

УДК 57.043:579:2:57.086.8

И.Ф. Коваленко^{1*}, С.Е. Коваленко¹, И.П. Высеканцев²,
Т.Ф. Петренко², Л.Ф. Розанов¹, Н.А. Чернобай¹

Влияние режимов криоконсервирования на поведение клеток СПЭВ в культуре

UDC 57.043:579:2:57.086.8

I.F. Kovalenko^{1*}, S.Ye. Kovalenko¹, I.P. Vysekantsev²,
T.F. Petrenko², L.F. Rozanov¹, N.A. Chernobay¹
**Effect of Cryopreservation Regimens
on Behavior of SPEV Cells in Culture**

Реферат: В работе продемонстрирована возможность использования адгезированных на подложке клеток СПЭВ в качестве объекта для изучения кинетики осмотических реакций при экспозиции их в криозащитных средах. Были определены коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул воды и диметилсульфоксида (ДМСО). На основе физико-математической модели замораживания клеточных суспензий и рассчитанных коэффициентов проницаемости было проведено теоретическое прогнозирование осмотического поведения клеток СПЭВ при замораживании их суспензии с различными скоростями охлаждения. Экспериментальные исследования по замораживанию суспензии клеток СПЭВ показали, что скорость охлаждения 1,5 град/мин может обеспечить оптимальную защиту клеток от повреждения в присутствии 1 М ДМСО. Показано, что скорости охлаждения ниже и выше оптимальной могут привести к гибели клеток в результате внутриклеточной кристаллизации или дегидратации.

Ключевые слова: клетки СПЭВ, адгезия, криоконсервирование.

Реферат: У роботі показана можливість використання адгезованих на носії клітин СПЕВ у якості об'єкта для вивчення кінетики осмотичних реакцій клітин під час їх експозиції в криозахисних середовищах. Були визначені коефіцієнти проникності мембран клітин СПЕВ для молекул води та диметилсульфоксиду (ДМСО). На основі фізико-математичного моделювання процесу заморожування клітинних суспензій та розрахованих коефіцієнтів проникності було проведено теоретичне прогнозування осмотичної поведінки клітин СПЕВ під час заморожування їх суспензій із різними швидкостями. Експериментальні дослідження з заморожування суспензії клітин СПЕВ показали, що швидкість охолодження 1,5 град/хв може забезпечити оптимальний захист клітин від крипошкоджень у присутності 1 М ДМСО. Показано, що швидкості охолодження нижче та вище оптимальної можуть привести до загибелі клітин унаслідок внутрішньоклітинної кристалізації або дегідратації.

Ключові слова: клітини СПЕВ, адгезія, криоконсервування.

Abstract: This work demonstrates the ability of using the substrate-adhered SPEV cells as the object for studying the kinetics of osmotic reactions when exposing them to cryoprotective media. Permeability coefficients of SPEV cell membranes for the molecules of water and dimethyl sulfoxide (DMSO) have been determined. Using the physical-mathematical model for cell suspension freezing and calculated permeability coefficients the osmotic SPEV cell behavior during cryopreservation with different cooling rates has been simulated. The experiments on freezing the SPEV cell suspension showed that the cooling rate of 1.5 deg/min could ensure the optimal protection of the cells against damage in 1M DMSO presence. It has been demonstrated that the cooling rate above and below the optimum may cause a cell death as the result of intracellular crystallization or dehydration.

Key words: SPEV cells, adhesion, cryopreservation.

Успех криоконсервирования клеточных суспензий во многом зависит от согласования условий замораживания (скорость охлаждения, тип криопротектора и др.) [8] с транспортными характеристиками (проницаемость клеточных мембран для криопротектора и воды) плазматических мембран клеток.

Теоретические и экспериментальные исследования осмотических реакций, возникающих при контакте клеток с криопротекторами или другими

Outcome of cryopreservation of cell suspensions largely depends on harmonization of freezing conditions (cooling rate, type of cryoprotective agent *etc.*) [2] with transport properties (permeability of cell membranes to water and cryoprotective agent) of plasma membrane cells.

Theoretical and experimental studies of osmotic reactions occurring when cells contacting the cryoprotectants or other substances allow estimating the cell membrane permeability coefficients for water and

¹Отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Отдел криоимикробиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

***Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:**
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: i.kovalenko.ipcic@gmail.com

Поступила 30.10.2015

Принята в печать 03.03.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №2. – С. 116–123.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Low Temperature Preservation, and

²Department of Cryomicrobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: i.kovalenko.ipcic@gmail.com

Received October, 30, 2015

Accepted March, 03, 2016

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2016. 26(2): 116–123.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

веществами, позволяют определить коэффициенты проницаемости клеточных мембран для воды и криопротекторов [1]. Основной сложностью при наблюдении за клетками под микроскопом остается их смещение потоком при замене растворов. Мы предположили, что клетки, адгезировавшие на предметном стекле [6, 7], могут служить объектом для волнометрических исследований. Определенные коэффициенты проницаемости клеточных мембран для молекул ДМСО и воды могут быть использованы для прогнозирования осмотического поведения клеток при охлаждении клеточных суспензий с разными скоростями. Оценить сохранность клеток после размораживания возможно путем наблюдения за процессами их адгезии и расплывания. Сопоставление таких наблюдений с прогнозом осмотического поведения клеток может помочь выснить причины повреждения клеток при отклонении режимов охлаждения от оптимальных.

