

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРИОПРОТЕКТОРА НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРИНА

Симоненко Е.Ю., Иванова А.А., Бурмистрова Е.В., Прядун В.В.,
Васильев А.Н., Яковенко С.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова,
ГСП-1, Ленинские горы, д. 1/2, 119991, Москва, РФ; e-mail: ksimonenko@inbox.ru
Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Развитие методов криоконсервации биоматериала расширяет возможности современной биологии (способствует сохранению вымирающих видов, создание криобанков микроорганизмов) и медицины (сохранение и пересадка органов, создание криобанков стволовых клеток и клеток крови). Для защиты клеток от повреждения используют криопротекторы. Эффективность криопротектора обычно оценивается по изменениям жизненно важных показателей клеток после заморозки. Так, успешность криоконсервации сперматозоидов оценивается по их подвижности, морфологии клеток, целостности мембраны и степени фрагментации ДНК. Для отдельных компонентов криопротекторов известны также такие физические параметры, как температура стеклования, вязкость, токсичность и минимальная концентрация, необходимая для витрификации. Однако невозможно найти какие-либо физико-химические характеристики сред для криоконсервации, состоящих из комбинаций проникающих и непроникающих в клетку компонент. В работе предложена адаптация метода адиабатической калориметрии для исследования жидких сред. Измерена зависимость теплоемкости от температуры и определены основные калориметрические характеристики (изменения энтропии ΔS и энтальпии ΔH) для глицерин-содержащего криопротектора, активно используемого при заморозке и хранении спермы.

Ключевые слова: криопротектор, глицерин, адиабатическая калориметрия, ВРТ.

Одним из важных направлений современной биологии является криоконсервация донорских клеток и тканей для хранения и последующего использования. Криоконсервация позволяет отделить во времени забор биологического материала и манипуляции с ним, детально изучить морфологию клеток, а также транспортировку биоматериала на большие расстояния. [1-3]. Однако начало нуклеации с последующим ростом кристаллов льда в растворах при понижении температуры приводит как к механическим повреждениям клеток, так и подвергает клетки холодовому и осмотическому шоку. Для защиты клеток при криоконсервации используют специальные вещества - криопротекторы: проникающие (глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), пропиленгликоль) и непроникающие (сахароза, трегалоза, высокомолекулярные соединения, белки, поливинил алкоголь и др.). Определяющую роль при выборе того или иного компонента играет набор таких параметров, как температура стеклования, вязкость, минимальная концентрация, необходимая для витрификации, а также токсическое действие на биологический материал [4]. Известно, что глицерин, наносит наименьшее повреждение клеткам, в сравнении с другими соединениями [5]. Поэтому многие коммерческие среды для заморозки биологического материала разработаны на основе глицерина. При наличии в среде глицерина при физиологических температурах он проникает внутрь клетки, где, благодаря способности связывать воду, предотвращает дегидратацию цитоплазмы, а также способствует образованию стеклообразной аморфной фазы [6]. В настоящее время поиск криопротектанта с хорошей способностью к образованию стеклоподобного состояния, низкой токсичностью и низкой вязкостью является одним из приоритетных направлений исследований. Одним из методов снижения токсичности криопротекторов является использование комбинаций проникающих в клетку и непроникающих соединений [7].

В то время как проникающие криопротектанты замедляют рост и образование кристаллов льда, блокаторы льда препятствуют образованию центров кристаллизации снаружи клетки. Также, при использовании блокаторов льда, непроникающих в клетку, уменьшается поток воды через мембрану, а следовательно и осмотический стресс. При этом внутриклеточное содержимое обезвоживается в степени, достаточной для того, чтобы внутриклеточная кристаллизация не вызвала летальных повреждений.



