клетки от повреждающего действия заморозки [6, 11]. Существует два типа криопротекторов: проникающие, которые поступают внутрь клетки (диметилсульфоксид – ДМСО, глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль), и непроникающие, которые создают внешнюю защитную среду для клетки (сахароза, декстран, альбумин, поливинилпирролидон) [11–14]. В сочетании с криопротектором применяются стабилизаторы, которыми чаще всего являются сыворотки крови [6–8, 13]. Известно об использовании в качестве криозащитной среды для клеток фибробластов человека смеси эмбриональной сыворотки, ДМСО и наночастиц золота [15]. В ходе разработки методов криоконсервирования разных видов культур клеток были получены результаты, отражающие высокую степень выживаемости клеток (первичных – около 58%, перевиваемых – более 90%) после замораживания [2, 12]. Существует очень много комбинаций консервирующих сред. Наиболее часто на практике применяется смесь клеточной суспензии, сыворотки и криопротектора [6–8].

Культура клеток ФЭК имеет важное практическое значение в вирусологии и биологической промышленности, поэтому поиск новых, оптимальных комбинаций консервирующих сред при заморозке клеток остается актуальным. Ранее была проведена работа по подбору оптимального сочетания ДМСО и сыворотки для криоконсервирования первично трипсинизированных клеток ФЭК [16], однако с другими криопротекторами подобные исследования не проводились.

Цель данной работы заключалась в изучении защитных свойств различных криопротекторов при криоконсервировании первично трипсинизированных клеток ФЭК и сравнении их эффективности. При этом оценивались такие показатели, как выживаемость клеток после хранения при сверхнизких температурах, пролиферативные свойства и восприимчивость клеток к вирусам после замораживания.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи: выбор сочетания криопротектор-стабилизатор, не являющегося токсичным для клеток; изучение защитных свойств криопротекторов для заморозки суспензии клеток ФЭК, а также изучение пролиферативных свойств и чувствительности культуры клеток к вирусам после заморозки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Выбор оптимального соотношения сыворотки и криопротекторов, добавляемых к клеточной суспензии.* Клеточную суспензию ФЭК для замораживания получали согласно разработанному ранее методу [16, 17]. В качестве криопротекторов применяли ДМСО (Carl Roth, Германия), глицерин (ЗАО «Химреактив», Россия) и этиленгликоль (ЗАО «Химреактив», Россия). Далее готовили комбинации смесей из клеточной суспензии, указанных криопротекторов и фетальной сыворотки (Bio-Clot, Бразилия), используемой в качестве стабилизатора. В таблице 1 приведены варианты криозащитных смесей, включающих разные сочетания криопротекторов и фетальной сыворотки (в процентах от объема суспензии).

Затем проводили эквilibрацию клеточной смеси (инкубирование при комнатной температуре) с криопротекторами и сывороткой, после чего подготовленные для криоконсервирования суспензии закладывали на хранение.

*Оценка жизнеспособности клеток после оттаивания.* Данный этап проводили согласно методу, разработанному ранее [16].

*Изучение чувствительности к вирусам клеток ФЭК, подвергавшихся криоконсервированию.* Испытуемые культуры клеток заражали референтным штаммом ALV-J ADOL-HCl-P7 вируса лейкоза птиц 3-го пассажа (Лаборатория онкологии и болезней птиц, США). По истечении срока инкубации накопление вируса определяли иммуноферментным методом (ИФА) по концентрации вирусспецифического белка p27 с помощью коммерческого набора ProFLOK ALV Plus Ag (Zoetis, США) согласно инструкции по применению [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа по сравнению эффективности различных криопротекторов и оптимизации условий криокон-

**Таблица 1**  
Образцы суспензии клеток ФЭК с добавлением криозащитных веществ

**Table 1**  
Samples of CEF cell suspension supplemented with cryoprotective agents

	10% сыворотки				20% сыворотки			
	5%	10%	15%	20%	5%	10%	15%	20%
Содержание ДМСО	5%	10%	15%	20%	5%	10%	15%	20%
Содержание глицерина	5%	10%	15%	20%	5%	10%	15%	20%
Содержание этиленгликоля	5%	10%	15%	20%	5%	10%	15%	20%

сервирования клеток ФЭК включала в себя следующие этапы: подбор оптимальных соотношений криопротекторов в смеси для консервирования; изучение жизнеспособности и пролиферативных свойств клеток в результате хранения при минус 150 °С в течение 12 месяцев.

