

Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови ниже 0°C

А.В. Зинченко, Е.Н. Боброва, М.И. Шетинский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

DMSO Effect on Phase Transitions and Vitrification in Cord Blood Erythrocyte Suspension Under 0°C

ZINCHENKO A.V., BOBROVA E.N., SCHETINSKIY M.I.

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

Методом ДСК исследовали эритромузу кордовой крови, смешанную в соотношении 1:1 с водными растворами ДМСО различных концентраций, а также образцы плотного осадка и надосадочной жидкости, полученные после центрифугирования этих смесей. Определены температуры стеклования, девитрификации, кристаллизации и плавления эвтектических составов и температура полного плавления систем. Построена часть диаграммы физических состояний бинарной системы вода – ДМСО в диапазоне концентраций от 0 до 60 масс % ДМСО. Методом ЯМР показано, что концентрация ДМСО в надосадочной жидкости выше, чем в плотной суспензии эритроцитов. Этим объясняются отличия кристаллизации эвтектик в образцах плотной суспензии эритроцитов и в надосадочной жидкости.

Ключевые слова: дифференциальная сканирующая калориметрия, ЯМР, ДМСО, эритроциты, кордовая кровь.

Методом ДСК досліджували еритромасу кордової крові, що була змішана у співвідношенні 1:1 з водними розчинами ДМСО різних концентрацій, а також зразки щільного осаду і надосадкові рідини, одержані після центрифугування цих сумішей. Визначено температури склування, девітрифікації, кристалізації та плавлення евтектичного складу і температура повного плавлення системи. Побудована частина діаграми фізичних станів бінарної системи вода-ДМСО у діапазоні концентрацій від 0 до 60 мас % ДМСО. Методом ЯМР показано, що концентрація ДМСО в надосадковій рідині вище, ніж у щільній суспензії еритроцитів. Цим пояснюється різниця кристалізації евтектик у зразках щільної суспензії еритроцитів і в надосадковій рідині.

Ключові слова: диференційна скануюча калориметрія, ЯМР, ДМСО, еритроцити, кордова кров.

Using the DSC method there were investigated the cord blood erythrocyte mass, mixed in 1:1 ratio with DMSO aqueous solutions of different concentrations, as well as the samples of dense sediment and supernatant fluid, obtained after these mixtures' centrifugation. The temperatures of vitrification, devitrification, crystallisation and melting of eutectic compositions and the temperature of complete melting of systems were determined. There was built a part of diagram for physical states of water-DMSO binary system within the concentration range from 0 up to 60 % (w/w) of DMSO. Using the NMR method it was shown, that the DMSO concentration in supernatant fluid was higher, than in a dense suspension of erythrocytes. This explains the differences in eutectics crystallisation in the samples of erythrocyte dense suspension and in supernatant fluid.

Key words: differential scanning calorimetry, NMR, DMSO, erythrocytes, cord blood.

Технологии с применением ДМСО в качестве криопротектора, обладающего высокой проникающей способностью в клетки, занимают значительное место среди известных технологий криоконсервирования. Однако особенности поведения клеточных систем в присутствии ДМСО при температурах ниже 0°C мало изучены. В связи с этим нами были исследованы фазовые переходы и стеклование в бинарных водных растворах ДМСО и в клеточных суспензиях эритроцитов с добавками ДМСО.

Материалы и методы

Эритроциты кордовой крови готовили следующим образом: к 1 мл цельной крови добавляли 1 мл физиологического раствора, перемешивали, центрифугировали при 800g 5 мин, затем надосадок удаляли. Такую

Technologies with DMSO application as a cryoprotectant with a high penetrating capability into cells take significant place among the known technologies of cryopreservation. However the peculiarities of cell system behaviour with DMSO presence at the temperatures under 0°C are poorly studied. In this connection we investigated phase transitions and vitrification in binary DMSO aqueous solutions and erythrocyte cell suspensions with DMSO additives.

