

Fenomeni chimico-fisici presenti durante le fasi del processo di Crioconservazione con CPA

Dott. Gabriele Traversari

International PhD in Innovation Sciences and Technologies XXXIII Cycle

Prof. Alberto Cincotti

Università degli Studi di Cagliari

Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Chimica e dei Materiali



DIMCM
Dipartimento di Ingegneria Meccanica, Chimica e dei Materiali

Scientific School “Cryo: Tecniche Innovative Per La Crioconservazione Di Materiale Biologico”

Crioconservazione con CPA

I CPA vengono utilizzati per evitare che si formi il ghiaccio, ritenuto letale.

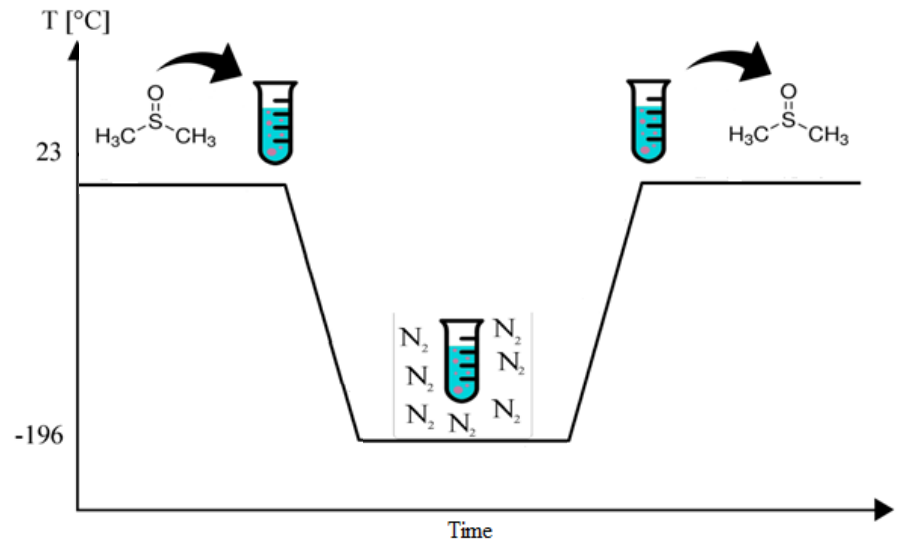
A seconda del tipo di CPA la formazione del ghiaccio è sfavorita per diversi motivi:

- CPA non penetranti causano lo shrinkage delle cellule durante l'equilibratura e successivamente durante il congelamento (piccolo volume → bassa probabilità di formare ghiaccio intracellulare)
- CPA penetranti ad alte concentrazioni riducono la mobilità della soluzione intra ed extracellulari favorendo la formazione di una fase vetrosa che aiuta la conservazione del materiale biologico

Crioconservazione con CPA - 2

Fasi della Crioconservazione

- equilibratura delle cellule con CPA
- congelamento rapido del campione
- conservazione in azoto liquido
- scongelamento del campione
- rimozione del CPA dalle cellule



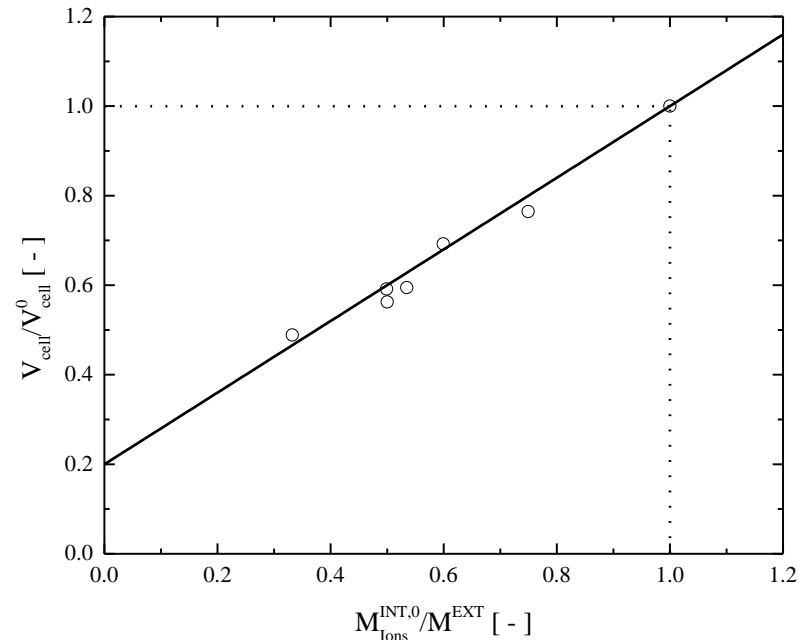
Fenomeni chimico-fisici che si presentano durante le diverse fasi del processo:

- durante l'aggiunta, possono manifestarsi degli effetti citotossici dovuti ai CPA
- durante il congelamento, la formazione del ghiaccio può danneggiare le cellule
- durante lo scongelamento, la devitrificazione/ricristallizzazione del ghiaccio
- durante la rimozione, le cellule possono esplodere a causa delle escursioni volumiche

Modelli Matematici – Osmosi (Cenni)

Il modello a due parametri 2P proposto da Jacobs e successive viene comunemente usato per descrivere la risposta osmotica delle cellule a contatto con CPA penetranti e non. *Jacobs (1933), Kleinhans (1998)*.

La cellula scambia acqua e soluti permeanti attraverso la membrana semipermeabile e trattiene i soluti intracellulari. Una conseguenza di questo modello matematico è che la cellula è descritta come un osmometro perfetto che segue il Boyle van't Hoff plot.