Цель данной работы – выяснение особенностей определения коэффициентов проницаемости мембран клеток в адгезионной культуре и сопоставление данных о прогнозируемом изменении объема клеток при замораживании и их сохранности после отогрева.

Материалы и методы

Исследования проведены на культуре СПЭВ (перевиваемая линия клеток эмбриональной почки свиньи), полученной из коллекции НПО «Биолек» (Украина).

Клетки культивировали в пластиковых флаконах («Costar», Германия) в среде 199 («Sigma», США) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия) (далее – ростовая среда) при 37°C в воздушной среде, обогащенной 5% CO₂. В суспензионное состояние клетки переводили путем обработки клеточного монослоя смесью 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го раствора Версена в соотношении 1:5 с последующим отмыванием суспензии клеток с помощью ростовой среды и центрифугирования.

Полученную суспензию клеток в контрольных образцах ресуспендировали в ростовой среде, а клетки, предназначенные для криоконсервирования, – в 10%-м растворе ДМСО на эмбриональной телячьей сыворотке [5].

Подготовленную суспензию разливали в криопробирки («Costar») по 1,5 мл и охлаждали по режимам: 0,3 град/мин до –20°C (в течение часа в бытовом холодильнике), 1,5 град/мин до –40°C (в программном замораживателе) и 8 град/мин до –60°C (в хранилище «ХБ 0,5» над поверхностью жидкого азота) с последующим погружением в жидкий азот.

cryoprotectants [3]. The main difficulty for observation of the cells under the microscope is the shifting of the cells by a stream when replacing the liquids. We hypothesized that the cells fixed on a microscope slide due to adhesion [1, 7], could serve as a target for volumetric studies. Determined in such a way permeability coefficients of cell membranes for molecules of DMSO and water could be used to predict the osmotic behavior of cells during freezing with different rates. Post-thaw survival of the cells could be estimated by monitoring their adhesion and spreading. Comparison of these observations with predicted osmotic behavior of the cells could enable to suggest the causes of cell damage in case of deviation of freezing regimens from optimal ones.

The purpose of this work was to elucidate the peculiarities of the permeability coefficients of cell membranes in culture and to compare the data on supposed cell volume changes during freezing and their preservation after thawing.

Materials and methods

Investigations were carried out in SPEV culture (porcine embryo kidney cell line) procured from the collection of PJSC Pharmstandard-Biolik (Ukraine).

Cells were cultured in plastic flasks (Costar, Germany) in 199 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (BioloT, Russia) at 37°C in air with 5% CO₂. Cell suspension was procured by treating the cell culture monolayer with the 0.25% trypsin and 0.02% Versene mixture (in 1:5 ratio) followed by washing the cell suspension by growth medium.

The resulted cell suspension was divided to control samples, which were re-suspended in growth medium, and the samples supposed for cryopreservation, which were transferred to 10% DMSO solution in fetal calf serum [8].

The prepared suspension was placed into 1.5 ml cryovials (Costar) and cooled according to the protocols: 0.3 deg/min down to –20°C (1 hr in a fridge), 1.5 deg/min down to –40°C (in a programmable freezer) or 8 deg/min down to –60°C (in KHB-0.5 tank above the surface of liquid nitrogen), in all the cases the samples were then immersed into liquid nitrogen.

After storage at –196°C for 5–10 days the samples were thawed in a water bath at 41°C.

After thawing the cell suspension was transferred into test tubes, supplemented with a two-fold volume of growth medium, then centrifuged at 1000g for 10 min, the supernatant was removed. Cells were re-suspended in growth medium and transferred into Petri dishes [8] for culturing and following microscope observation.



После хранения при температуре -196°C в течение 5–10 суток образцы отогревали на водяной бане при 41°C .

После отогрева суспензию клеток переносили в пробирки, добавляли двукратный объем ростовой среды, центрифугировали при 1000g в течение 10 мин, супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали в ростовой среде и переносили в чашки Петри для последующего культивирования и наблюдения под микроскопом [5].

Для изучения поведения клеток СПЭВ в культуре интактные и размороженные клетки в среде культивирования высевали в чашки Петри и культивировали в CO_2 -инкубаторе или термостатированной приставке микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия) при температуре 37°C в течение 5 ч. В приставку микроскопа из газового баллона через редуктор периодически подавали CO_2 .

Осмотическое поведение клеток изучали в растворах 1 М ДМСО с разным содержанием NaCl (0,0375; 0,075; 0,15; 0,5 и 1 М) под микроскопом «Axio Observer Z1» (получали микрофотографии) и оценивали динамику изменения клеточных размеров с помощью программы «AxioVision Rel. 4.8» («Carl Zeiss»). Морфометрические данные использовали для определения коэффициентов проницаемости клеточных мембран и теоретического прогнозирования осмотического поведения клеток при замораживании [2].