Для выполнения первого этапа была проведена эквilibрация суспензий клеток ФЭК, содержащих приведенные выше сочетания криозащитных веществ (табл. 1). Концентрация клеток в исходной клеточной суспензии составила  $(1,10 \pm 0,01) \times 10^7$  кл/см<sup>3</sup>. Результаты работы приведены в таблице 2.

Исходя из полученных результатов, наибольшая выживаемость клеток (70–100%) наблюдалась в следующих вариантах суспензий для криоконсервирования:

- 1) 10% сыворотки и 5% ДМСО (97% выживших клеток);
- 2) 10% сыворотки и 10% ДМСО (97% выживших клеток);
- 3) 10% сыворотки и 15% ДМСО (100% выживших клеток);
- 4) 20% сыворотки и 5% ДМСО (97% выживших клеток);
- 5) 20% сыворотки и 10% ДМСО (100% выживших клеток);
- 6) 20% сыворотки и 15% ДМСО (89% выживших клеток);
- 7) 10% сыворотки и 5% глицерина (90% выживших клеток);
- 8) 10% сыворотки и 5% этиленгликоля (74% выживших клеток).

В остальных образцах количество выживших клеток составляло менее 70%.

Большая часть перечисленных образцов (6 шт.) включала в себя различные соотношения ДМСО и фетальной сыворотки. При эквilibрации клеток ФЭК с этиленгликолем и глицерином для дальнейших

**Таблица 2**

Концентрация клеток в суспензиях для криоконсервирования после эквilibрации, кл/см<sup>3</sup> (n = 3)

**Table 2**

Cell concentration in suspensions for cryopreservation after equilibration, cells/cm<sup>3</sup> (n = 3)

Криопротекторы	10% сыворотки			
	5%	10%	15%	20%
ДМСО	$(1,07 \pm 0,06) \times 10^7$	$(1,07 \pm 0,06) \times 10^7$	$(1,10 \pm 0,00) \times 10^7$	$(6,67 \pm 0,30) \times 10^6$
Глицерин	$(1,00 \pm 0,10) \times 10^7$	$(7,20 \pm 0,26) \times 10^6$	$(6,23 \pm 0,32) \times 10^6$	$(3,26 \pm 0,38) \times 10^6$
Этиленгликоль	$(8,17 \pm 0,15) \times 10^6$	$(7,60 \pm 0,30) \times 10^6$	$(7,60 \pm 0,30) \times 10^6$	$(6,70 \pm 0,17) \times 10^6$
Криопротекторы	20% сыворотки			
	5%	10%	15%	20%
ДМСО	$(1,07 \pm 0,06) \times 10^7$	$(1,10 \pm 0,00) \times 10^7$	$(0,98 \pm 0,1) \times 10^7$	$(7,20 \pm 0,46) \times 10^6$
Глицерин	$(8,17 \pm 0,29) \times 10^6$	$(5,63 \pm 0,47) \times 10^6$	$(3,87 \pm 0,3) \times 10^6$	$(2,60 \pm 0,36) \times 10^6$
Этиленгликоль	$(6,90 \pm 0,00) \times 10^6$	$(6,80 \pm 0,17) \times 10^6$	$(6,03 \pm 0,15) \times 10^6$	$(6,60 \pm 0,26) \times 10^6$