Рисунок 1. Вид контейнера

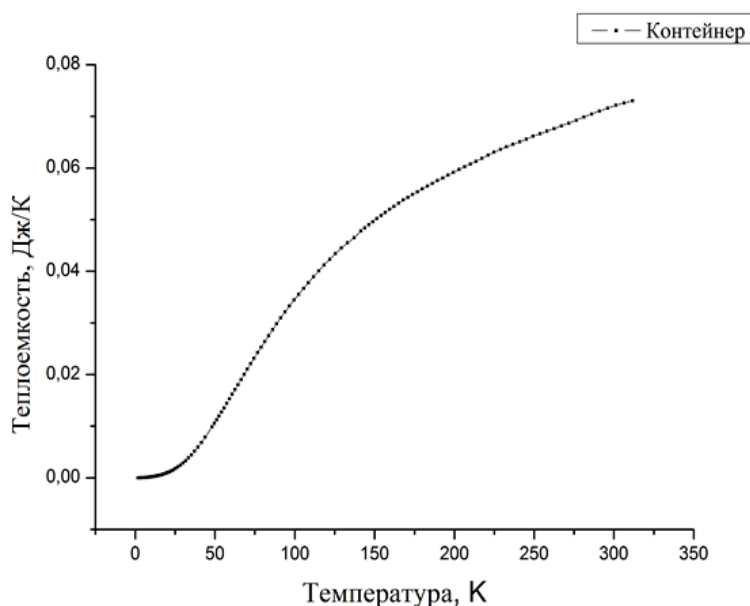


Рисунок 2. График зависимости теплоемкости контейнера от температуры

Об эффективности сред для криоконсервации биологического материала обычно судят по изменениям жизненно важных свойств клеток (морфология, целостность мембран, целостность ДНК, подвижность или пролиферативная активность). Однако, даже в присутствии современных коммерческих сред, клетки значительно повреждаются после процесса заморозки-разморозки. Так, подвижность и морфологические показатели сперматозоидов могут ухудшаться на 30-70 % после криоконсервации [8, 9].

В связи с этим, важно понимать физико-химические процессы, проходящие в многокомпонентных криопротекторах, используемых, например, для криохранения гамет человека, а также исследовать изменения фазовых и агрегатных состояний этих сред. В настоящее время невозможно найти физико-химические характеристики таких сред, нет описаний изменений их агрегатных состояний при добавлении того или иного компонента.

Метод квази-адиабатической калориметрии дает точные и абсолютный вид зависимости теплоемкости образца от температуры, однако экспериментальные установки разработаны для исследования твердых тел.

В настоящей работе был адаптирован метод адиабатической калориметрии для исследования жидких сред. В работе использовался калориметр PPMS (Physical Property Measurement System, Quantum Design, Inc., USA). Проводилось исследование для криопротектора, состав которого схож с коммерческим SpermFreeze (LifeGlobal), основанный на буфере Hepes и содержащий 15 % глицерина, альбумина (HSA) 3,95 мг/мл, 0,5 М сахарозы, а также различных солей в обычных для клеточных сред концентрациях. Молярная масса криопротектора составила 23,8 г/моль. Для исследования жидкого образца был разработан контейнер из дюралюминия объемом $V \sim 20-30$ мкл (рис. 1).

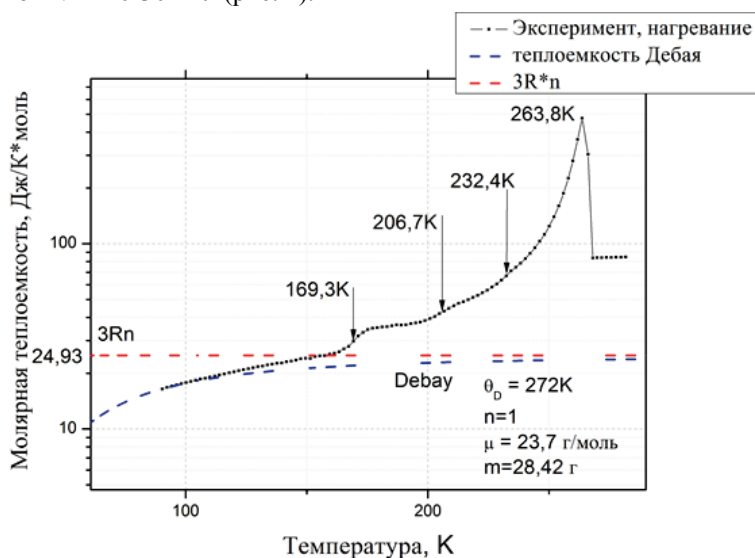


Рисунок 3. График зависимости молярной теплоемкости криопротектора от температуры

Первым этапом работы снималась зависимость теплоемкости от температуры для контейнера. Данная зависимость являлась монотонно возрастающей, отсутствие особенностей на графике (рис. 2). При последующей обработке результатов измерения для криопротектора данные для контейнера вычитались. Был разработан протокол заполнения контейнера исследуемой криопротекторной средой, запайки, создание вакуума и последующего измерения. Этап снятия экспериментальной зависимости теплоемкости контейнера с криопротектором от температуры занимал последовательно от 7 до 10 дней и включал следующие этапы: образец криопротектора массой $m = 28,42$ г был помещен в экспериментальный контейнер, запаян и охлажден в калориметре до $T = 77,4$ К со скоростью примерно 0.115 К/с, после чего методом квази-адиабатической калориметрии была получена зависимость теплоемкости от температуры при нагревании образца до $T = 300$ К с шагом $0,002$ К/с. После обработки экспериментальных данных была получена зависимость теплоемкости от температуры для исследуемого криопротектора (рис. 3).

