

Влияние циклического изменения температуры в твердой фазе на сохранность криоконсервированных гепатоцитов крыс

А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ, А.В. ЗИНЧЕНКО, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cyclic Change in Temperature in Solid Phase on the Viability of Cryopreserved Rat's Hepatocytes

LEBEDINSKIY A.S., ZINCHENKO A.V., PETRENKO A.YU.

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучалось влияние циклического изменения температуры в различных диапазонах (77÷223, 77÷173 и 77÷123 К) на сохранность криоконсервированных изолированных гепатоцитов крыс. Оценивалась возможность их транспортировки при температуре сухого льда (194,5 К).

Вивчався вплив циклічної зміни температури в різних діапазонах (77÷223, 77÷173 і 77÷123 К) на цілість криоконсервованих ізольованих гепатоцитів щурів. Оцінювалась можливість їх транспортування при температурі сухого льоду (194,5 К).

The effect of cyclic change in temperature within various ranges (77÷223, 77÷173 and 77÷123 K) on the viability of isolated rat's hepatocytes was investigated. The possibility of their transportation at the temperature of dry ice (194.5 K) was estimated.

Развитие клеточной терапии и создание низкотемпературных банков клеток ставят новую проблему: проблему транспортировки криоконсервированного клеточного материала из мест их получения и хранения (низкотемпературные банки) в клинические центры и исследовательские лаборатории. Наиболее надежна транспортировка в жидком азоте, которая исключает значительные колебания температуры и ее повышение до значений, при которых возможно повреждение транспортируемых биоматериалов. Однако этот вид транспортировки не всегда применим, поскольку перевозки жидкого азота запрещены большинством авиакомпаний, а при доставке клеточного материала в клиники быстрота транспортировки имеет первостепенное значение. Альтернативным методом доставки криоконсервированных биологических объектов является перевозка их на сухом льду при температуре 194,5 К. При переносе из жидкого азота (условия хранения в низкотемпературных банках) на сухой лед образцы подвергаются существенным температурным колебаниям. Возникающие при этом термомеханические напряжения приводят к таким физическим явлениям, как электрическая поляризация вещества, генерация импульсных электромагнитных полей и т. д. Регистрируемая акустическая эмиссия является индикатором термомеханических напряжений [2,3]. Эти явления способны вызвать значительные нарушения структуры биологических объектов и привести к существенному снижению их сохранности.

Целью данной работы было изучение влияния циклического изменения температуры в различных диапазонах (77÷223, 77÷173 и 77÷123 К) на сохранность криоконсервированных изолированных гепатоцитов крыс (диапазоны температур циклирования подбирали с учетом температуры

Development of cell therapy and establishment of low temperature banks of cells set a new task: the problem of transportation of cryopreserved cellular material from the sites of their obtaining and storage (low temperature banks) to clinical centres and research laboratories. The most reliable is the transportation in liquid nitrogen, which excludes considerable fluctuations of temperature and its increase up to the values under which the damage of the biological material being transported is probable. However this type of transportation is not always applicable, since the transportation of liquid nitrogen is prohibited by the majority of airway companies and during the delivery of cellular material to clinics the transportation rate is of a primary value. An alternative method for the delivery of cryopreserved biological objects is their transportation on dry ice at the temperature of 194.5 K. When transferring the samples out of liquid nitrogen (storage conditions in low temperature banks) to dry ice they are subjected to significant temperature fluctuations. Appearing in this case thermomechanical tensions result in such physical phenomena as electrical polarisation of the substance, generation of impulse electromagnetic fields etc. Recorded acoustic emission is the indicator of thermomechanical tensions [2,3]. These phenomena are capable of causing significant impairments in the structure of biological objects and of resulting to considerable reduction in their viability.

The aim of this work was to study the effect of cyclic change in the temperature within various ranges (77÷223, 77÷173 and 77÷123 K) on the viability of cryopreserved isolated hepatocytes of rats (cycling temperature ranges were selected taking into account the temperature of glass formation, which makes for this object 168K [3]) as well as the substantiation of the possibility of transportation of cryopreserved isolated rat's hepatocytes at the temperature of dry ice (194.5 K).