исследований было выбрано по одному образцу из каждой группы. Перечисленные варианты клеточной суспензии были выбраны для исследования жизнеспособности клеток ФЭК в процессе хранения при температуре минус 150 °С. Аликвоты смесей для криоконсервирования, содержащие суспензии клеток, криопротекторы и фетальную сыворотку, объемом 4 см<sup>3</sup> помещали в пенопластовый термоконтейнер и закладывали на хранение в низкотемпературный морозильник при температуре минус 150 °С [16]. Такой метод обеспечивал охлаждение суспензии со скоростью около 1 °С/мин [12]. Оттаивание, подсчет клеток и высеив в культуральные флаконы осуществляли с интервалом в один месяц. Данный этап работы проводили в течение 12 месяцев. Результаты по исследованию выживаемости клеток в результате криоконсервирования минус 150 °С приведены в таблице 3.

Согласно исследованиям, проведенным ранее, наибольшая степень выживаемости первично трипсинизированных клеток ФЭК варьировала от 53 до 71% [16]. По истечении 12 месяцев хранения максимальное количество выживших клеток (46%) наблюдалось при комбинации в клеточной суспензии сыворотки в количестве 20% от объема и ДМСО в количестве 10% от объема. В суспензии, содержащей сыворотку и этиленгликоль в концентрациях 10 и 5% соответственно, количество выживших клеток снизилось до 36%, однако по сравнению с остальными образцами, содержащими различные сочетания ДМСО и сыворотки,

данный показатель был выше. В остальных суспензиях, содержащих ДМСО и фетальную сыворотку, количество живых клеток уменьшилось до 18–26% по истечении 12 месяцев хранения. В образце суспензии, содержащем 10% сыворотки и 5% глицерина, количество живых клеток снизилось до 22% в течение 8 месяцев. По истечении 9 месяцев хранения живых клеток в данном образце выявлено не было. Наименьшее количество выживших клеток наблюдалось в образце, содержащем 10% сыворотки и 15% ДМСО. По истечении одного месяца хранения в данном образце выявили 24% живых клеток, в течение последующих 4 месяцев хранения процент выживших клеток снизился до 19%. По истечении 6 месяцев хранения живых клеток в данной смеси выявлено не было.

Далее проводили изучение пролиферативных свойств клеток ФЭК, подвергавшихся криоконсервированию. После размораживания и подсчета клетки каждого образца разбавляли ростовой средой до концентрации 600 тыс. кл/см<sup>3</sup> и высевали в культуральные флаконы. Ежедневно проводили микроскопическое исследование монослоя, отмечали длительность формирования и степень покрытия рабочей поверхности флакона, которую оценивали в процентах [16].

На рисунке 1 отражены данные, полученные после 1, 3, 6, 9, 12 месяцев хранения. В образцах, содержащих 10% сыворотки и 15% ДМСО, а также 10% сыворотки и 5% глицерина, поверхность флакона была покрыта монослоем не более чем на 50%. В остальных случа-

Таблица 3

Выживаемость клеток ФЭК после хранения при минус 150 °С с применением разных образцов криопротекторов (n = 3)

Table 3

Survivability of CEF cells after storage at minus 150 °C using different cryoprotectant samples (n = 3)

