

роциты, криоконсервированные с ДМСО, в сравнении с ПЭО-1500, проявляют высокую

устойчивость (на уровне контроля) в модели трансфузии.

SUMMARY

The viability of horse's, bull's, dog's erythrocytes after cryopreservation with cryoprotectants have been studied. The results obtained in the work testify to the fact, that DMSO is the most efficient cryoprotectant during cryopreservation for horse, bull and dog erythrocytes. PEO-1500 is capable to preserve cells during cryopreservation, but after transferring such frozen-thawed cells under physiological conditions they undergo damages.

Литература

1. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. М.: Медицина, 1983. 96 с.
2. Бабійчук Л.О., Землянських Н.Г., Кузьміна Л.М. Новий метод криоконсервування еритроцитів для клінічної практики // Трансплантологія. 2000, Т. 1, № 1. С. 296–298.
3. Мокеев И. Н. Инфузионно-трансфузионная терапия: Справочник. М. 1998. 232 с.
4. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. Киев: Наукова думка, 1978. 204 с.

С.И. Дрокин, Б.Б. Дзюба, Т.М. Гурина, Е.А. Гордиенко, П. Тодоров

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

ОСОБЕННОСТИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ СУСПЕНЗИЙ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ОСМОТИЧЕСКИ НЕАКТИВНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

При разработке методов криоконсервации спермы рыб разные авторы использовали различную степень ее разбавления криозащитной средой. Обычно используется разведение 1:1, однако имеются публикации в которых сперму разводили 1:3 [4], 1:5 [3] или даже 1:9 [5]. Степень разведения вероятно подбиралась эмпирически и до настоящего времени нам не известны аргументированные объяснения зависимости выживания клеток после криоконсервации от их концентрации в суспензии.

Известно, что при добавлении проникающего криопротектора к клеточной суспензии по истечении некоторого промежутка времени его концентрация вне и внутри клеток становится одинаковой [1]. Однако, при этом не учитывается, что клетки могут содержать осмотически неактивные внутриклеточные структуры, которые недоступны для криопротектора в качестве растворителя, и, если концентрация этих клеток достаточно высока, то наличие осмотически неактивных внутриклеточных структур может существенно повлиять на осмотическое давление окружающей клетки среды и температуру ее кристаллизации.

Процесс перераспределения проника-

ющего через клеточную мембрану криопротектора между клеткой и окружающей ее криозащитной средой описывается модифицированным уравнением [2]:

$$\frac{d}{dt} n^{in} = -\frac{1}{y \cdot \alpha} [\gamma k (n^{in} - n^{out}) + \sigma n^{in} \frac{dV}{dt}], \quad (1)$$

где n^{in} , n^{out} – молярная концентрация криопротектора в клетке и во внеклеточной среде соответственно, t – время, y – относительный объем клетки (отношение текущего объема клетки V к его начальному значению), α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных компонентов, γ – поверхностно-объемное отношение клетки, k – коэффициент проницаемости клеточной мембраны для криопротектора, σ – коэффициент отражения клеточной мембраны для молекул криопротектора. Если в криозащитный раствор с концентрацией криопротектора

$$n_s = \frac{N_s}{V_s}$$

(N_s – количество молей криопротектора в этом растворе, V_s – объем криозащитного раствора) внести N клеток с изотоническим объемом V_0 , то по истечении промежутка времени порядка $(\gamma k)^{-1}$ концентрации криопротектора вне и внутри клеток становятся одинаковыми и равными:

$$n_{\infty}^{\text{in}} = n_{\infty}^{\text{out}} = n_{\infty} = \frac{N_s}{NV_0(1-\sigma) + V_s} = - \frac{n_s}{1 + \frac{NV_0}{V_s}(1-\sigma)}, (2)$$

Обычно в криобиологии используется понятие так называемой конечной концентрации криопротектора в клеточной суспензии:

$$N_k = \frac{N_s}{NV_0 + V_s} = \frac{n_s}{1 + \frac{NV_0}{V_s}},$$

то есть считается, что при смешении раствора с концентрацией N_s с клетками в отношении

$$\frac{N_s}{NV_0} = \frac{1}{m}$$

конечная концентрация раствора в суспензии составляет $\frac{n_s}{1+m}$.