Materials and methods

Cord blood erythrocytes were prepared as follows: to 1 ml of the whole blood one added 1 ml of physiological solution, mixed, centrifuged at 800 g for 5 min, then the supernatant was removed. Such procedure was thrice repeated, then erythrocytes were

Адрес для корреспонденции: Зинченко А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7726141, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Zinchenko A.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7726141, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

процедуру повторяли 3 раза, после чего эритроциты смешивали с равной по объему криозащитной смесью, содержащей 40, 50, 60, 70, 75 или 80 масс % ДМСО. После смешивания эритроциты осаждали центрифугированием при 800g в течение 5 мин и отделяли плотную суспензию клеток от надосадочной жидкости. Получали 3 вида образцов: 1 – эритромакса, смешанная с равным объемом криозащитного раствора, 2 – плотный осадок эритроцитов после центрифугирования первого образца, 3 – надосадочная жидкость.

Для исследования низкотемпературных фазовых переходов и стеклования в области температур 0÷-196°C был использован разработанный нами дифференциальный сканирующий калориметр, который согласно классификации Уэндландта [1,2], можно отнести к приборам типа “ДСК” (ДТА). Принцип работы такого калориметра основан на регистрации тепловых потоков, поступающих в образец в процессе его непрерывного нагрева. В отличие от обычного ДТА в данном приборе интегральный тепловой поток регистрируется одновременно во всех точках вне образца. Особенностью разработанного прибора является то, что его рабочую камеру можно предварительно охладить до любой заданной температуры в диапазоне 0 ÷ -196°C, а затем поместить в ячейку образец, который был заранее охлажден с любой требуемой скоростью. Это позволяет исследовать образцы, охлажденные с высокими скоростями, которые невозможно реализовать непосредственно в калориметре. В работе образцы охлаждали погружением в жидкий азот, средняя скорость охлаждения при этом составляла 3,3(3)°C×c⁻¹. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 8,3×10⁻³°C×c⁻¹.

Концентрацию криопротекторов в образцах определяли методом ¹H ЯМР высокого разрешения на спектрометре Tesla BS 567A, используя методику, описанную в [3].

Результаты и обсуждение

Известно, что концентрация криопротектора внутри и вне клеток неодинакова. Методом ¹H ЯМР определяли концентрацию криопротекторов в исходной смеси эритроцитов, надосадке и плотной эритроцитарной массе после центрифугирования с криопротекторами. Значения найденных таким способом концентраций представлены в табл. 1. Видно, что независимо от исходной концентрации ДМСО в смеси в надосадочной жидкости она выше, чем в плотном осадке эритроцитов.

На основании полученных термограмм построена часть диаграммы физических состояний в диапазоне концентраций от 0 до 60 масс % (рис. 1).

mixed with equal on volume cryoprotective mixture, containing 40, 50, 60, 70, 75 or 80 % (w/w) of DMSO. After mixing erythrocytes were sedimented by centrifuging at 80 g during 5 min and the dense cell suspension was separated from supernatant fluid. There were obtained 3 types of samples: 1 – erythromass, mixed with an equal volume of cryoprotective solution; 2 – dense sediment of erythrocytes after the first sample centrifugation; 3 – supernatant fluid.

In order to investigate the low temperature phase transitions and vitrification within the temperature range of 0÷-196°C we have used the developed by us differential scanning calorimeter, which according to the Wendlandt classification [1, 2] can be referred to the “DSC” (DTA) type devices. The work principle of such calorimeter is based on the recording of heat flows, entering into the sample during its continuous heating. In contrast to ordinary DTA in this device the integral heat flow is recorded simultaneously in all sites beyond the sample. The developed device peculiarity consists in the fact, that its working chamber can be preliminarily cooled down to any fixed temperature within the range of 0÷-196°C, and then to place into a cell the sample, cooled beforehand with any required rate. This permits to investigate the samples, cooled down with high rates, which realisation is impossible directly in calorimeter. In the work the samples were cooled down by immersing into liquid nitrogen, an average rate of cooling made 3.3(3)°C×c⁻¹. The thermograms were recorded during heating with 8.3·10⁻³°C×c⁻¹ rate.