Срок хранения, мес.	10% сыворотки и 5% ДМСО	10% сыворотки и 10% ДМСО	10% сыворотки и 15% ДМСО	20% сыворотки и 5% ДМСО	20% сыворотки и 10% ДМСО	20% сыворотки и 15% ДМСО	10% сыворотки и 5% глицерина	10% сыворотки и 5% этиленгликоля
До хранения	10,0 ± 0,1	13,0 ± 0,1	9,0 ± 0,2	11,0 ± 0,3	8,0 ± 0,1	12,0 ± 0,3	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1
1	3,3 ± 0,4 (33%)	4,9 ± 0,3 (37%)	<b>2,9 ± 0,2 (24%)</b>	4,2 ± 0,4 (38%)	<b>5,2 ± 0,3 (65%)</b>	5,7 ± 0,4 (47%)	<b>2,7 ± 0,2 (34%)</b>	<b>4,3 ± 0,2 (52%)</b>
2	2,9 ± 0,3 (29%)	4,3 ± 0,4 (33%)	2,9 ± 0,2 (24%)	4,0 ± 0,3 (36%)	4,9 ± 0,1 (61%)	4,9 ± 0,3 (41%)	2,5 ± 0,2 (31%)	3,5 ± 0,5 (43%)
3	2,9 ± 0,1 (29%)	4,0 ± 0,4 (31%)	2,1 ± 0,2 (23%)	4,0 ± 0,2 (36%)	4,6 ± 0,1 (57%)	4,8 ± 0,5 (40%)	2,5 ± 0,1 (31%)	3,3 ± 0,5 (41%)
4	2,8 ± 0,3 (28%)	3,0 ± 0,4 (23%)	2,1 ± 0,1 (23%)	4,0 ± 0,3 (36%)	4,3 ± 0,2 (54%)	4,2 ± 0,4 (35%)	2,4 ± 0,1 (30%)	3,3 ± 0,2 (41%)
5	2,6 ± 0,4 (26%)	3,0 ± 0,2 (23%)	<b>1,7 ± 0,3 (19%)</b>	4,0 ± 0,2 (36%)	4,3 ± 0,2 (54%)	4,1 ± 0,4 (34%)	2,1 ± 0,1 (26%)	3,2 ± 0,2 (40%)
6	2,5 ± 0,2 (25%)	3,0 ± 0,3 (23%)	0	4,0 ± 0,3 (36%)	4,2 ± 0,1 (52%)	4,0 ± 0,3 (33%)	2,1 ± 0,3 (26%)	3,1 ± 0,4 (39%)
7	2,3 ± 0,2 (23%)	3,0 ± 0,2 (23%)	0	4,0 ± 0,2 (36%)	4,0 ± 0,2 (50%)	4,0 ± 0,1 (33%)	2,0 ± 0,3 (25%)	3,0 ± 0,2 (37%)
8	2,2 ± 0,1 (22%)	3,0 ± 0,1 (23%)	0	3,8 ± 0,2 (34%)	4,0 ± 0,3 (50%)	3,9 ± 0,3 (32%)	<b>1,8 ± 0,3 (22%)</b>	3,0 ± 0,3 (37%)
9	2,0 ± 0,1 (20%)	3,0 ± 0,3 (23%)	0	3,5 ± 0,4 (32%)	3,9 ± 0,2 (49%)	3,9 ± 0,1 (32%)	0	3,0 ± 0,1 (37%)
10	1,8 ± 0,1 (18%)	3,0 ± 0,1 (23%)	0	3,5 ± 0,2 (32%)	3,9 ± 0,1 (49%)	3,7 ± 0,3 (31%)	0	3,0 ± 0,1 (37%)
11	1,8 ± 0,3 (18%)	2,9 ± 0,4 (22%)	0	3,2 ± 0,2 (29%)	3,8 ± 0,2 (47%)	3,6 ± 0,1 (30%)	0	2,9 ± 0,2 (36%)
12	1,8 ± 0,1 (18%)	2,3 ± 0,4 (18%)	0	2,9 ± 0,3 (26%)	<b>3,7 ± 0,1 (46%)</b>	3,2 ± 0,3 (26%)	0	<b>2,9 ± 0,1 (36%)</b>

ях с 1-го по 11-й месяц хранения степень покрытия поверхности культурального флакона монослоем клеток ФЭК составляла 90–100%. По завершении 12 месяцев хранения данный показатель составил 80%. Полученные значения являются оптимальными для образования полноценного монослоя культуры клеток.

Время формирования монослоя из всех образцов клеток ФЭК составляло 2–3 сут, что является оптимальным сроком для данного процесса.