Температуры фазового перехода и изменений агрегатных состояний определялись по производной теплоемкости от температуры. На графике определяется фазовый переход I рода при $T = 263,8$ К, соответствующий переходу из жидкого состояния системы в смесь фаз переохлажденных жидкостей и стеклообразного тела. Температура перехода из жидкости в твердое тело для чистого глицерина была экспериментально определена много раз, наиболее точное значение $T = 291,3$ К [6]. Таким образом в криопротекторе, по сравнению с глицерином, происходит сдвиг фазового перехода I-го рода в область более низких температур. В этой фазе также различимы еще два критических состояния, сопровождающихся скачками теплоемкости при температурах $T = 232,4$ К и $T = 206,7$ К. Данные переходы хорошо определяются при анализе графика dC/dT . Дополнительные переходы свидетельствуют о многофазности системы при данных температурах [10]. Сравнение профиля перехода при температуре $T = 169,3$ К с профилем схожего перехода для глицерина, полученным Гибсоном, позволяет сделать вывод о том, что данный переход соответствует переходу из стеклообразного состояния в кристаллическое.

Основные термодинамические характеристики определялись согласно квантовой теории теплоемкостей Дебая. Из полученной нами зависимости теплоемкости от температуры для исследуемой среды вычли молярную теплоемкость по модели Дебая.

$$C = C_{\infty} \frac{12 \cdot T^3}{\theta_D^3} \int_0^{\frac{\theta_D}{T}} \frac{\xi^3 d\xi}{e^{\xi} - 1} - \frac{3 \frac{\theta_D}{T}}{e^{\theta_D/T} - 1}. \quad (1)$$

Для определения молярной теплоемкости Дебая варьировали следующие параметры: температуру Дебая θ_D и число атомов в моле вещества при низких температурах. После чего были получены изменения основных термодинамических характеристик – энтропии ΔS и энтальпии ΔH (табл.1).

Таблица 1. Калориметрические характеристики исследуемых образцов

	Исследуемый криопротектор
ΔS , Дж/К*моль	$10,02 \pm 0,44$
ΔH , Дж/моль	$2103,56 \pm 14,54$
Температура плавления, °К	263,4
Температура стеклования, °К	169,3
Температура Дебая, °К	272

Таким образом в работе проведена модернизация калориметра, позволяющая измерять зависимость теплоемкости от температуры не только твердых тел, но и жидких сред; получена зависимость теплоемкости от температуры для многокомпонентной среды криопротектора; выявлено наличие 4-х особенностей, связанных со структурными перестройками среды при изменении температуры.

На образцах эякулята доноров и пациентов был проведен анализ активно подвижных сперматозоидов (тип a+b) после заморозки с исследуемым криопротектором, свидетельствующий о выживаемости гамет. В работе были исследованы 15 эякулятов доноров и пациентов с нормозооспермией (концентрация сперматозоидов >15 млн/мл, категорий активной подвижности $a+b \geq 32\%$, морфологически нормальных сперматозоидов по критериям Крюгера $N \geq 4\%$). Криоконсервация образцов проводилась по стандартному протоколу медленной заморозки с использованием коммерческого криопротектора, аналогичного по составу с исследуемой средой, в соотношении 1:0,7; быстрая разморозка при 37 °С. Для оценки параметров сперматозоидов применялись рутинные клинические методы: оценка концентрации и подвижности с помощью камеры Маклера; оценка морфологических характеристик с помощью предварительно окрашенных стекол (метиленовый синий и кризоловый фиолетовый) по критериям Крюгера. При статистической обработке данных приведены средние значения, стандартные отклонения для всех серий экспериментов; значимость различий определялась парным t-тестом; индексами a, b, c обозначены статистически достоверно различимые выборки ($p < 0.05$). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия. Было

показано, что число активно подвижных сперматозоидов (тип a+b) после заморозки с промышленным криопротектором уменьшается в среднем на 36 % (рис. 4). Для описания подвижности типов (a+b) вводился индекс подвижности I.

$$I = \frac{P_{\text{postthaw}}}{P_{\text{prefreeze}}} * 100\%, \quad (2)$$

где P_{postthaw} – процент сперматозоидов с нормальными категориями подвижности a и b после криоконсервации; $P_{\text{prefreeze}}$ – процент сперматозоидов с нормальными категориями подвижности a и b до криоконсервации.