Hepatocytes were derived from 200-400g rats with non-enzymic method [5]. Obtained cells were diluted to

стеклования, которая для данного объекта составляет ~168 К [3]), а также обоснование возможности транспортировки криоконсервированных изолированных гепатоцитов крыс при температуре сухого льда (194,5 К).

Гепатоциты выделяли из крыс массой 200-400 г неферментативным методом [5]. Полученные клетки разводили до концентрации 10 млн/мл, в качестве криопротектора использовали ДМСО (конечная концентрация 10%). Суспензии клеток замораживали на охлажденной до 248 К спиртовой бане в течение 30 мин с последующим переносом материала в жидкий азот. Температурное циклирование криоконсервированных изолированных гепатоцитов крыс в диапазонах температур 77÷223, 77÷173 и 77÷123 К осуществляли на установке для циклирования биологических объектов, разработанной в отделе криобиофизики ИПКиК НАН Украины.

Для моделирования транспортировки криоконсервированных изолированных гепатоцитов при температуре сухого льда (рисунок) использовали гепатоциты, криоконсервированные под защитой 5%-го ДМСО [6]. Гепатоциты замораживали в пластиковых контейнерах на программном замораживателе со скоростью 1 К/мин до 233 К и со скоростью 10 К/мин от 233 до 194,5 К. При температуре 268÷266 К производили инициацию кристаллообразования. Клетки, замороженные до 194,5 К, переносили в жидкий азот. Циклирование осуществляли в охлажденной до 194,5 К камере программного замораживателя в течение 2-х часов. На каждом этапе определяли жизнеспособность клеток (по прокрашиванию витальным красителем трипановым синим). Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера [1].

Результаты экспериментов по исследованию влияния температурного циклирования на сохранность криоконсервированных гепатоцитов крыс в диапазонах температур 77÷223, 77÷173 и 77÷123 К представлены в табл. 1. При температурном циклировании в температурной зоне выше температуры стеклования, которая для исследуемого объекта равна ~168 К, сохранность гепатоцитов составляет 34%, в то время как циклирование в твердой фазе практически не влияет на сохранность клеток (97,5%). Если же проводить циклирование в температурной зоне, захватывающей диапазон стеклования, наблюдается снижение сохранности на 11%.

Исходя из приведенных результатов, можно ожидать существенного снижения жизнеспособности криоконсервированных гепатоцитов при циклировании до температуры сухого льда (194,5 К), которая значительно выше температуры стеклования для данного объекта. Однако в экспериментах было взято довольно большое количество циклов, каждый из которых внес свой вклад в снижение сохранности. Транспортировка же клеточного материала предусматривает одно-

the concentration of 10 mln/ml as cryoprotectant we used DMSO with final concentration of 10%. Cell suspensions were frozen on a cooled down to 248 K alcohol bath during 30 min with following transfer of the material into liquid nitrogen. Temperature cycling of cryopreserved isolated rat's hepatocytes within the temperature ranges of 77÷223, 77÷173 and 77÷123 K was accomplished with the device for cycling of biological objects, designed at the Department of Cryobiophysics of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

To model the transportation of cryopreserved isolated hepatocytes at the temperature of dry ice (Figure) we used hepatocytes, cryopreserved under the protection of 5% DMSO [6]. Hepatocytes were frozen in plastic containers by the programmable freezer with the rate of 10K/min from 233 to 194.5 K. At the temperature of 268÷266 K the initiation of crystal formation was performed. The cells, frozen down to 194,5 K were transferred into liquid nitrogen. Cycling was done in cooled down to 194,5 K chamber of programmable freezer during 2 hrs. At each stage we determined the viability of cells (on the staining with vital dye, trypane blue). Statistical processing of the results was performed with the Student-Fisher's method [1].