Завершающим этапом данной работы было изучение восприимчивости к вирусам клеток ФЭК после воздействия низких температур. Клетки ФЭК, хранившиеся при температуре минус 150 °С, оттаивали и высевали в культуральные флаконы для формирования монослоя. Одновременно в качестве контроля использовали первично трипсинизированную культуру клеток ФЭК. Сформированный монослой заражали референтным штаммом вируса лейкоза птиц ALV-J ADOL-HCI-P7. Образцы клеточной суспензии, содержащие 10% сыворотки и 15% ДМСО, а также 10% сыворотки и 5% глицерина, не использовались для проведения данного этапа работы ввиду слабых пролиферативных свойств. По окончании срока инкубации измеряли концентрацию вирусспецифического белка p27 с помощью сэндвич-ИФА.

На рисунке 2 в качестве примера приведены данные, полученные после 1, 3, 6, 9, 12 месяцев хранения образцов клеток. Величина стандартного отклонения колебалась в пределах 0,2–0,4. Накопление вируса наблюдалось как в первично трипсинизированной культуре клеток ФЭК, так и в монослое, полученном из суспензии клеток ФЭК, подвергавшихся криоконсервированию. Концентрация вирусного белка составляла 5–8 мкг/см<sup>3</sup>. На протяжении всего срока исследования в ряде образцов наблюдалось незначительное снижение концентрации вирусного белка по сравнению с первично трипсинизированной культурой клеток ФЭК. Наименьшее расхождение данного показателя с величиной, полученной для первично трипсинизированной культуры клеток ФЭК, наблюдалось в образце, содержащем 10% сыворотки и 5% этиленгликоля.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы было выявлено, что для хранения суспензии клеток ФЭК в условиях глубокой заморозки наиболее оптимальными соотношениями сыворотки и криопротектора является сочетание 20% фетальной сыворотки и 10% ДМСО. В образце клеточной суспензии, содержащем 10% фетальной сыворотки и 5% этиленгликоля, количество выживших клеток было несколько ниже, однако оно превышало аналогичный показатель в других образцах. Добавление в клеточную суспензию глицерина не обеспечивало достаточной степени защиты клеток от разрушающего действия сверхнизких температур. Проллиферативные свойства клеток и чувствительность к вирусу лейкоза птиц сохранялись в следующих комбинациях криопротекторов: с содержанием 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота и 5, 10% ДМСО, 20% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота и 5, 10, 15% ДМСО, а также 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота и 5% этиленгликоля. Образцы криопротекторов, содержащие 10% сыворотки и 15% ДМСО, а также 10% сыворотки и 5% глицерина, показали наименьшие протективные свойства.

