

Использование протоколов криоконсервирования с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева для клеток интерстиция взрослых крыс

А.В. ПАХОМОВ, Т.М. ГУРИНА, Г.А. БОЖОК, А.Л. КИРИЛЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Cryopreservation Protocols with Controlled Cooling-Heating Rates for Adult Rat Interstitial Cells

A.V. PAKHOMOV, T.M. GURINA, G.A. BOZHOK, A.L. KIRILYUK

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Скорости охлаждения и нагрева являются одним из решающих факторов криоконсервирования, оказывающих влияние на жизнеспособность клеточной суспензии и сохранность функциональной способности стероидогенных клеток. Криобиологические исследования направлены на поиск оптимального сочетания скоростей охлаждения-нагрева для разработки режимов замораживания-оттаивания, позволяющих максимально сохранить гормонопродуцирующую составляющую тестисов – клеток Лейдига.

Цель данной работы – исследовать эффективность применения протоколов криоконсервирования с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева в температурных интервалах, связанных с фазовыми превращениями, для клеток интерстиция взрослых крыс.

Методом термопластической деформации определены температурные интервалы фазовых преобразований для криозащитного раствора (10%-й раствор ДМСО на среде 199 с 20 мМ HEPES), используемого при криоконсервировании клеток интерстиция тестисов взрослых крыс, а именно: кристаллизация (плавления) основной массы льда, кристаллизация (плавления) смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, кристаллизация (плавления) эвтектики растворителя на основе культуральной среды, а также рекристаллизация перед соответствующими процессами плавления на этапе нагрева. Замораживание и оттаивание образцов осуществляли в программном замораживателе «Cryoson», комбинируя высокие (20 град/мин) и низкие (1 град/мин) скорости охлаждения-нагрева в указанных температурных интервалах. В качестве контроля использовали оттаивание образцов на водяной бане 40°C. При анализе результатов подсчитывали сохранность количества клеток после криоконсервирования, а также количество клеток с неповрежденной клеточной мембраной в зависимости от вариаций скоростей охлаждения-нагрева в температурных интервалах фазовых преобразований.

Впервые разработан единый протокол замораживания-оттаивания, предусматривающий определенное сочетание высоких и низких контролируемых скоростей охлаждения-нагрева в указанных температурных интервалах. Этот протокол позволил получить высокие показатели сохранности и функциональной активности как клеток общей суспензии (56,7%), так и сохранности отдельной популяции – клеток Лейдига (78,7%).

Вследствие исключения субъективного фактора при оттаивании клеточной суспензии на водяной бане, полученные результаты имеют хорошую повторяемость. Предложенная методика имеет универсальный характер и может быть использована вне зависимости от вида биологического объекта и состава криозащитной среды для криоконсервирования различных видов клеток.

Cooling and heating rates are essential factors in cryopreservation, affecting the cell suspension viability and preservation of functional capability in steroidogenic cells. Cryobiological researches are aimed to find the optimal combination of cooling and heating rates for designing the freeze-thawing regimens, enabling the maximum preservation of hormone-producing component of testes, Leydig cells.

The aim of this research was to investigate the application efficiency of cryopreservation protocols with the controlled cooling-heating rates within temperature intervals, associated with phase transitions for interstitial cells of adult rats.

Using the thermoplastic deformation method we determined the temperature intervals of phase transitions for cryoprotective solution (10% DMSO in medium 199 with 20 mM HEPES), used for cryopreservation of testicular interstitial cells of adult rats, such as: the crystallization (melting) of the bulk ice mass, crystallization (melting) of mixture of eutectic concentration of cryoprotective solution, the crystallization (melting) of solvent eutectics, based on culture medium, as well as the recrystallization before following processes of melting at heating stage. The samples' freeze-thawing was carried-out with the programmable freezer Cryoson, by combining high (20 deg/min) and low (1 deg/min) cooling-heating rates within the mentioned temperature intervals. As the control we used the samples' freeze-thawing in 40°C water bath. When analyzing the results obtained we calculated the preservation of cell number after cryopreservation, as well as the number of cells with intact cell membrane, depending on variation of cooling-heating rates within temperature intervals of phase transitions.

For the first time there was designed the universal freeze-thawing protocol, providing the certain combination of high and low controlled cooling-heating rates within the mentioned temperature intervals. This protocol enabled the obtaining of high indices of viability and functional activity for both cells of total suspension (56.7%) and the survival of certain population, *i. e.* Leydig cells (78.7%).

The obtained results are of good reproducibility due to excluding a subjective factor during cell suspension freeze-thawing in a water bath. The proposed technique is universal and may be used independently on bioobject type and cryoprotective medium composition for cryopreservation the variety of cells.