The results of experiments on the investigation of the effect of temperature cycling on the viability of cryopreserved rat's hepatocytes within the temperature ranges of 77÷223, 77÷173 and 77÷123 K are presented in the Table 1. During temperature cycling within the

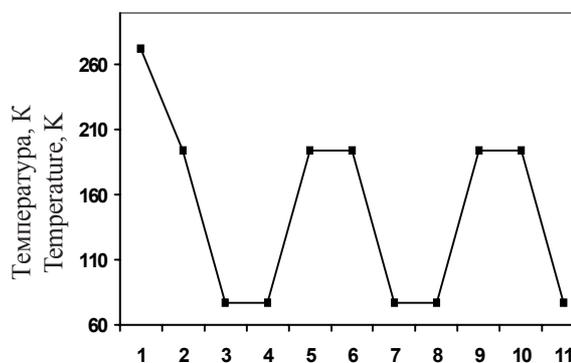


Схема эксперимента: 1 – добавление к исходной суспензии клеток печени среды с криопротектором; 2-3 – замораживание по программе; 3-4 – хранение в жидком азоте; 5-6 – двухчасовое хранение криоконсервированной суспензии клеток при температуре сухого льда (первый цикл); 7-8 – хранение в жидком азоте; 9-10 – двухчасовое хранение криоконсервированной суспензии клеток при температуре сухого льда (второй цикл); 11 – возврат суспензии клеток в жидкий азот.

Protocol of Experiment: 1 – adding of the medium with cryoprotectant to initial liver cell suspension; 2-3 – freezing according to the programme; 3-4 – storage in liquid nitrogen; 5-6 – 2-hrs' storage of cryopreserved suspension of cells at the temperature of dry ice (the second cycle); 7-8 – storage in liquid nitrogen; 9-10 – 2-hrs' storage of cryopreserved suspension of cells at the temperature of dry ice (the second cycle); 11 – removal of cell suspension into liquid nitrogen.

Таблица 1. Сохранность криоконсервированных гепатоцитов после многократного температурного циклирования

Table 1. Viability of cryopreserved hepatocytes after multiple temperature cycling

Όαι ίαδὰδὸδὶύέ εἰἄιἄçíí, È Tem perature range, K	77÷223	77÷173	77÷123
Èíἔḗ+ἄñðáí òḗḗḗíá N um ber of cycles	100	100	100
Æ ḗçíḗñíñíḗííñòù ἄίḗḗòḗḗḗḗ, % V iability of hepatocytes, %	34,0± 3,6	89,0± 1,5	97,5± 2,0

кратное (максимум – двукратное) повышение температуры в образцах. Для оценки способа транспортировки клеточного материала с использованием сухого льда была проведена серия экспериментов по двукратному температурному циклированию криоконсервированных изолированных гепатоцитов крыс до температуры 194,5 К. Для этого (рисунок) контейнеры с криоконсервированными гепатоцитами помещали на 2 ч в охлажденную до 194,5 К камеру программного замораживателя. Затем их опять погружали в жидкий азот. Аналогично проводили второй цикл. Результаты данных экспериментов (табл. 2) показали, что температурное циклирование изолированных криоконсервированных гепатоцитов в диапазоне температур от 77 до 194,5 К не приводит к достоверному снижению жизнеспособности клеток в суспензии, по крайней мере, за два цикла.

Тот факт, что жизнеспособность клеток при двукратном циклировании не изменяется, не исключает возможности лизиса части клеток в ходе замораживания и отогрева. Для выявления такой возможности исследовали общее количество клеток после каждого этапа температурного циклирования. Результаты, представленные в табл.2, показывают, что одно- и двукратное циклирование в диапазоне температур 77÷194,5 К не приводит к существенному снижению количества клеток.

Основываясь на результатах проведенных нами экспериментов по многократному циклированию и литературных данных [4], можно сделать вывод, что термомеханические и электрические явления в замороженной матрице оказывают деструктивное воздействие на криоконсервированные биологические объекты в твердо-

temperature zone higher than the temperature of glass formation, which is ~168 K for the object under study, the viability of hepatocytes makes 34%, meanwhile the cycling in a solid phase does not practically affect the viability of cells (97,5%). If to conduct the cycling within the temperature zone, comprising the glass formation range, we can observe the reduction in the viability by 11%.