Кроме значительного снижения подвижности после криоконсервации, наблюдалось увеличение доли сперматозоидов с дефектами шейной части клеток на 28 % и с дефектами хвостовой части до 63 %. Таким образом, несмотря на добавление проникающих и непроникающих в клетки компонент криопротекторов, в них присутствуют сложные переходы агрегатных состояний как при заморозке, так и при разморозки, приводящие к гибели клеток. Предлагаемый в работе метод позволит понять, как меняются термодинамические характеристики сред для криоконсервации биологического материала при добавлении в них тех или иных новых компонент, изучить фазовые переходы и изменения агрегатных состояний. Основываясь не только на показателях клеток, но и на физико-химических свойствах криопротекторов можно будет подобрать среды, способствующие лучшему выживанию клеток при криохранении.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00029)

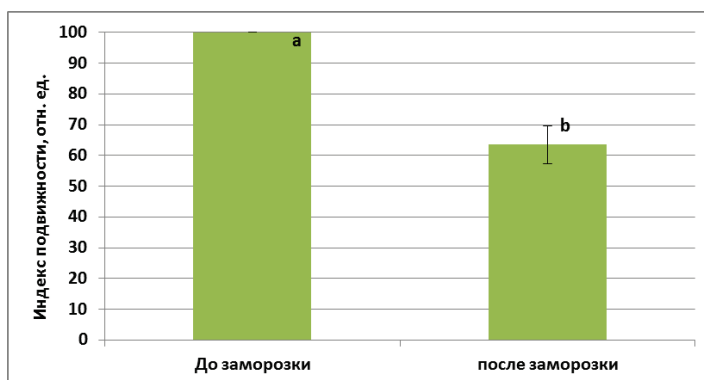


Рисунок 4. Оценка показателей подвижности сперматозоидов до и после заморозки нативных образцов с глицерин содержащим криопротектором. Буквами a, b - обозначены статистически достоверно различимые выборки ($p < 0.05$).

Список литературы / References:

1. Bunge R.G., Keettel W.C., Sherman J.K. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril*, 1954, vol. 5, pp. 520-9
2. Libo S.P, Picton H.M., Godson R.G. Cryopreservation of human spermatozoa. *Current Practices and Controversis in Assisted Reproduction*. Geneva: World Health Organization, 2001, pp. 152-65.
3. Watson P.E. Artificial insemination and the preservation of semen. *Lamming G.E. Marshalls Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992, vol. 2, pp. 747-829.
4. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology*, 1990, vol. 27, pp. 401-415, DOI: 10.1016/0011-2240(90)90017-X.
5. Gilmore,JA; Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *HUMAN REPRODUCTION*, 1997, vol. 12(1), pp. 112-118.
6. *Physical properties of glycerine and its solutions*. Glycerine Producers Association, 1963, 28 p.
7. *Life in the frozen state*. Ed. B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson, CRC PRESS, 2004.
8. Grigoreva A.A., Garmaeva S.B., Yakovenko S.A., Simonenko E.Yu., Tverdislov V.A., Dolganova A.A., Apryshko V.P., Biophysical principles in human gametes cryopreservation: cryoprotectants modified by egg yolk. *BPPC-2016*, vol. 1, p. 70-73.
9. K. Elder, B. Dale *In-vitro fertilization*. Cambridge University Press, 3 ed., 2010.
10. Khod'ko A.T. Critical phenomena, phase transitions and physical states of water-glycerol solutions during cooling – warming, *Kharkov University Bulletin, Chemical Series*, 2012. no. 1026, iss. 21(44), pp. 177-184.

CALORIMETRIC CHARACTERISTICS OF GLYCEROL-BASED CRYOPROTECTANT

Simonenko E.Yu., Ivanova A.A., Burmistrova E.V., Pryadun V.V., Vasiliev A.N.,
Yakovenko S.A.

Lomonosov Moscow State University

GSP-1, Leninskie gori, 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ksimonenko@inbox.ru

Abstract. The development of methods for cryopreservation of biomaterial advances the possibilities of modern biology (contributes to the preservation of endangered species, the creation of cryobanks of microorganisms) and medicine (preservation and transplantation of organs, creation of cryobanks of stem cells and blood cells). Cryoprotectors are used to protect cells from damage. Usually the efficiency of a cryoprotectant is assessed by changes in vital cell parameters after freezing. So, the success of cryopreservation of spermatozoa is estimated by their mobility, cell morphology, membrane integrity and DNA fragmentation. For individual components of cryoprotectants, physical parameters such as glass transition temperature, viscosity, toxicity and the minimum concentration necessary for vitrification are also known. However, it is impossible to find any physicochemical characteristics of cryopreservation media consisting of combinations of penetrating and non-penetrating components into the cell. An adaptation of the adiabatic calorimetry method for the study of liquid media is proposed. The dependence of heat capacity on temperature was measured and the main calorimetric characteristics (changes in entropy ΔS and enthalpy ΔH) for a glycerol-containing cryoprotectant that are actively used for the freezing and storage of semen were determined.

Key words: cryoprotectant, glycerin, adiabatic calorimetry, ART.