The concentration of cryoprotectants in the samples was determined by ¹H NMR of high resolution by Tesla BS 567A spectrometer, using the technique, described in the paper [3].

Results and discussion

It is known, that the concentration of cryoprotectant inside and outside of cells is not equal. Using the ¹H NMR there was detected the concentration of cryoprotectants in initial mixture of erythrocytes, supernatant and dense erythrocyte mass after centrifuging with cryoprotectants. The values of concentrations, found by such a way, are presented in the Table 1. It is seen, that independently on the initial DMSO concentration in mixture, it is higher in supernatant fluid, than in a dense sediment of erythrocytes.

Basing on the obtained thermograms a part of diagram of physical states within the concentration range from 0 to 60% (w/w) (Fig. 1) was built. In contrast to such non-electrolyte solutions as glycerol and especially 1,2-PD, water-DMSO system can be completely crystallised in all proportions. In the built part of diagram there are the lines of crystallisation of

В отличие от таких растворов неэлектролитов, как глицерин и особенно 1,2-ПД, система вода – ДМСО может быть полностью закристаллизована во всех пропорциях. В построенной части диаграммы имеются линии кристаллизации эвтектических составов (линия 3, -84°C), их плавления (линия 4, -63°C), линии температур стеклования (линия 1), девитрификации (линия 2) и плавления системы (линия ликвидуса 5). На диаграмме физических состояний приведены также точки фазовых переходов и стеклования для ДМСО на физрастворе ($1', 2', 3', 4', 5'$). Следует отметить, что значения температур стеклования, плавления эвтектики и плавления всей системы практически совпадают с этими же значениями в бинарной системе вода-ДМСО, значения температур кристаллизации эвтектических составов отличаются несущественно. Девитрификация развивается в узком диапазоне концентраций, в то время как ее температура меняется в пределах 40°C .

На рис. 2-4 представлены образцы термограмм ДСК суспензий эритроцитов с растворами ДМСО и термограмм надосадочной жидкости и плотного осадка эритроцитов, полученные после центрифугирования исходных суспензий эритроцитов с ДМСО. Из полученных данных видно, что на термограммах исследуемых образцов регистрируются пики, соответствующие температурам девитрификации (пик 2), эвтектической кристаллизации $T_{\text{ке}}$ (пик 3), эвтектического плавления $T_{\text{км}}$ (пик 4), плавления всей системы $T_{\text{м}}$ (пик 5), а также скачок теплопоглощения 1, соответствующий температуре стеклования $T_{\text{г}}$.

Как и в ранее рассмотренных образцах эритроцитов кордовой крови с добавками глицерина и 1,2-ПД, в суспензиях эритроцитов в присутствии

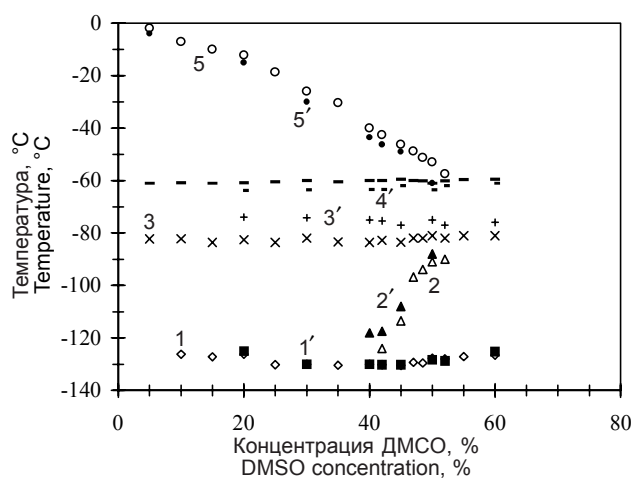


Рис. 1. Диаграмма физических состояний системы вода–ДМСО. Пояснения в тексте.

