

Прогнозирование осмотического поведения клеток при замораживании и их сохранности после отогрева

Н.А. ЧЕРНОБАЙ, И.Ф. КОВАЛЕНКО, Г.А. БОЖОК, А.В. ПАХОМОВ, Л.Ф. РОЗАНОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Forecasting of Osmotic Behavior of Cells During Freezing and their Post-Thaw Survival

N.A. CHERNOBAY, I.F., KOVALENKO, G.A. BOZHOK, A.V. PAKHOMOV, L.F. ROZANOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В работе с помощью модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского [Гордиенко Е. А. и др., 2008] на основе определенных геометрических и транспортных характеристик клеток интерстиция тестисов (КИТ) в растворах криопротекторов [Чернобай Н.А. и др., 2010] прогнозировали осмотическое поведение этих клеток на разных этапах криоконсервирования и сохранность КИТ после отогрева.

В работе оценена сохранность КИТ после криоконсервирования с растворами глицерина (7%), ДМСО (10%), ЭГ (7%) и диметилформамида (ДМФА) 5% с использованием скоростей охлаждения 1, 5 и 10 град/мин до -40°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Показано, что глицерин обеспечивает достаточно высокую (до 75%) сохранность клеток после замораживания. Замораживание с применением растворов ДМСО и ЭГ со скоростью охлаждения 1 град/мин обеспечивает сохранность КИТ до 59%, со скоростями 5–10 град/мин – до 72%. Наиболее высокие значения сохранности (83%) получены при криоконсервировании клеток со скоростью охлаждения 10 град/мин с использованием ДМФА.

Прогнозирование осмотического поведения КИТ на этапе замораживания с различными скоростями охлаждения показало, что при охлаждении со скоростью 1 град/мин в присутствии ДМСО обезвоживание клеток завершается к -10°C , в присутствии ЭГ и ДМФА – к -20°C . При использовании глицерина достижение минимального объема клеток наблюдается к -45°C . Увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин в присутствии всех исследуемых веществ расширяет температурный диапазон обезвоживания КИТ. При охлаждении со скоростью 100 град/мин степень обезвоживания клеток незначительна, что может привести к внутриклеточной кристаллизации и стать причиной повреждения клеток.

Результаты прогнозирования позволяют дать следующее объяснение повышению сохранности клеток при повышении скорости охлаждения до 10 град/мин в присутствии ДМСО, ЭГ и ДМФА. Охлаждение со скоростью 1 град/мин сопряжено с длительным нахождением клеток в обезвоженном состоянии, что может стать причиной их гибели в результате осмотического стресса. Увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин снижает время экспозиции клеток в дегидратированном состоянии, исключая одновременно и внутриклеточную кристаллизацию, и осмотический стресс. Вместе с тем, очевидно, что дальнейшее увеличение скорости охлаждения до 100 град/мин, хотя и позволяет избежать длительного действия гипертонии, наблюдающейся при медленных скоростях, может привести к значительному переохлаждению клеток и возникновению внутриклеточной кристаллизации.

By means of modified Kedem-Kachalsky physical and mathematical model [Gordienko E.A. *et al.* 2008] and basing of certain geometrical and transport characteristics of testes interstitial cells (TICs) in cryoprotectant solutions [Chernobay N.A. *et al.* 2010] in this research we forecasted the osmotic behaviour of mentioned cells at different stages of cryopreservation and TIC survival after thawing.

In the research we estimated the TIC survival after cryopreservation in the solutions of glycerol (7%), DMSO (10%), EG (7%) and 5% dimethyl formamide (DMFA) using cooling rates of 1, 5 and 10 deg/min down to -40°C with following plunging of the samples into liquid nitrogen. Glycerol has been shown to provide quite a high (up to 75%) cell survival after freeze-thawing. After freeze-thawing in solutions of DMSO and EG using cooling rate of 1 deg/min provided the TICs survival up to 59% and in the case of 5–10 deg/min it was up to 72%. The highest survival (83%) was obtained when freeze-thaw the cells using cooling rate of 10 deg/min and DMFA solution.

Forecasting of osmotic behaviour of TICs at stage of freezing when using various cooling rates has shown that during cooling with the rate of 1 deg/min in DMSO presence the cell dehydration terminates at -10°C and in the presence of EG and DMFA does at -20°C . When using glycerol, the achieving the minimum volume of cells is observed at about -45°C . The rise in cooling rate up to 10 deg/min in the presence of all the studied substances extends the temperature range of TIC dehydration. When cooling with the rate of 100 deg/min the dehydration degree of cells is insignificant, likely leading to intracellular crystallization and be the cause of cell damage.

The results of forecasting allowed to explain rise in cell survival after increasing the cooling rate up to 10 deg/min in the presence of DMSO, EG and DMFA. Cooling with the rate of 1 deg/min is related to long-term exposure of cells to dehydration, which might be the cause of their death because of osmotic stress. Increased cooling rate up to 10 deg/min reduced the time of cell exposure in dehydrated state, excluding simultaneously both intracellular crystallization and osmotic stress. Along with this it is evident that further rise of cooling rate up to 100 deg/min even if allows the avoiding of lasting effect of hypertonia observed at slow rates may lead to significant overcooling of cells and appearance of cell crystallization.