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программ «Excel» («Microsoft», США) и «Past Statistic v/3/01» (Швеция). В зависимости от характера распределения данных значимость различий между показателями оценивали, используя параметрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна-Уитни [3]. Различия между выборками считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клетки СПЭВ, охлажденные в спиртовой бане до -28°C с 15-минутной остановкой при этой температуре и последующим погружением в жидкий азот, демонстрировали высокие показатели сохранности и пролиферативный потенциал после отогрева [1]. В текущих исследованиях мы оценили возможность использования для криоконсервирования клеток СПЭВ других режимов замораживания, а именно: замораживание с контролируемой скоростью 1,5 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот; неконтролируемое замораживание в холодильнике до -20°C (рассчитанная скорость охлаждения 0,3 град/мин) с погружением в жидкий азот и замораживание на охлаждаемой в парах азота металлической подложке

To study the SPEV behavior in culture the intact and frozen-thawed cells in culture medium were seeded into Petri dishes and cultured in a CO_2 incubator or thermostatic unit to microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) at 37°C for 5 hrs. CO_2 was periodically injected from the gas cylinder into the unit of the microscope through the reducer.

The osmotic behavior of cells was examined in 1 M DMSO solutions with different concentrations of NaCl (0.0375; 0.075; 0.15; 0.5 and 1 M) by means of microscope Axio Observer Z1 (microscopic images were recorded) and dynamics of changes in cell dimensions was assessed using the software Axio-Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss). Morphometric data were used to determine the permeability coefficients for cell membranes and theoretical predicting of cell osmotic behavior during freezing [4].

The findings were statistically processed using Excel (Microsoft, USA) and Past Statistic v/3/01 (Sweden). Depending on the distribution character of the data the significance of differences between the indices was assessed using a parametric Student's *t*-test or non-parametric Mann-Whitney one [5]. Differences between the samples were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The SPEV cells cooled in an alcohol bath down to -28°C with a 15-min stop at this temperature, followed by immersion into liquid nitrogen, demonstrate a high survival and proliferative potential [3]. In the present studies, we have examined the possibility of using other freezing regimens to cryopreserve SPEV cells, in particular, freezing with the controlled rate of 1.5 deg/min down to -40°C , followed by an immersion into liquid nitrogen; non-controlled freezing in a fridge down to -20°C (0.3 deg/min estimated cooling rate) with immersion into liquid nitrogen, and, finally, freezing on cooled in nitrogen vapors metal base with temperature of -60°C (8 deg/min estimated cooling rate) and following immersion into liquid nitrogen. Effect of various freezing protocols was assessed by observing the behavior of SPEV cells in culture.

Following incubation of the intact SPEV cells for 15 min they sedimented to the bottom of a plastic Petri dish, when shaking they easily transited into the suspension. During following 15 min of incubation the part of the cells was loosely attached, only some cells transited to a suspended state when shaking. In the majority of cells the nucleus with nucleoli was clearly visible. Some cells showed the first stage of adhesion (the filopodia appearance). More firm attachment to the substrate was ensured by lamelopodia which were formed in the majority of cells after an hour of incubation. This was evidenced by the fact that the transi-



с температурой -60°C (рассчитанная скорость охлаждения 8 град/мин) с погружением в жидкий азот. Влияние разных режимов замораживания на выживаемость оценивали с помощью наблюдения за поведением клеток СПЭВ в культуре.

При 15-минутной инкубации интактные клетки СПЭВ клетки оседали на дно пластиковой чашки, при встряхивании легко переходили во взвешенное состояние. В последующие 15 мин инкубации часть клеток непрочно прикреплялась; при встряхивании только некоторые клетки переходили во взвешенное состояние. У большинства клеток было хорошо видно ядро с ядрышками. У части клеток наблюдали первую стадию адгезии (появление филоподий). Более плотное прикрепление к субстрату обеспечивали ламеллоподии, которые формировались у большинства клеток после часа инкубации, о чем свидетельствовал тот факт, что для перехода клеток во взвешенное состояние легкого механического встряхивания было недостаточно.

Через 1,5–2 ч часть клеток уплощалась. На пятый час наблюдения около 10–15% клеток приобрели характерный для клеточной культуры СПЭВ вид (рис. 1).

Сравнение поведения клеток в культуре после криоконсервирования по трем режимам замораживания показало, что замораживание со скоростью

tion of cells into a suspended state was not provided by slight mechanical shaking.

In 1.5–2 hrs the part of cells was getting flattened. On the fifth hour of observation about 10–15% of the cells have acquired the structure characteristic for SPEV cell culture (Fig. 1).

When comparing the behavior of cells in culture after cryopreservation according three freezing protocols it has been found that freezing with the rate of 1.5 deg/min down to -40°C , followed by immersion into liquid nitrogen ensured the maximum preservation of their adhesive properties. Observing the cells during adhesion and spreading showed the same dynamics as in intact cells. After 5 hrs of incubation 10–16% of cells completed spreading (Fig. 2).