Fig.1. Diagram of physical states of water-DMSO system. Explanations are in the text.

Таблица 1. Концентрации ДМСО в исследуемых образцах, определенные методом ЯМР
Table 1. DMSO concentrations in studied samples, determined with NMR method

Образец Sample	Концентрация криопротектора, масс % Cryoprotectant concentration, % (w/w)
Эритроцитами + 40% – й раствор ДМСО (1:1) Erythrocytes + 40% solution of DMSO (1:1)	24,4
Надосадоk после центрифугирования Supernatant after centrifugation	25,6
Плотный осадок эритроцитами после центрифугирования Dense sediment of erythrocytes after centrifugation	22,5
Эритроцитами + 50% – й раствор ДМСО (1:1) Erythrocytes + 50% solution of DMSO (1:1)	30
Надосадоk после центрифугирования Supernatant after centrifugation	33,9
Плотный осадок эритроцитами после центрифугирования Dense sediment of erythrocytes after centrifugation	26
Эритроцитами + 60% – й раствор ДМСО (1:1) Erythrocytes + 60% solution of DMSO (1:1)	39,2
Надосадоk после центрифугирования Supernatant after centrifugation	43,2
Плотный осадок эритроцитами после центрифугирования Dense sediment of erythrocytes after centrifugation	37,7
Эритроцитами + 70% – й раствор ДМСО (1:1) Erythrocytes + 70% solution of DMSO (1:1)	48,5
Надосадоk после центрифугирования Supernatant after centrifugation	49,7
Плотный осадок эритроцитами после центрифугирования Dense sediment of erythrocytes after centrifugation	46,3

eutectic compositions (line 3, -84°C), their melting (line 4, -63°C), the line of vitrification temperature (line 1), devitrification (line 2) and the system melting (liquidus line 5). The points of phase transitions and vitrification for DMSO on physiological solution ($1', 2', 3', 4', 5'$) are shown in the diagram of physical states. It should be noted, that the temperature values of vitrification, eutectic melting and that for all system practically coincide with those values in binary water-DMSO system, the values of crystallisation temperatures of eutectic compositions differ insignificantly. Devitrification develops within a narrow range of concentrations, meanwhile its temperature changes within 40°C .

The samples of DSC thermograms of erythrocyte suspensions with DMSO solutions and those of supernatant fluid and dense sediment of erythrocytes, obtained after centrifugation in initial erythrocyte suspension with DMSO are presented in the Fig. 2-4.

The data obtained show, that in the thermograms of studied samples there are the peaks recording,

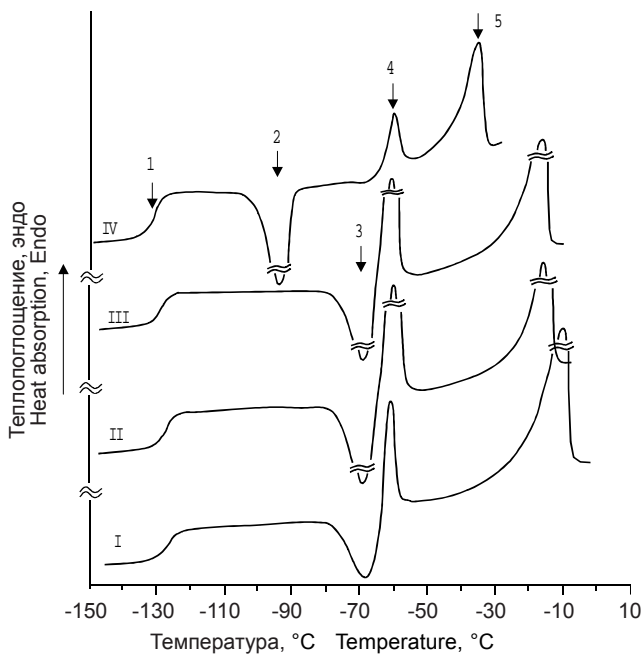


Рис. 2. ДСК – термограммы исходной смеси эритроцитов с растворами ДМСО различной концентрации. Здесь и на рис. 3,4 отмытые от плазмы эритроциты смешивали с растворами ДМСО в объёмном соотношении 1:1 при таких концентрациях растворов, %: I - 40; II – 50; III - 60; IV – 70.