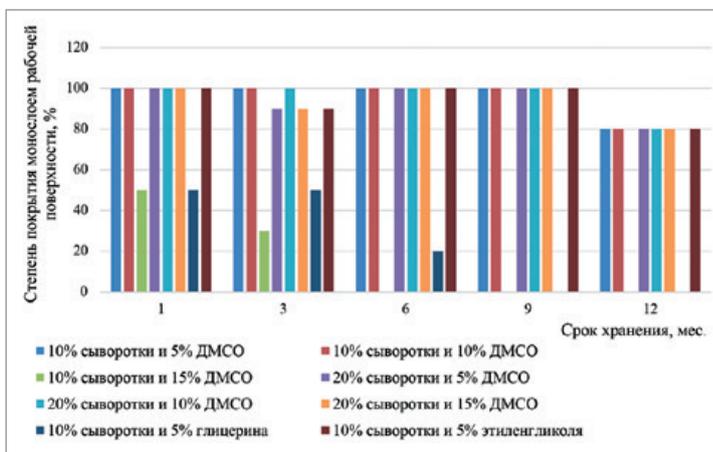


Рис. 1. Уровень образования (формирования) клеточного монослоя после разморозки

Fig. 1. Development (formation) of cell monolayer upon thawing

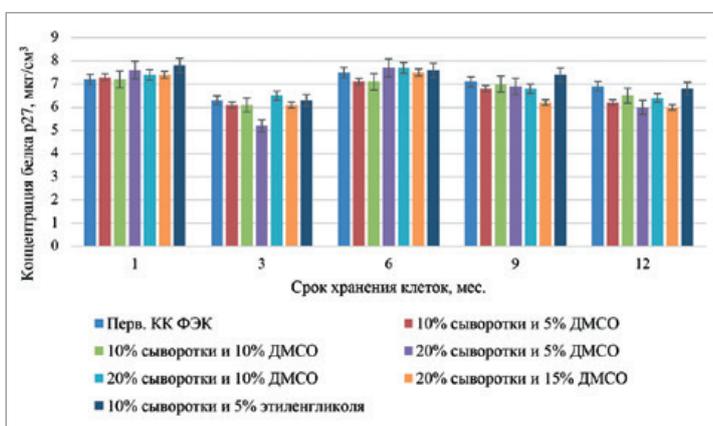


Рис. 2. Концентрация вирусного белка p27 после заражения образцов клеток ФЭК штаммом ALV-J ADOL-HCI-P7, мкг/см<sup>3</sup> (n = 3)

Fig. 2. Concentration of p27 viral protein after infection of CEF cell samples with ALV-J ADOL-HCI-P7 strain, µg/cm<sup>3</sup> (n = 3)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fricano C., Röttinger E., Furla P., Barnay-Verdier S. Cnidarian cell cryopreservation: A powerful tool for cultivation and functional assays. *Cells*. 2020; 9 (12):2541. DOI: 10.3390/cells9122541.
- Белая М. М., Красильникова А. А., Пономарева Е. Н. Разработки Южного научного центра РАН в области криоконсервации репродуктивных клеток рыб. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2018; 20 (5-2): 280–286. eLIBRARY ID: 37118879.
- Кибалова М. В., Селюкова С. А., Селюков А. Г. Сохранение ценных, редких и исчезающих видов животных. 2. Криоконсервация позвоночных. *Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование*. 2017; 3 (3): 141–157. DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-3-141-157.
- Кирьянова Г. Ю., Четкин А. В., Гришина Г. В., Касьянов А. Д., Красильникова И. В. Усовершенствованный безаппаратный метод криоконсервирования эритроцитов. *Трансфузиология*. 2020; 21 (2): 115–128. eLIBRARY ID: 45825626.
- Okumura N., Kagami T., Watanabe K., Kadoya S., Sato M., Koizumi N. Feasibility of a cryopreservation of cultured human corneal endothelial cells. *PLoS One*. 2019; 14 (6):e0218431. DOI: 10.1371/journal.pone.0218431.
- Манин Б. Л. Криоконсервирование и культивирование клеточных линий – две фазы существования биологических объектов. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2008; 6: 390–405. eLIBRARY ID: 14933114.
- Курненко Е. В., Куляшбекова Ш. К. Криоконсервирование клеток, содержащих вирус болезни Марекка. *Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных: материалы II Междуна-*

родной научно-практической конференции (г. Ставрополь, 22–24 октября 2003 г.). Ставрополь: Агрус; 2003; 349–354. eLIBRARY ID: 25608061.

8. Жуков И. Ю., Шевченко И. В., Власова Н. Н., Варенцова А. А., Манин Б. Л., Пузанкова О. С. и др. Изучение репродукции вируса африканской чумы свиней на первичной культуре клеток костного мозга свиней до и после криоконсервирования. *Ветеринария сегодня*. 2016; (1): 7–15.

9. Плотникова Э. М., Архарова И. А., Самсонов А. И., Чурина З. Г. Изучение биологических свойств культуры клеток, подвергнутой длительной криоконсервации. *Ветеринарный врач*. 2018; 2: 7–11. eLIBRARY ID: 32786366.