The freezing protocol with a rate of 8 deg/min down to -60°C , followed by an immersion into liquid nitrogen was unfavorable for cells (Fig. 3). Within an hour of incubation no tendency to adhesion and spreading of SPEV cells was observed. In 2 hrs the bulk of the cells was easily detached from the substrate when shaking. Cell cytoplasm was vacuolated, about 20% of the cells had a protrusion on the membrane (vesicles). As reported by Ye.A. Porozhan *et al.* [6] the formation of vesicles could result from the disorders in cytoskeletal systems and appearance of sensitive sites on a cell surface, that collectively prevented a

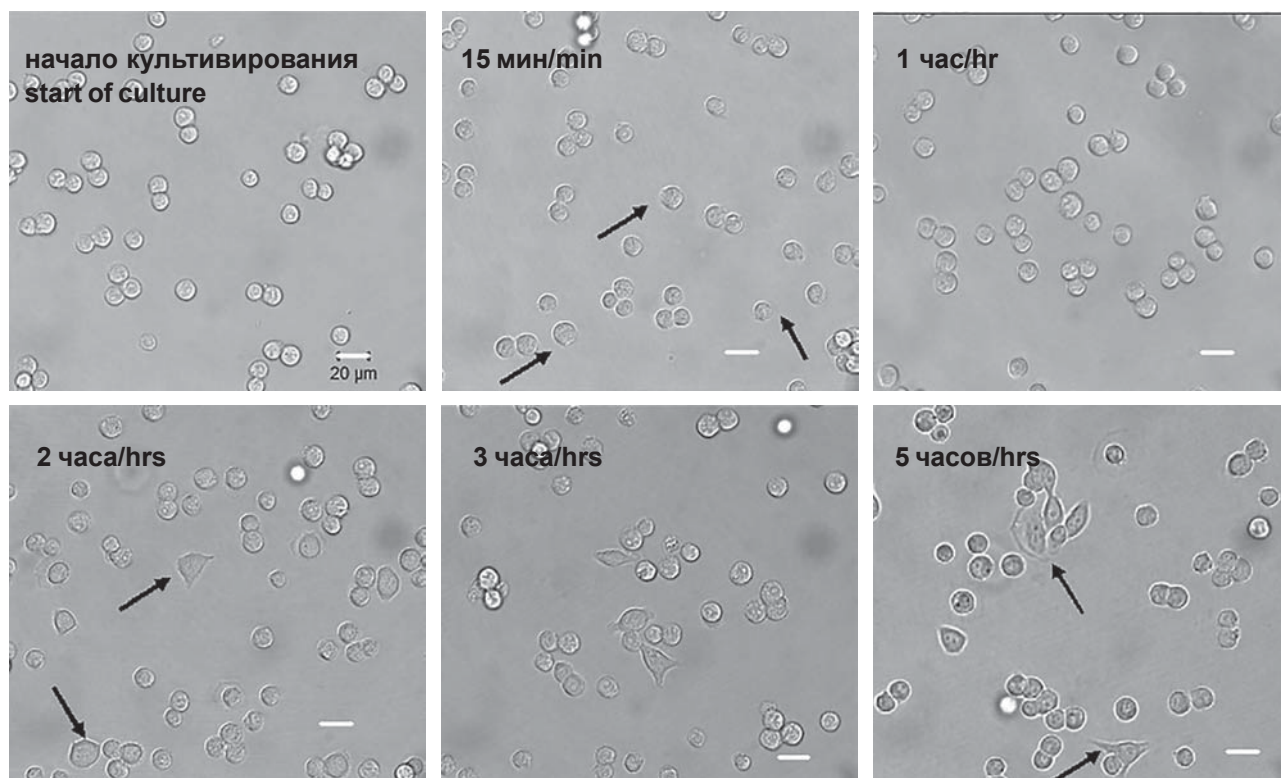


Рис. 1. Распластывание клеток СПЭВ при культивировании в CO_2 -инкубаторе (масштабный отрезок – 20 мкм).
Fig. 1. SPEV cells spreading when cultured in a CO_2 incubator (scale bar 20 μm).

1,5 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот обеспечивало максимальную сохранность их адгезивных свойств. Наблюдение за клетками в процессе адгезии и распластывания показало такую же динамику, как и в интактных клетках. Через 5 ч инкубации 10–16% клеток завершили процесс распластывания (рис. 2).

Неблагоприятным для клеток оказался режим замораживания со скоростью 8 град/мин до -60°C с последующим погружением в жидкий азот (рис. 3). В течение часа инкубации тенденцию к адгезии и распластыванию клеток СПЭВ не наблюдали. Через 2 ч основная масса клеток при встряхивании легко откреплялась от субстрата. Цитоплазма клеток была вакуолизирована, около 20% клеток имели выпячивания на мембране (везикулы). По мнению Е.А. Порожан и соавт. [4], формирование везикул является следствием нарушения цитоскелетных систем и возникновения чувствительных участков на поверхности клеток, что и препятствует нормальным процессам адгезии. Через 5 ч инкубации единичные клетки прикреплялись и распластывались.

Подвергнутые замораживанию со скоростью 0,3 град/мин до -20°C с последующим погружением в жидкий азот (рис. 4) клетки полностью теряли свою функциональную активность. На протяжении 5 ч наблюдения клетки не адгезировали, были округлыми, при легком встряхивании переходили во взвешенное состояние, почти все клетки имели везикулы, цитоплазма была вакуолизирована.

В дальнейшем было спрогнозировано осмотическое поведение клеток при использованных режимах замораживания. Вначале были определены транспортные характеристики клеточных мембран. В связи с тем, что в процессе культивирования происходит распластывание клеток, важно было удостовериться в сохранении формы адгезировавших клеток с момента прикрепления к подложке до начала распластывания.