Fig. 2. DSC-thermograms of initial mixture of erythrocytes with DMSO solutions of different concentrations. Here as well as in the Fig. 3, 4 the plasma-washed out erythrocytes were mixed with DMSO solutions in 1:1 volume ratio under the following solution concentrations, %: I - 40; II – 50; III - 60; IV – 70.

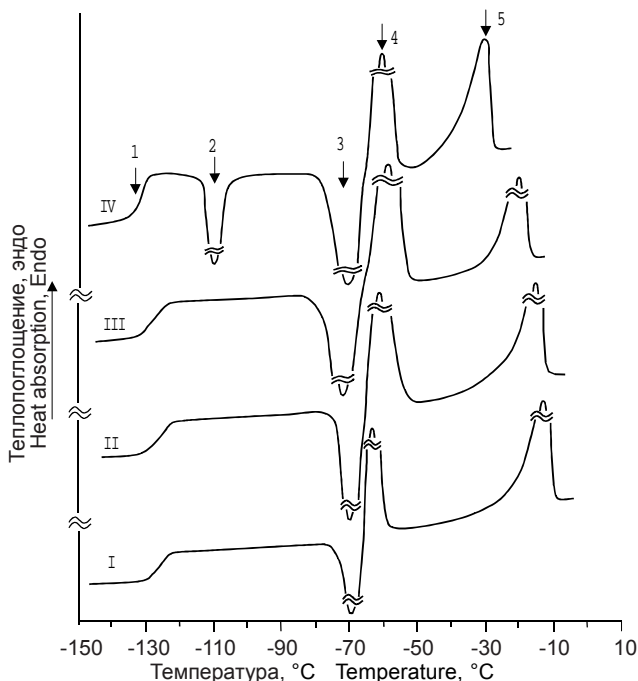


Рис. 3. ДСК-термограммы надосадочной жидкости после центрифугирования суспензии эритроцитов с растворами ДМСО различных концентраций.

Fig. 3. DSC-thermograms of supernatant fluid after centrifugation of erythrocyte suspension with DMSO solutions of different concentrations.

corresponding to the temperature of devitrification (peak 2), eutectic crystallisation T_{ke} (peak 3), eutectic melting T_{km} (peak 4), all system melting T_m (peak 5), as well as the step of heat absorption 1, corresponding to the temperature of vitrification T_g .

Both in observed earlier samples of cord blood erythrocytes with glycerol and 1,2-PD, in erythrocyte suspensions at DMSO presence after centrifugation the DMSO concentration is higher in supernatant fluid and lower in dense sediment of erythrocytes. The temperatures of phase transitions and vitrification in supernatant and in dense erythrocyte sediment with DMSO do not always coincide with phase transition and vitrification temperatures in water-DMSO binary system of the same concentrations. The thermogram picture of dense erythrocyte sediment with DMSO is determined in a greater extent by the presence of biological components in a system.

