

Различие фазового поведения суспендирующего раствора и концентрата эритроцитов с криоконсервантом ЦНИИГПК-11₅ при охлаждении

А.Т. Ходько

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

Difference in Phase Behavior of Suspending Solution and Erythrocyte Concentrate with CRIBT-11₅ Cryopreservative During Cooling

A.T. Khodko

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

Из физической химии растворов известно, что при изменении параметров состояния (температура, давление, концентрация) в конденсированной фазе жидких растворов могут происходить два типа фазовых переходов (ФП) – жидкость-жидкость (LLPT) и жидкость-кристалл (LKPT) [А.А. Тагер, 1993]. Эти явления относятся к ФП первого рода, что делает невозможным их идентификацию методами термического анализа [С.С. Горелик и др., 2003]. Поэтому для понимания процессов в системе необходимо применять иные методы исследования.

Цель работы – идентификация природы фазовых переходов в эритроконцентрате и надосадке методом поляризационной микроскопии.

В работе использовали донорскую кровь, обработанную криоконсервантом, разработанным на базе Центрального научно-исследовательского института гематологии и переливания крови (Москва, Россия) (ЦНИИГПК-11₅) [А.М. Гольцев та ін., 2016]. Клеточную взвесь центрифугировали при 600 г в течение 10 мин. Взвесь в виде капли объемом 20 мкл охлаждали на поверхности чашки Петри из силикатного стекла парама азота под объективом поляризационного микроскопа «МИН-8» («ЛОМО», Россия). Результаты фиксировали цифровой фотокамерой «SONY» («SONY», Китай).

В скрещенном положении поляризаторов в надосадке при $T = -9^{\circ}\text{C}$ возобновлялось светопропускание, указывающее на наличие в системе ЛКРТ, в результате которого образуется кристаллическая фаза, наиболее вероятно, льда.

При микроскопическом исследовании процесса охлаждения взвеси концентрата эритроцитов в этих условиях при $T = -12^{\circ}\text{C}$ выявили резкое его потемнение – критическую опалесценцию и отсутствие светопропускания в скрещенных поляризаторах. Это указывало на наличие в системе LLPT, протекающего по механизму нуклеация-рост зародышей, и отсутствие в ней ЛКРТ.

Отсутствие кристаллизации взвешивающей среды в составе эритроконцентрата с высокой вероятностью можно объяснить ее вырождением в тонкие прослойки между клетками, где преобладают поверхностно расположенные молекулы; и становится невозможным пространственное (стерическое) разделение компонентов на фазы. В коллоидном состоянии вещества могут приобретать свойства и особенности, в том числе и фазового поведения, резко отличающиеся от таковых в объемной фазе.

Таким образом, фазовое поведение криобиологической системы, при прочих равных условиях, может определяться зависящей от концентрации клеток толщиной слоя жидкости дисперсионной среды, разделяющей клетки во взвеси. Это обстоятельство необходимо учитывать при постановке и оценке результатов экспериментов по криоконсервированию.

As it is known from physical chemistry of solutions, when changing the state parameters (temperature, pressure, concentration), two types of phase transitions (PT), *i. e.* liquid-liquid (LLPT) and liquid-crystal (LCPT) may occur in a condensed phase of liquid solutions [A.A. Tager, 1993]. Both types of these phenomena belong to the first genus PT, that makes it impossible to identify them with the thermal analysis methods [S.S. Gorelik *et al.*, 2003]. Therefore, in order to understand the processes in the system, some other research methods should be applied.

The research aim was to identify the nature of phase transitions in erythrocyte concentrate and supernatant using the polarized light microscopy technique.

Here, we used the donated blood, processed with the cryopreservative agent, designed at the Central Research Institute of Hematology and Blood Transfusion (CRIBT-11₅) [A.M. Goltsev *et al.*, 2016]. The cell suspension was centrifuged at 600 g for 10 min. The cell suspension as a drop of 20 μl was cooled on the surface of the soda-lime silica glass Petri dish with nitrogen vapors under a lens of MIN-8 polarization microscope (LOMO, Russia). The results were recorded with Sony digital camera (Sony, China).

When cooling the polaroids in the crossed position at -9°C , the light transmission continued, indicating thereby the presence of LCPT in the system, as a result of which the crystalline phase of most likely ice, was formed.

Microscopic study of cooling of erythrocyte concentrate suspension in liquid nitrogen vapors at -12°C revealed a sharp darkening, *i. e.* critical opalescence and the absence of luminescence in crossed polaroids. This indicates the presence of LLPT in the system, proceeding by the nucleation-growth mechanism of germs, and the absence of LCPT in it.

The absence of crystallization of weighing medium within the erythrocyte concentrate composition may be most likely explained by its degeneration into thin layers between the cells, where the surface molecules are predominant, and the possibility of spatial separation of components into phases is lost. A substance in a colloidal state may get the properties and features, as well as the phase behavior ones, which sharply differ from those in a volume phase.

Thus, the phase behavior of cryobiological system depends on the thickness of separating liquid layer of dispersion medium, determined by the concentration of cells, which should be taken into account when setting up and evaluating the findings of experiments on cryopreservation.