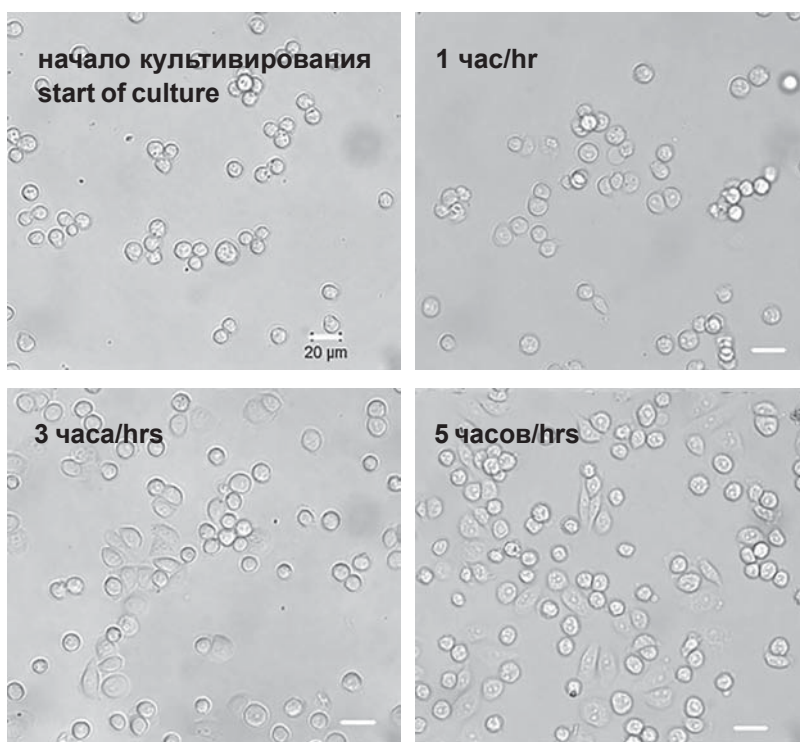


Рис. 2. Распластывание клеток СПЭВ, замороженных со скоростью 1,5 град/мин, в процессе культивирования в CO_2 -инкубаторе (масштабный отрезок – 20 мкм).

Fig. 2. SPEV cells spreading when frozen with the rate of 1.5 deg/min during culturing in a CO_2 incubator (scale bar 20 μm).

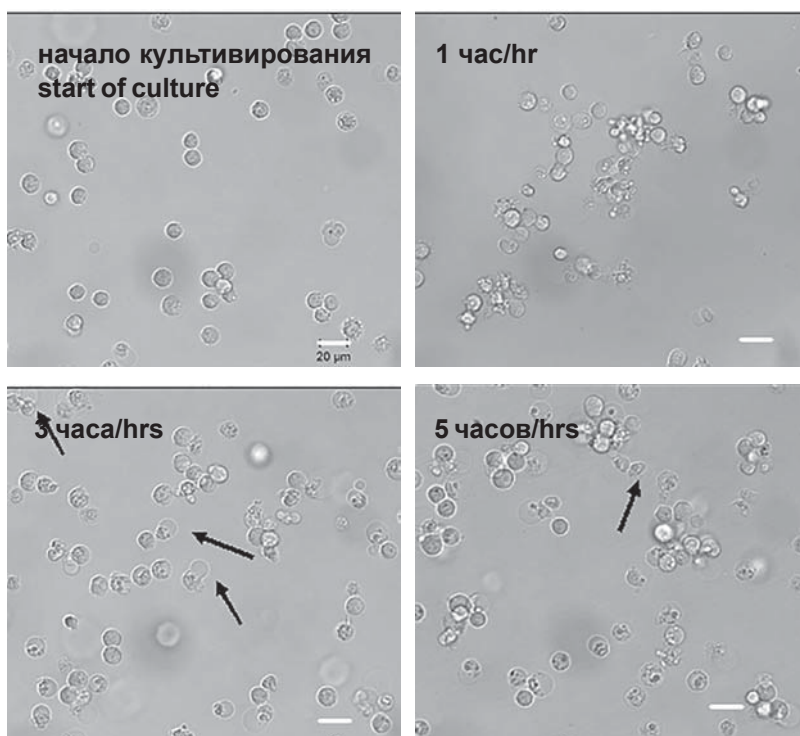


Рис. 3. Распластывание клеток СПЭВ, замороженных со скоростью 8 град/мин, в процессе культивирования в CO_2 -инкубаторе (масштабный отрезок – 20 мкм).

Fig. 3. SPEV cells spreading when frozen with the rate of 8 deg/min during culturing in a CO_2 incubator (scale bar 20 μm).