The Table 2 demonstrates the temperatures of phase transitions and vitrifications in the samples of cord blood erythrocytes with DMSO solutions, as well as in supernatants and dense erythrocyte sediments, obtained after centrifuging the initial samples of cord blood erythrocytes with adding DMSO solutions of different concentrations. Both thermograms and Table 2 show, that at the presence of cells the peak of eutectic crystallisation (T_{ke}) in the samples with initial 70% DMSO concentration is not recorded, meanwhile in supernatant fluid the peak of eutectic crystallisation is present. This can be explained by the fact, that the DMSO concentration in supernatant fluid is higher

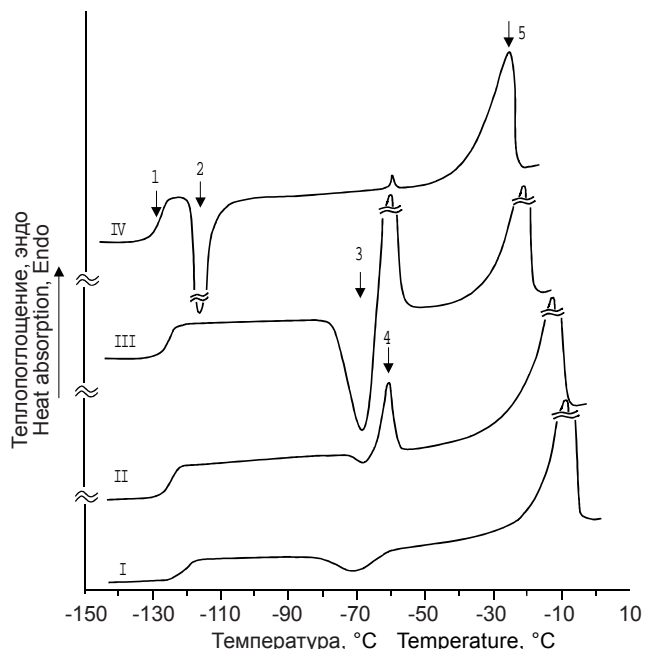


Рис. 4. ДСК-термограммы плотного эритроцитарного осадка после центрифугирования суспензии эритроцитов с растворами ДМСО различных концентраций.

Fig. 4. DSC-thermograms of dense erythrocyte sediment after centrifugation of erythrocyte suspension with DMSO solutions of different concentrations.

ДМСО после центрифугирования концентрация ДМСО выше в надосадочной жидкости и ниже в плотном осадке эритроцитов. Температуры фазовых переходов и стеклования в надосадке и в плотном осадке эритроцитов с ДМСО не всегда совпадают с температурами фазовых переходов и стеклования в бинарной системе вода-ДМСО тех же концентраций. Вид термограмм плотного эритроцитарного осадка с ДМСО в большей степени определяется наличием биологических компонентов в системе.

В табл. 2 представлены температуры фазовых переходов и стеклования в образцах эритроцитов кордовой крови с растворами ДМСО, а также в надосадках и плотных осадках эритроцитов, полученных после центрифугирования исходных образцов эритроцитов кордовой крови с добавками растворов ДМСО различных концентраций. Как из термограмм, так и из табл.2 видно, что в присутствии клеток не регистрируется пик кристаллизации эвтектики ($T_{ке}$) в образцах с исходной концентрацией ДМСО 70%, в то время как в надосадочной жидкости пик кристаллизации эвтектики присутствует. Объяснить этот факт можно тем, что концентрация ДМСО в надосадочной жидкости выше (табл. 2) и кристаллизация эвтектических составов надосадочной жидкости развивается на этапе нагрева.

Интенсивность пика кристаллизации эвтектики 3 в исходном образце по характеру своего проявления представляет собой суперпозицию соответствующих пиков кристаллизации эвтектик в

Табл. 2. Температуры фазовых переходов и стеклования в образцах эритроцитов крови с добавлением растворов ДМСО
Table 2. Temperatures of phase transitions and vitrification in the samples of blood erythrocytes with adding DMSO solutions