С учетом определения (2) получаем

$$n_{\infty} = \frac{n_k(1+m)}{1+m(1-\gamma)}$$

Т.е., реальная концентрация криопротектора в клеточной суспензии при одной и той же конечной концентрации увеличивается с ростом объемной доли осмотически неактивных внутриклеточных структур α и с увеличением объемной доли клеток m в суспензии.

Температура кристаллизации клеточной суспензии при ее замораживании определяется, реальной концентрацией N_{∞} и, кроме того, зависит от двух параметров: α и m . Поскольку на диаграмме плавления

$$T_{\text{кр}} = T_{\text{кр}}(n^{\text{out}}) \frac{dT_{\text{кр}}}{dn^{\text{out}}} > 0,$$

то при заданных n_k и m температура кристаллизации будет уменьшаться с увеличением объемной доли клеток в суспензии m и с увеличением объемной доли осмотически неактивных внутриклеточных отсеков α , причем этот эффект будет более выраженным в области больших конечных концентраций криопротектора, так как производная $\frac{dT_{\text{кр}}}{dn^{\text{out}}}$

при этом будет принимать большее по абсолютной величине значение. Поскольку значение m и n_s контролируется экспериментатором и концентрация n_{∞}^{out} , соответствующая измеренной температуре кристаллизации, определяется по известной диаграмме плавления криозащитного раствора, то по формуле (2) можно определить объемную долю осмотически неактивных внутриклеточных отсеков, измеряя температуру кристаллизации клеточной суспензии. Если диаграмма плавления кри-

озащитного раствора $n = n(T_{\text{кр}})$ известна, то, экспериментально измеряя $T_{\text{кр}}$, находим

$$n(T_{\text{кр}}) = \frac{n_{\text{кр}}(1+n)}{1+m(1-\alpha)},$$

откуда определяется α .

Таким образом, суммируя теоретические выкладки, можно утверждать, что реальная концентрация криопротектора в клеточной суспензии увеличивается при увеличении объемной доли клеток, содержащих осмотически неактивные внутриклеточные структуры. И т.к. температура кристаллизации клеточной суспензии при ее замораживании определяется реальной концентрацией криопротектора, температура кристаллизации будет уменьшаться с увеличением объемной доли клеток, содержащих осмотически неактивные внутриклеточные структуры, за счет увеличения реальной концентрации криопротектора в окружающей клетки среде.

В связи с тем, что спермий имеют очень большую осмотически неактивную составляющую (ядро), для проверки вышеизложенной гипотезы была выбрана суспензия спермиев карпа. Сперма была разбавлена собственной плазмой, содержащей криопротектор – этиленгликоль (ЭГ). При этом варьировалась концентрация клеток в суспензии, а количество вносимого ЭГ и конечный объем замораживаемой суспензии оставались постоянными. Рассчитанная на объем суспензии концентрация ЭГ составляла 1.6 М. Разбавленную сперму охлаждали парами жидкого азота в программном замораживателе. Скорость охлаждения от комнатной температуры до -40°C была постоянной и составляла $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В качестве упаковки для образцов выбрали криоампулы фирмы Nunk объемом 1 мл. Объем замораживаемого образца составлял 0,5 мл.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что температура кристаллизации замораживаемой суспензии спермиев существенно снижается при увеличении объемной доли клеток (рис.).