10. Guan W., Wang D., Bai C., Zhang M., Li C., Ma Y. Biological characteristic of an embryonic fibroblast line from Xiaoshan chicken for genetic conservation. *Journal of Cell and Animal Biology*. 2012; 6 (4): 46–53. DOI: 10.5897/JCAB11.089.

11. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). Под ред. Л. П. Дьяконова, В. И. Ситькова. М.: Спутник+; 2000. 400 с.

12. Цуцаева А. А., Петренко Т. Ф. Криоконсервация культивируемых клеток животных. В кн.: *Методы культивирования клеток: Сборник научных трудов*. Ред. Г. П. Пинаев. Л.: Наука; 1988; 63–69.

13. Криоконсервирование клеточных суспензий. Под ред. А. А. Цуцаевой. Киев: Наукова Думка; 1983. 240 с.

14. Greene A. E., Athreya B., Lehr H. B., Coriell L. L. Prolonged storage of cells in dimethyl sulphoxide and glycerol at varying temperatures. *Cryobiology*. 1967; 3 (5): 383–384. DOI: 10.1016/S0011-2240(67)80115-9.

15. Павлович Е. В., Волкова Н. А., Гольцев А. Н. Криоконсервирование фибробластов человека в присутствии наночастиц золота. *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: материалы Международной заочной научно-практической конференции (24 марта 2014 г.)*. Сыктывкар; 2014; 203–208. Режим доступа: <http://physiol.komisc.ru/kriokonf.pdf>.

16. Лазарева С. П., Манин Б. Л. Криоконсервирование первично трипсинизированных клеток фибробластов кур. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2016; 14: 177–192. eLIBRARY ID: 30095812.

17. Старов С. К., Герасимова Н. И., Евсеев А. М., Сарбасов А. Б. Культивирование вакцинного штамма S1133 реовируса птиц в субкультуре клеток куриных фибробластов. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2005; 3: 400–405. eLIBRARY ID: 24397208.

## REFERENCES

1. Fricano C., Röttinger E., Furla P., Barnay-Verdier S. Cnidarian cell cryopreservation: A powerful tool for cultivation and functional assays. *Cells*. 2020; 9 (12): 2541. DOI: 10.3390/cells9122541.

2. Belaya M. M., Krasilnikova A. A., Ponomareva E. N. The developments of Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences in the field of cryopreservation of reproductive cells of fish. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj Akademii nauk*. 2018; 20 (5-2): 280–286. eLIBRARY ID: 37118879. (in Russ.)

3. Kibalova M. V., Selyukova S. A., Selyukov A. G. Preservation of valuable, rare and endangered species of animals. 2. Cryoconservation of the vertebrates. *Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology*. 2017; 3 (3): 141–157. DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-3-141-157. (in Russ.)

4. Kiryanova G. U., Chechetkin A. V., Grishina G. V., Kasyanov A. D., Krasilshchikova I. V. Improved non-apparatus method of erythrocyte cryopreservation. *Transfusiology*. 2020; 21 (2): 115–128. eLIBRARY ID: 45825626. (in Russ.)

5. Okumura N., Kagami T., Watanabe K., Kadoya S., Sato M., Koizumi N. Feasibility of a cryopreservation of cultured human corneal endothelial

cells. *PLoS One*. 2019; 14 (6): e0218431. DOI: 10.1371/journal.pone.0218431.

6. Manin B. L. Cryopreservation and cultivation of cell lines are the two stages of biological objects existence. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2008; 6: 390–405. eLIBRARY ID: 14933114. (in Russ.)