Образец Sample		Температура, °C Temperature, °C				
		T_g	$T_{d'}$	$T_{ке'}$	$T_{me'}$	$T_{m'}$
Эритроmasca + 40% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 40% DMSO solution		-127	–	-76,6	-63	-25,3
Эритроmasca + 45% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 45% DMSO solution		-126	–	-76	-63,6	-28,7
Эритроmasca + 50% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 50% DMSO solution		-126,7	–	-76	-63	-31
Эритроmasca + 55% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 55% DMSO solution		-127	–	-76,2	-63,2	-31,4
Эритроmasca + 60% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 60% DMSO solution		-129,2	–	-76,1	-62,8	-33
Эритроmasca + 65% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 65% DMSO solution		-129	–	-76,3	-63,2	-36
Эритроmasca + 70% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 70% DMSO solution		-130	-102	—	-62,8	-58
Эритроmasca + 75% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 40% DMSO solution		-130,5	-113	-73	-63	-47,3
Эритроmasca + 40% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 40% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-126	–	-76,4	-63,2	-28,2
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-126,2	–	-76,1	–	-21
Эритроmasca + 50% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 50% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-126,4	–	-76	-63,6	-30,6
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-126	–	-76	-63	-23
Эритроmasca + 55% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 55% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-127	–	-77,6	-63,2	-34
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-126	–	-77,5	-63,5	-26,2
Эритроmasca + 60% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 60% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-126,8	–	-77,3	-63,4	-38
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-126,5	–	-77,3	-63	-29,5
Эритроmasca + 65% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 65% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-126	–	-77,6	-63,9	-43,8
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-126	–	-77,3	-63,2	-36,1
Эритроmasca + 70% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 70% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-130,5	-113	-76	-62,8	-47,5
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-130	-121	–	-62,9	-43,5
Эритроmasca + 75% – й раствор ДМСО Erythrocytes + 75% DMSO solution	Надосадок Supernatant	-130	-106,8	-72	-63	-49
	Эритроцитарный осадок Erythrocyte sediment	-130,3	-109,2	-76	-63	-45

(Table 2) and the crystallisation of eutectic compositions in supernatant fluid develops at the stage of heating.

The intensity of crystallisation peak of eutectic 3 in initial sample by the character of its manifestation

межклеточной и внутриклеточной жидкости.

Выводы

В системах, содержащих ДМСО, в отличие от систем с криопротекторами из ряда полиолов наблюдается кристаллизация эвтектических составов. Это явление, наряду с девитрификацией, может представлять собой дополнительный криповреждающий фактор.

Литература

1. *Зинченко А.В.* Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150^{\circ}\div 0^{\circ}\text{C}$. Автореф. дис... канд. физ.-мат. наук.– Харьков, 1983.– 22 с.
2. *Уэндландт У.* Термические методы анализа.– М.: Мир, 1978.– 526 с.
3. *А.с. 16423442 СССР МКИ⁶ G01N24/08.* Способ оценки проникновения веществ в клеточные суспензии / В.Д. Зинченко, М.И. Щетинский, В.И. Мусатов, В.А. Моисеев. Подано 08.01.88. Оpubл. 15.04.91 Б.И. № 14.

Поступила 14.01.2003.

represents the superposition of corresponding crystallisation peaks of eutectics in intercellular and intracellular liquid.

Conclusions

In systems with DMSO in contrast to those with cryoprotectants of polyol series the crystallisation of eutectic compositions is observed. This phenomenon along with devitrification can represent an additional cryodamaging factor.

References

1. *Zinchenko A.V.* Investigation of phase transitions and physical states of aqueous solutions of polynuclear alcohols within the temperature range of $150^{\circ}\text{C} \div 0^{\circ}\text{C}$. Abstr. Thesis Cand. in Physics and Mathematics.– Kharkov, 1983.– 22 p.
2. *Wendlandt W.* Thermal methods of analysis.– Moscow: Mir, 1978.– 526 p.
3. *Author's certificate 1642342 USSR ICI⁶ G 01N24/08.* Way for estimating the penetration of substances into cellular suspensions / V.D. Zinchenko, M.I. Schetinsky, V.I. Musatov, V.A. Moiseyev. Filed 08.01.88. Published 15.04.91. Bul. N14.

Accepted in 14.01.2003