Proceeding from the presented results one can expect a significant decrease in viability of cryopreserved hepatocytes during cycling to the temperature of dry ice (194,5 K), which considerably higher than the temperature of that of glass formation for this object. However in the experiments quite a big number of cycles was taken, each of them contributed to a reduction in the viability. Transportation of cellular material foresees a single (as maximum two-fold) temperature increase in the samples. To evaluate the way of transportation of cellular material using dry ice we have conducted a series of experiments on two-fold temperature cycling of cryopreserved isolated hepatocytes of rats to the temperature of 194,5 K. For this aim (Figure) the containers with cryopreserved hepatocytes were placed into cooled down to 195.5 K chamber of programmable freezer for 2 hrs. Then they were again immersed into liquid nitrogen. The second cycle was carried-out in the same way. The results of the experimental data (Table 2) showed, that temperature cycling of isolated cryopre-served hepatocytes within the temperature range from 77 to 194,5 K did not result in a statistical true reduction of viability of cells in suspension, at least, for two cycles.

The fact, that cell viability during two-fold cycling does not change, does not exclude the possibility of the lysis of

Таблица 2. Влияние двукратного температурного циклирования до температуры 194,5 К на сохранность криоконсервированных гепатоцитов

Table 2. Effect of two-fold temperature cycling to the temperature of 194,5 K on the viability of cryopreserved hepatocytes

Ý òáíù ýḗñíḗḗḗḗíáíḗḗ Stages of experim ent	Æ ḗçíḗñíñíḗííñòù ḗḗḗḗḗ, % C ell viability, %	È ḗḗḗḗ+íñòù, í ḗí/í ḗ C ellularity, m h/m l
Ã íḗḗḗḗḗḗḗḗ ḗ ḗñḗíḗíḗ ḗñḗíḗḗḗ ḗḗḗḗḗ íḗ+ḗíḗ ḗḗḗḗ ḗ ḗḗḗíḗḗḗḗḗḗḗḗḗ A dding of the m edium w ith cryoprotectant to initial liver cell suspension	91,75± 10,2	5,12± 0,69
Ç àí íðḗḗ ḗḗḗḗḗ íí íðíḗḗáííḗḗ F reezing according to the program	73,00± 8,23	4,38± 0,53
Ã ḗḗḗ+ḗñíḗḗḗ ḗḗḗḗḗḗḗ ḗḗḗíḗíñḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗ ḗñḗíḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗ íðḗ òáí íḗḗḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗ (ḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗ) 2-hrs' storage of cryopreserved suspension of cells at the tem perature of dry ice (the first cycle)	76,92± 10,48	3,97± 0,56
Õ ḗḗḗḗḗḗḗ ḗ ḗ ḗḗḗíí ḗçíḗḗ S torage in liquid nitrogen	72,62± 10,56	4,02± 0,65
Ã ḗḗḗ+ḗñíḗḗḗ ḗḗḗḗḗḗḗ ḗḗḗíḗíñḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗḗ ḗñḗíḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗ íðḗ òáí íḗḗḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗ (ḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗ) 2-hrs' storage of cryopreserved suspension of cells at the tem perature of dry ice (the second cycle)	74,25± 10,95	4,13± 0,44
Ã íçḗḗḗḗḗ ḗñḗíḗḗḗḗḗḗ ḗḗḗḗḗḗ ḗ ḗ ḗḗḗḗḗ ḗçíḗḗ R em oval of cell suspension into liquid nitrogen	69,88± 10,38	4,18± 0,64

фазном состоянии. Работа имеет и практическое значение. Результаты экспериментов по одно- и двукратному циклированию в диапазоне температур 77÷194,5 К позволяют предположить, что нарушения, возникающие в каждом цикле, не являются летальными для клетки. Для реализации повреждающего действия циклического изменения температуры в твердой фазе необходимо накопление “микродефектов” в ходе многократного циклирования. Тот факт, что двукратное циклирование криоконсервированных гепатоцитов до температуры 194,5 К существенно не отражается на их сохранности, свидетельствует о возможности использования сухого льда для транспортировки криоконсервированных клеточных суспензий.

Таким образом, циклическое изменение температуры в твердой фазе приводит к снижению сохранности криоконсервированных гепатоцитов, если температурный диапазон циклирования включает температуру стеклования. Одно- и двукратный перенос криоконсервированных образцов из жидкого азота в сухой лед не вызывает достоверного снижения количества жизнеспособных клеток.