7. Kurnenkova E. V., Kulyashbekova Sh. K. Kriokonservirovanie kletok, sodержashchikh virus bolezni Mareka = Cryopreservation of cells containing Marek's disease virus. *Aktual'nye voprosy zootehnicheskoi nauki i praktiki kak osnova uluchsheniya produktivnykh kachestv i zdorov'ya sel'skokozyaistvennykh zhivotnykh: materialy II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (g. Stavropol', 22–24 oktyabrya 2003 g.) = Topical issues of zootechnical science and practice as a basis for improving productive qualities and health of farm animals: materials of II International Scientific and Practical Conference (Stavropol, October 22–24, 2003)*. Stavropol: AGRUS; 2003; 349–354. eLIBRARY ID: 25608061. (in Russ.)

8. Zhukov I. Yu., Shevchenko I. V., Vlasova N. N., Varentsova A. A., Manin B. L., Puzankova O. S., et al. Study of african swine fever virus reproduction in porcine primary bone marrow cell culture before and after cryopreservation. *Veterinary Science Today*. 2016; (1): 7–15. (in Russ.)

9. Plotnikova E. M., Arkharova I. A., Samsonov A. I., Churina Z. G. The biological properties of cell cultures after long-term cryopreservation. *Veterinarny Vrach*. 2018; 2: 7–11. eLIBRARY ID: 32786366. (in Russ.)

10. Guan W., Wang D., Bai C., Zhang M., Li C., Ma Y. Biological characteristic of an embryonic fibroblast line from Xiaoshan chicken for genetic conservation. *Journal of Cell and Animal Biology*. 2012; 6 (4): 46–53. DOI: 10.5897/JCAB11.089.

11. Animal cell in culture (methods and implementation in biotechnology). Ed. by L. P. Dyakonov, V. I. Sitkov. Moscow: Sputnik+; 2000. 400 p. (in Russ.)

12. Tsutsayeva A. A., Petrenko T. F. Kriokonservatsiya kul'tiviruemykh kletok zhivotnykh = Cryopreservation of cultured animal cells. In: *Methods of cell culture: Collection of scientific papers*. Ed. by G. P. Pinaev. Leningrad: Nauka; 1988; 63–69. (in Russ.)

13. Cryopreservation of cell culture. Ed. by A. A. Tsutsayeva. Kyiv: Naukova Dumka; 1983. 240 p. (in Russ.)

14. Greene A. E., Athreya B., Lehr H. B., Coriell L. L. Prolonged storage of cells in dimethyl sulphoxide and glycerol at varying temperatures. *Cryobiology*. 1967; 3 (5): 383–384. DOI: 10.1016/S0011-2240(67)80115-9.

15. Pavlovich E. V., Volkova N. A., Goltsev A. N. Kriokonservirovanie fibroblastov cheloveka v prisutstvii nanochastits zolota = Cryopreservation of human fibroblasts in the presence of gold nanoparticles. *Teoreticheskie i prakticheskie aspekty sovremennoi kriobiologii: materialy Mezhdunarodnoi zaachnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (24 marta 2014 g.) = Theoretical and practical aspects of modern cryobiology: proceedings of the International Correspondence Scientific and Practical Conference (March 24, 2014)*. Syktvykar; 2014; 203–208. Available at: <http://physiol.komisc.ru/kriokonf.pdf>. (in Russ.)

16. Lazareva S. P., Manin B. L. Cryoconservation of primary trypsinized chick embryo fibroblast cells. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2016; 14: 177–192. eLIBRARY ID: 30095812. (in Russ.)

17. Starov S. K., Gerasimova N. I., Yevseyev A. M., Sarbasov A. B. Cultivation of avian reovirus S1133 vaccine strain in chicken embryo fibroblast subculture. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2005; 3: 400–405. eLIBRARY ID: 24397208. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 10.02.2022

Поступила после рецензирования / Revised 05.04.2022

Принята к публикации / Accepted 15.04.2022

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Лазарева Светлана Петровна**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Манин Борис Леонидович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора культивирования клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Мудрак Наталья Станиславовна**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Андрейчук Дмитрий Борисович**, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Svetlana P. Lazareva**, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Boris L. Manin**, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Natalia S. Mudrak**, Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry B. Andreychuk**, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.