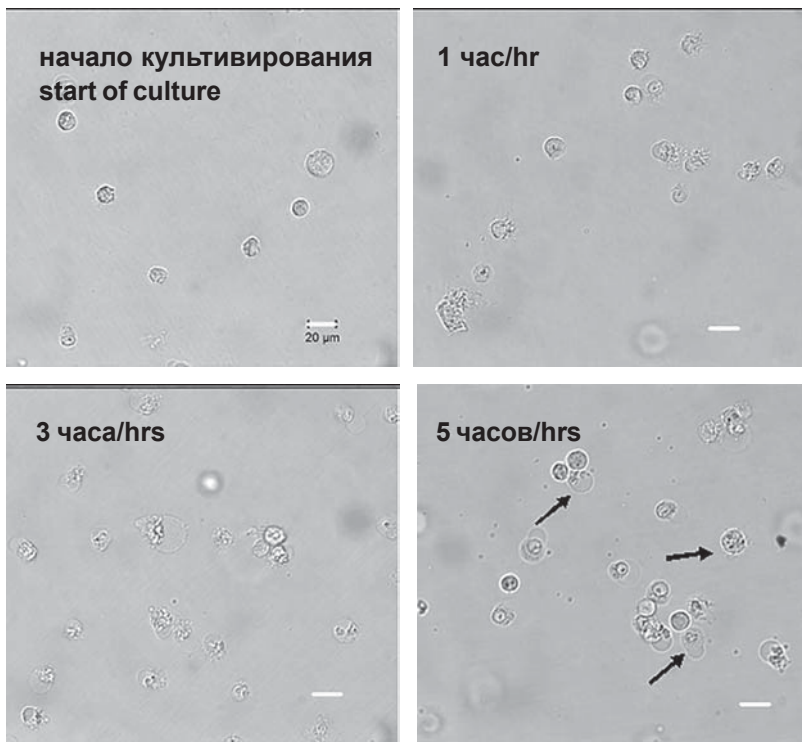


Рис. 4. Распластывание клеток СПЭВ, замороженных со скоростью 0,3 град/мин, в процессе культивирования в CO₂-инкубаторе (масштабный отрезок – 20 мкм).

Fig. 4. SPEV cells spreading when frozen with the rate of 0.3 deg/min during culturing in a CO₂ incubator (scale bar 20 μm).

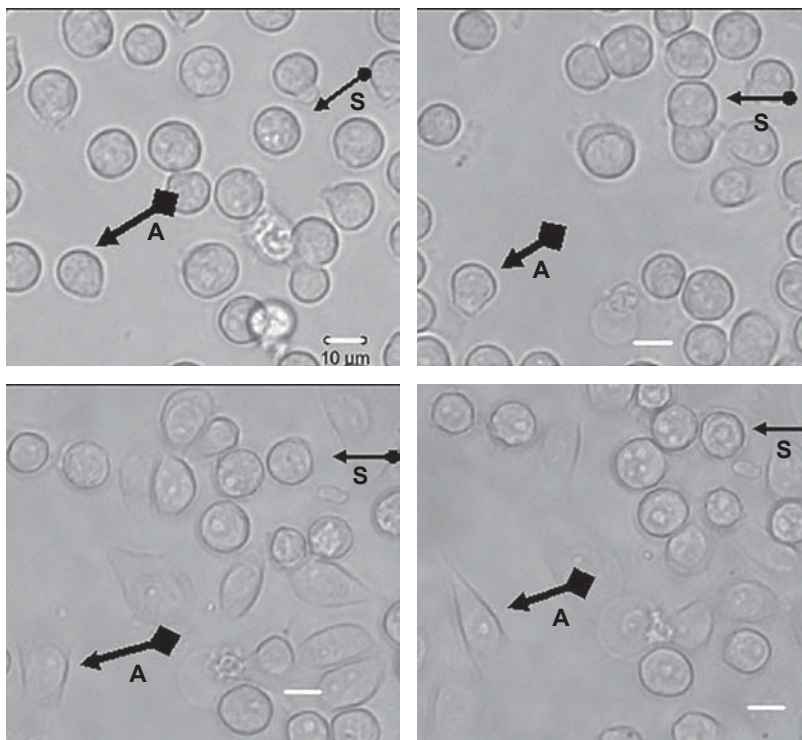


Рис. 5. Адгезировавшие (A) и распластывающиеся (S) клетки СПЭВ в культуре под микроскопом (масштабный отрезок – 10 мкм).

Fig. 5. Adhered (A) and spreading (S) SPEV cells in culture under microscope (scale bar 10 μm).

normal adhesion. After 5 hrs of incubation only single cells attached and flattened.

Subjected to freezing with a rate of 0.3 deg/min down to -20°C followed by an immersion into liquid nitrogen (Fig. 4) the cells completely lost their functional activity. Within 5 hrs of observation the cells did not adhere, were of round shape, when being gently shaken easily transitioned to a suspended state, almost all the cells had vesicles, the cytoplasm was vacuolated.

Based on these results, we predicted the osmotic behavior of cells under the used freezing conditions. Initially we identified the transport characteristics of cell membranes. During culturing the cells were spread, therefore it was important to ensure keeping the shape of adhered cells from the moment of attachment to the substrate up to the spreading start.

As Fig. 5 demonstrates the culturing under the microscope allowed us to observe both the changes in the shape and movement of adherent cells. It should be noted that even up to the beginning of spreading the adhered cells did not change their sizes. This allowed to suggest the cell shape prior to the spreading as a spherical one.

Fig. 6 presents data on osmotic reactions of SPEV cells in 1M DMSO solutions: in the ones isotonic by NaCl (0.15 M NaCl) the cells restored an initial volume after dehydration, in the hypertonic solutions (0.5 and 1 M NaCl) they remained dehydrated and in hypotonic ones (0.075 and 0.0375 M NaCl) they swell. The calculated using the mathematical model coefficients of filtration and permeability for DMSO molecules are shown in the Table.

The data of the Table demonstrate that the permeability of SPEV cell membranes for DMSO depends on the medium composition. At the same time, the calculated permeability coefficients of adherent cells for DMSO were of the same order and close to the values of the permeability coefficient, determined for cell suspensions, fixed in a collagen matrix [1].