Литература

1. Ашмарин И. П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – 78 с.
2. Зинченко А.В., Петренко А.Ю., Моисеев В.А. Термомеханические и электрические явления в суспензиях клеток печени при охлаждении // Докл. АН Украины. -1994. - №2. - С. 75-78.
3. Зинченко А.В., Петренко А.Ю. Низкотемпературные фазовые переходы в среде для криоконсервирования гепатоцитов на основе ДМСО: Физико-химические процессы в биологических системах. – Харьков, 1991.– С. 56-60.
4. Зинченко О.В. Фізико-хімічні процеси в кріобіологічних системах при склуванні і в твердій фазі: Автореф. дис.... д-ра біол. наук.– Харків, 1997.– 44 с.
5. Пат. № 14080 України, МПК^С 12 N 5/00. Спосіб здобуття ізольованих гепатоцитів / Кравченко Л.П., Андрієнко А.М., Семенченко О.А. (Україна). - №4721762/SU. Заявлено 20.07.89; Публ. 25.04.97, Бюл. № 2. – С. 3.1.184.
6. Пат. № 2010 України, МПК^С А 61 К 47/00. Спосіб консервування гепатоцитів / Петренко О.Ю., Гришук В.П., Росляков А.Д., Мазур С.П. (Україна).– №4870736/SU. Заявлено 22.02.93, Публ. 20.12.94, Бюл. №4. – С. 3.11.

Поступила 12.03.2002

the part of the cells in the process of freezing and thawing. To reveal such a possibility we have investigated a total number of cells after each stage of temperature cycling. The results, presented in the Table 2, demonstrate that one- and two-fold cycling within the temperature range of 77÷194,5 K does not result in a significant reduction of the cell number. Basing on the results of conducted by us experiments on multiple cycling and literature data [4] one can conclude that thermomechanical and electrical phenomena in a frozen matrix destructively affect cryopreserved biological objects in a solid phase state. The work is also of practical value. The results of experiments on one- and two-fold cycling within the temperature range of 77÷194,5 K allow to suppose that the disorders appearing at each cycle, are not lethal for a cell. For the realisation of damaging effect of cyclic change in the temperature in a solid phase the accumulation of “microdefects” is necessary in the course of multiple cycling. The fact, that two-fold cycling of cryopreserved hepatocytes to the temperature of 194,5 K does not considerably affect their viability, testifies to the possibility of application of dry ice for transportation of cryopreserved cellular suspensions.

Thus, cyclic change in the temperature in a solid phase results in a reduction of the integrity of cryopreserved hepatocytes, if the temperature range of cycling includes the temperature of glass formation. One- and two-fold transfer of cryopreserved samples out of liquid nitrogen to dry ice does not cause a significantly true decrease in the number of viable cells.

References

1. Ashmarin I.P., Vasilyev N.N., Ambrosov V.A. Rapid methods of statistical processing and planning of experiments. L: Publishing House of Leningrad University, 1974.– 78 p.
2. Zinchenko A.V., Petrenko A.Yu., Moiseyev V.A. Thermomechanical and electrical phenomena in liver cell suspensions during cooling // Doklady Akademii Nauk Ukrainy.– 1994.– N 2.– P. 75-78.
3. Zinchenko A.V., Petrenko A.Yu. Low temperature phase transitions in the medium for cryopreservation of hepatocytes on the base of DMSO: physical and chemical processes in biological systems.– Kharkov, 1991.– P. 56-60.
4. Zinchenko O.V. Physical and chemical processes in cryobiological systems during glass formation and in solid phase: Author's abstract of doctor of biological sciences thesis.– Kharkov.– 1997.– 44 p.
5. Patent N 14080 of the Ukraine, MPK^С C 12 N 5/00. The way of obtaining of isolated hepatocytes / Kravchenko L.P., Andrienko A.M., Semenchenko O.A. (Ukraine).– N 4721762 / SU; Applied in 20.07.89; Published in 25.04.97, Bul. N 2. - P. 3.1.184.
6. Patent N 2010 of the Ukraine, MPK^С A 61 K 47/00. The way of preservation of hepatocytes / Petrenko O.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D., Mazur S.P. (Ukraine).– N 4870736/SU. Applied in 22.02.93, Published in 20.12.94, Bul. N4.– P. 3.11.

Accepted in 12.03.2002