

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-140

**КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЕ В КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДАХ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ЗАМОРОЗКИ*****ICE CRYSTAL FORMATION IN CRYOPROTECTIVE MEDIA
UNDER VARIOUS FREEZING REGIMES**

А. А. Иванова, Е. Ю. Симоненко

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

A. A. Ivanova, E. U. Simonenko

Lomonosov Moscow State University

✉ Annetkurella@yandex.ru

Аннотация

Несмотря на многочисленные исследования процесса криоконсервации процент выживаемости клеток остается низким. Работа посвящена исследованию процесса кристаллообразования в криопротекторных средах при различных режимах заморозки. Предложен новый метод анализа дифракционных картин, а также альтернативный режим заморозки клеток при криоконсервации.

Abstract

Despite numerous studies of the cryopreservation process the percentage of cell survival remains low. The work is devoted to the study of the process of ice crystal formation in cryoprotective media under various freezing regimes. A new method for diffraction patterns analysis as well as alternative mode of cell freezing regime during cryopreservation is proposed.

Одним из перспективных направлений современной медицины является криоконсервация биологического материала: плазмы крови, гамет, эмбрионов и т. д. — ключевая среди вспомогательных репродуктивных технологий. Несмотря на то, что методы криоконсервации постоянно совершенствуются, при замораживании в больших объемах потери клеток могут составлять 40–60 % [1]. Для снижения негативных воздействий данного процесса используются криопротекторные среды [2]. Для заморозки сперматозоидов чаще всего используется комбинация проникающих (глицерин в концентрации от 10 до 15 % по объему) и непроникающих (сахароза — 0,05–0,5 М, альбумин — 4 мг/мл) компонентов [3].

В научных источниках нет подробного изучения процесса кристаллообразования в водных растворах глицерина низкой концентрации при различных режимах заморозки. Поэтому целью нашей работы является изучение процесса формирования кристаллов льда в криопротекторных средах на основе водных растворов глицерина низкой концентрации при различных режимах заморозки.

Оценка средних размеров кристаллов, формирующихся в изучаемых растворах при различных режимах заморозки, проведена с помощью рентгеноструктурного анализа (PETRA III, DESY, Германия). Первые эксперименты осуществлялись для базовых растворов малых объемов (20 мкл). Полученные результаты продемонстрировали возможность использования данного метода с целью изучения процесса кристаллообразования. Для получения значений средних размеров кристаллов, формирующихся в растворе при криоконсервации, написано программное обеспечение, позволяющее численно оценить размеры данных кристаллов. С помощью этой программы показано, что для буферного раствора глицерина с добавлением непроникающих компонентов (альбумина — 4 мг/мл, сахарозы — 0,04 М), который является аналогом коммерческих криопротекторных сред, используемых в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий, средний размер кристаллов, формирующихся в растворе, составляет 9 ± 1 мкм.

В ходе экспериментов обнаружено, что при классической вертикальной заморозке кристаллообразование происходит неоднородно. В связи с этим предложен альтернативный метод горизонтальной трехуровневой заморозки, для его реализации разработан и напечатан на 3D-принтере держатель для пробирок. Процесс формирования кристаллов при горизонтальной заморозке происходит более однородно, что подтверждается статистическим

* Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш01-15 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М. В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса».

© А. А. Иванова, Е. Ю. Симоненко, 2024

анализом отличия средних размеров кристаллов внутри одной криопробирки для всех исследуемых растворов при классическом вертикальном и альтернативном протоколе заморозки ($p = 0,05$). В ходе экспериментов также установлено, что для коммерческого криопротектора SpermFreeze средний размер кристаллов при вертикальной заморозке составляет 13 ± 1 мкм в верхней части пробирки и 8 ± 2 мкм в нижней, при горизонтальном режиме заморозки — 9 ± 1 мкм в верхней части пробирки и 8 ± 1 мкм в нижней.

Таким образом, в ходе проведенной работы разработан новый метод анализа дифракционных картин для криопротекторных сред, позволяющий получить значения среднего размера формирующихся кристаллов льда. Обнаружено неоднородное формирование кристаллов льда в криопробирках при классическом вертикальном протоколе заморозки. На основании полученных результатов предложен альтернативный горизонтальный режим заморозки при криоконсервации, который статистически значимо приводит к более однородному формированию кристаллов меньшими средними размерами при заморозке.

Литература

1. Petrunkina A.M. Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology // Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology. 2007. Vol. 4 (2). P. 78–91.
2. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Experimental Cell Research. 1972. Vol. 71. P. 345–355.
3. Libo S.P., Picton H.M. and Godson R.G. Current Practices and Controversis in Assisted Reproduction / World Health Organization. Geneva, 2001. P. 152–165.