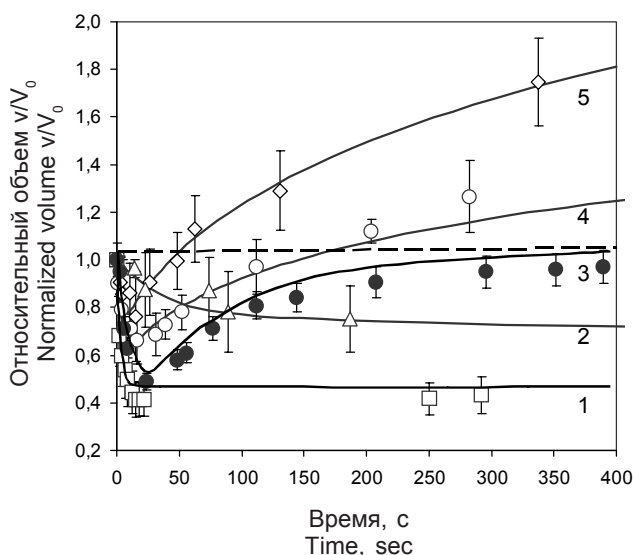


Рис. 6. Экспериментальные данные и теоретические зависимости изменения объема сферических клеток СПЭВ от времени в 1 М растворах ДМСО, содержащих 1 М (1), 0,5 М (2), 0,15 М (3), 0,075 М (4) и 0,0375 М (5) NaCl.

Fig. 6. Experimental data and theoretical dependencies of volume change of spherical SPEV cells vs. time in 1 M DMSO solutions containing 1 M (1), 0.5 M (2), 0.15 M (3), 0.075 M (4) and 0.0375 M (5) of NaCl.

Как видно из рис. 5, культивирование под микроскопом позволяет наблюдать как за изменением формы, так и перемещением адгезировавших клеток. Следует отметить, что вплоть до начала распластывания адгезировавшие клетки не изменялись в размере. Это позволило считать форму клеток до начала распластывания близкой к сферической.

На рис. 6 представлены данные об осмотических реакциях клеток СПЭВ в растворах 1 М ДМСО: в растворах изотонических по NaCl (0,15 М NaCl) клетки после дегидратации восстанавливали исходный объем, в гипертонических (0,5 и 1 М NaCl) оставались обезвоженными, а в гипотонических (0,075 и 0,0375 М NaCl) набухали. Рассчитанные с помощью математической модели коэффициенты фильтрации и проницаемости для молекул ДМСО представлены в таблице.

Из приведенных в таблице данных следует, что проницаемость мембран клеток СПЭВ для ДМСО зависела от состава среды. В то же время значения рассчитанных коэффициентов проницаемости адгезировавших клеток для ДМСО находились в пределах одного порядка со значениями коэффициентов проницаемости, определенным в клетках, закрепленных в матрице коллагена [7].

В дальнейшем для моделирования процесса обезвоживания клеток в суспензии при разных скоростях охлаждения была использована физико-математическая модель процесса замораживания клеточной суспензии в присутствии ДМСО [1].

In the following studies we simulated the cell dehydration in a suspension at various cooling rates using the mathematical model of cell suspension freezing in DMSO presence [3].

Fig. 7 represents the calculated data of the relative volume change of SPEV cells during freezing according three protocols. Analysis of these dependencies allowed to suggest that during the freezing with optimal rate (1.5 deg/min) the dehydration protected the cells against intracellular crystallization, at the rates under the optimum (0.3 deg/min) the dehydration can cause the death of the cells, and at those above the optimal one the cells do not dehydrate and are damaged due to intracellular crystallization.

Conclusions

Thus, the substrate-adhered cells retaining the shape close to spherical one are the proper object to study the kinetics of osmotic cell responses which can be used to assess cell membrane permeability parameters for cryoprotectants and water molecules.

The theoretical prediction of osmotic behavior of SPEV cells showed that the cooling rates of 1.5 deg/min could ensure optimal protection of the cells in 1 M DMSO presence, and the cooling rates above and below the optimal one might be detrimental as a result of intracellular crystallization or dehydration. The results of the performed experiments on freezing of SPEV cells using various cooling regimens which involved the assessment of their preservation rate by analysis of cells' behavior in culture confirmed this assumption.

Коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул ДМСО

Permeability coefficients of SPEV cell membranes for DMSO molecules

Состав среды Medium composition	Коэффициент фильтрации, $L_p \times 10^{14} \text{ H/m}^3\cdot\text{c}$ Hydraulic permeability, $L_p \times 10^{14} \text{ N/m}^3\cdot\text{s}$	Коэффициент проницаемости для ДМСО, $K_f \times 10^8 \text{ м/с}$ DMSO permeability coefficient, $K_f \times 10^8 \text{ m/s}$
1 М ДМСО + 1 М NaCl 1 M DMSO + 1 M NaCl	0,15 ± 0,02	–
1 М ДМСО + 0,5 М NaCl 1 M DMSO + 0.5 M NaCl	0,25 ± 0,04	–
1 М ДМСО + 0,15 М NaCl 1 M DMSO + 0.15 M NaCl	8,28 ± 2,57	7,36 ± 2,07
1 М ДМСО + 0,075 М NaCl 1 М ДМСО + 0,075 М NaCl	4,23 ± 0,81	3,64 ± 0,41
1 М ДМСО + 0,0375 М NaCl 1 М ДМСО + 0,0375 М NaCl	4,23 ± 0,64	11,1 ± 2,52



На рис. 7 приведены данные расчета изменения относительного объема клеток СПЭВ при трех режимах замораживания. На основе приведенных зависимостей можно предположить, что при режиме замораживания со скоростью 1,5 град/мин дегидратация защищает клетки от внутриклеточной кристаллизации, при меньшей скорости (0,3 град/мин) дегидратация может стать причиной гибели клеток, а при большей – клетки не дегидратируют и повреждаются вследствие внутриклеточной кристаллизации.