Результаты, приведенные в таблице, показывают, насколько сильно может изменяться температура кристаллизации суспензии клеток в зависимости от их концентрации. Очевидно, что для оптимизации технологии криоконсервации высококонцентрированных клеточных суспензий необходимо учитывать концентрацию клеток в суспензии, если они содержат значимые объемы осмотически неактивных

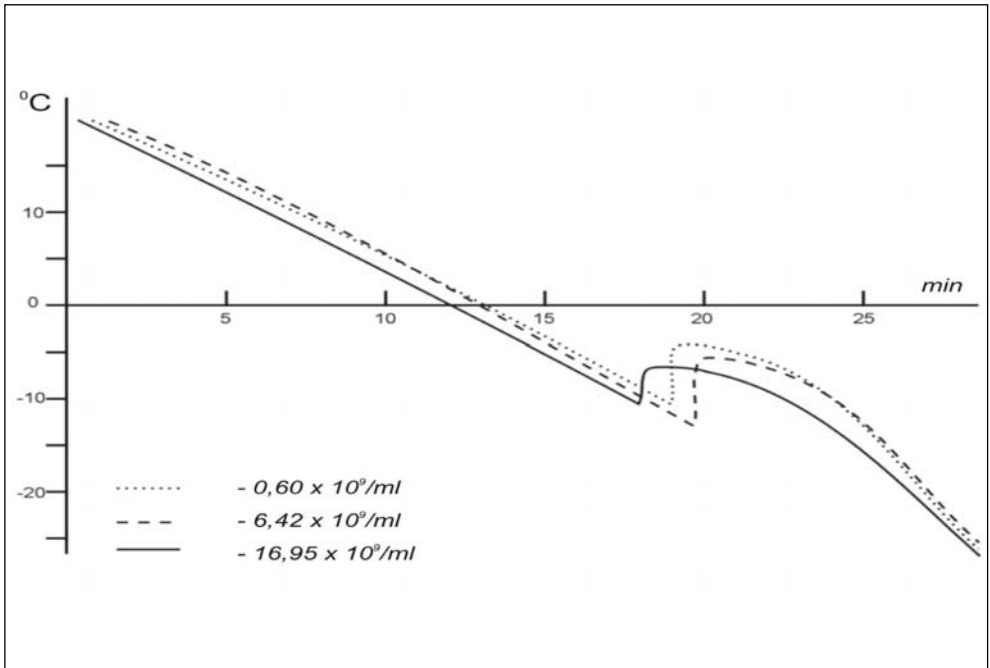


Рисунок. Термограмма низкотемпературного замораживания суспензии спермы карпа, содержащей различную концентрацию клеток

Таблица

Зависимость температуры кристаллизации суспензии спермы карпа от концентрации клеток

Конц. млрд/мл	Семенная плазма с ЭГ	0,58±0,11	0,89±0,15	6,35±0,46	16,63±0,56
Т кр. -°C		4,8±0,4	5,1±0,1	5,7±0,6	6,58±0,65

($P \leq 0,05$)

внутриклеточных структур. То есть, если концентрация таких клеток выше того значения, для которого был раньше оптимизирован метод криоконсервации, то соответственно концентрацию веществ, составляющих криозащитный раствор и влияющий на температуру кристаллизации, необходимо понизить и наоборот. Это в частности важно учитывать для спермы карпа, у которой мы часто наблюдаем большие

колебания концентрации спермиев

Мы также предполагаем, что, измеряя температуру кристаллизации клеточной суспензии, можно оценить объемную долю осмотически неактивных внутриклеточных структур. Это может послужить основанием для разработки нового криоскопического метода определения объемной доли осмотически неактивных внутриклеточных структур.

Литература

- Gordienko EA, Пушкарь НС (1994). Физиологические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий, Наукова думка, Киев. С. 103-104.
- Gordienko EA, Gordienko YuE, Gordienko OI (2003) *Cryoletters* 24, 229-224.
- Harvey B (1983) *Aquaculture* 32, 313-320.
- Legendre M, Billard R. (1980) *Reprod. Nutr. Develop* 20, 1859-1868.
- Magyary I, Urbanyi B, Horvath L (1996). *J. Appl. Ichthyol* 12, 113-115.