Выводы

Таким образом, адгезировавшие на подложке клетки, сохраняющие форму близкую к сферической, являются удобным объектом для изучения кинетики осмотических реакций клеток, которая может быть использована для оценки параметров проницаемости клеточных мембран для молекул криопротекторов и воды.

Теоретическое прогнозирование осмотического поведения клеток СПЭВ показало, что скорость охлаждения 1,5 град/мин может обеспечивать оптимальную защиту клеток в присутствии 1 М ДМСО, тогда как скорости охлаждения ниже и выше оптимальной могут оказаться губительными в результате внутриклеточной кристаллизации или дегидратации. Результаты проведенных экспериментов по замораживанию клеток СПЭВ при разных режимах охлаждения с оценкой их сохранности по поведению в культуре подтвердили данное предположение.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наукова думка, 1994. – 142 с.
2. Коваленко И.Ф., Кошый С.В., Тимофеева Е.В. и др. Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, №1. – С. 25–31.
3. Орлов А.И. Прикладная статистика. – М.: Экзамен, 2006. – 671 с.
4. Порожан Е.А., Бабенко Н.Н., Дубрава Т.Г., Гольцев А.Н. Адгезивный потенциал криоконсервированных фетальных нервных клеток как критерий их функциональной полноценности // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 2, Т. 2, №93. – С. 139–144.
5. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культура клеток в ветеринарии и биотехнологии. – К.: Урожай, 1990. – 152 с.
6. Щипицын М.А., Дмитриева Е.А., Воропаева О.В. Исследование влияния состава сред инкубации и субстрата на адгезию эритробластических островков // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – №3. – С. 44.
7. Curtis A.S.G., Forrester J.V., McInnes C., Lawrie F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces // J. Cell Biol. – 1983. – Vol. 97. – P. 1500–1506.
8. Farrant J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention // Nature. – 1965. – Vol. 205, №4978. – P. 1284–1289.

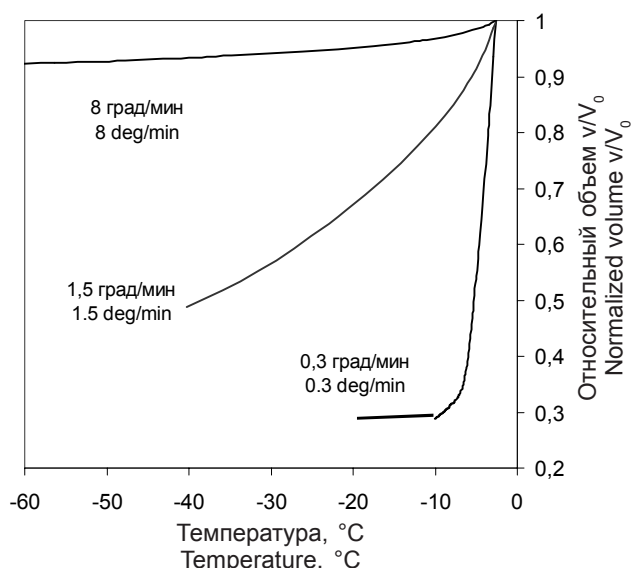


Рис. 7. Теоретически рассчитанные зависимости, демонстрирующие осмотическое поведение клеток СПЭВ при трех режимах замораживания.

Fig. 7. Theoretically calculated dependencies demonstrating osmotic behavior of SPEV cells during freezing according three regimens.

References

1. Curtis A.S.G., Forrester J.V., McInnes C., Lawrie F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. J. Cell Biol 1983; 97: 1500–1506.
2. Farrant J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. Nature 1965; 205(4978): 1284–1289.
3. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low-temperature preservation for cell suspensions. Kiev: Naukova dumka; 1994.
4. Kovalenko I.F., Koschiy S.V., Timofeeva E.V. et al. Permeability of SPEV cell membranes for water and DMSO molecules. Problems of Cryobiology 2009; 19(1): 25–31.
5. Orlov A.I. Applied Statistics. Moscow: Ekzamen; 2006.
6. Porozhan Ye.A., Babenko N.N., Dubrava T.G., Goltsev A.N. Adhesive potential of cryopreserved fetal neural cells as a criterion for their functional integrity. Visnyk Problem Biologii i Medytsyny 2012; 2(93): 139–144.
7. Schipitsyn M.A., Dmitrieva E.A., Voropaeva O.V. Investigation of influence of incubation medium composition and substrate on adhesion of erythroblastic islands. Modern High Technologies 2006; 3: 44.
8. Sergeev V.A., Sobko Y.A. Cell culture in veterinary and biotechnology. Kiev: Urozhay; 1990.