Tramite prove all'equilibrio con CPA si può calcolare la frazione di volume inattivo cellulare e prevedere il volume finale all'equilibrio senza per forza simulare tutta la dinamica.

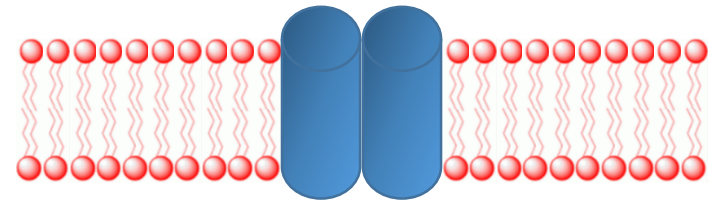
Modelli Matematici – Osmosi (Cenni) - 2

Tuttavia, è stato trovato che le cellule staminali mesenchimali umane isolate da sangue di cordone ombelicale non si comportano come perfetti osmometri (*Casula et al. (2017)*) e successivamente è stato ricavato un nuovo modello matematico per descrivere questo particolare comportamento osmotico (*Casula et al. (2019)*).

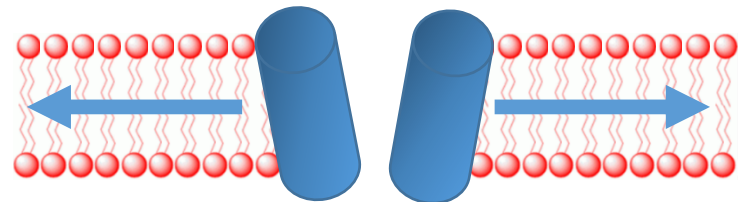
Durante il swelling (shrinkage) delle cellule la tensione di membrane aumenta (si riduce) tale che:

- il flusso osmotico di acqua viene contrastato dalla pressione idrostatica (legge di Laplace)
- i canali mecano-sensibili si aprono, così permettendo la fuoriuscita di materiale intracellulare

Condizione di Riposo o di Shrinkage

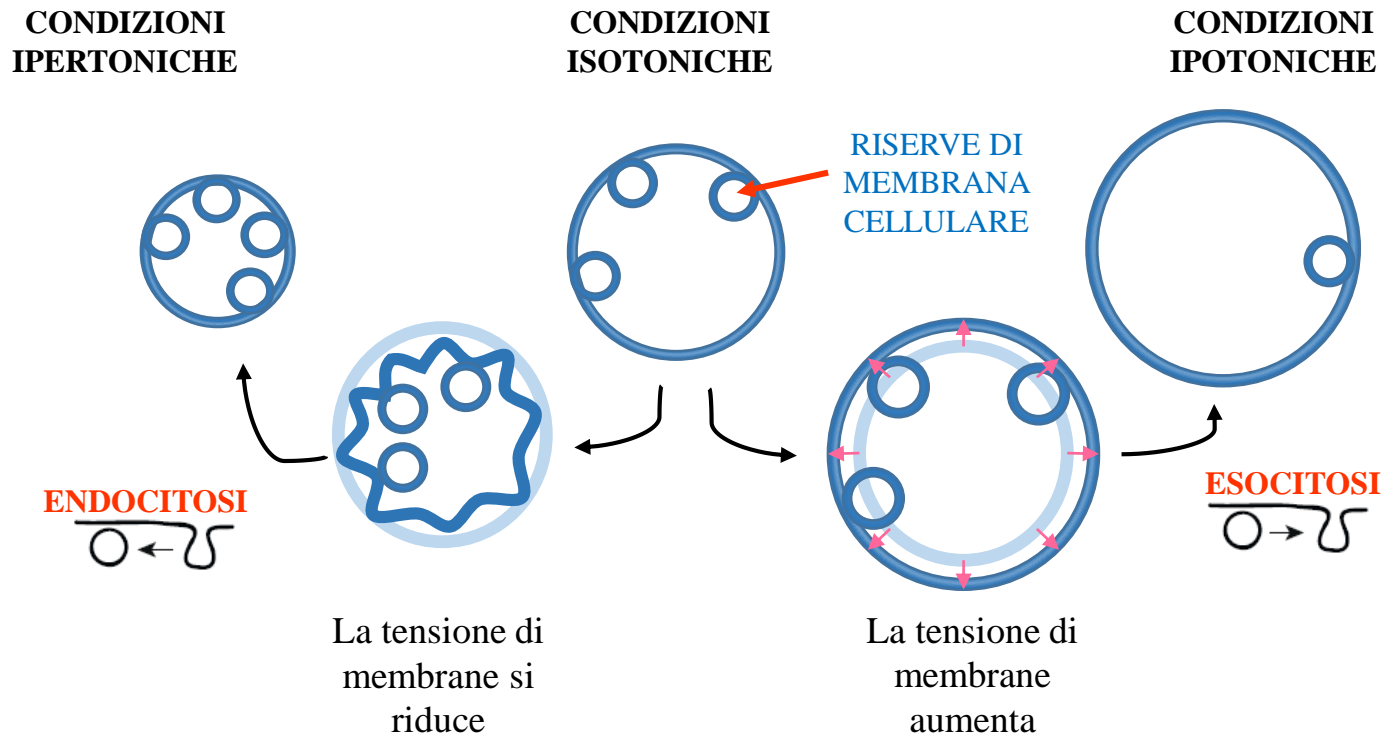


Condizione di Attivazione meccanica

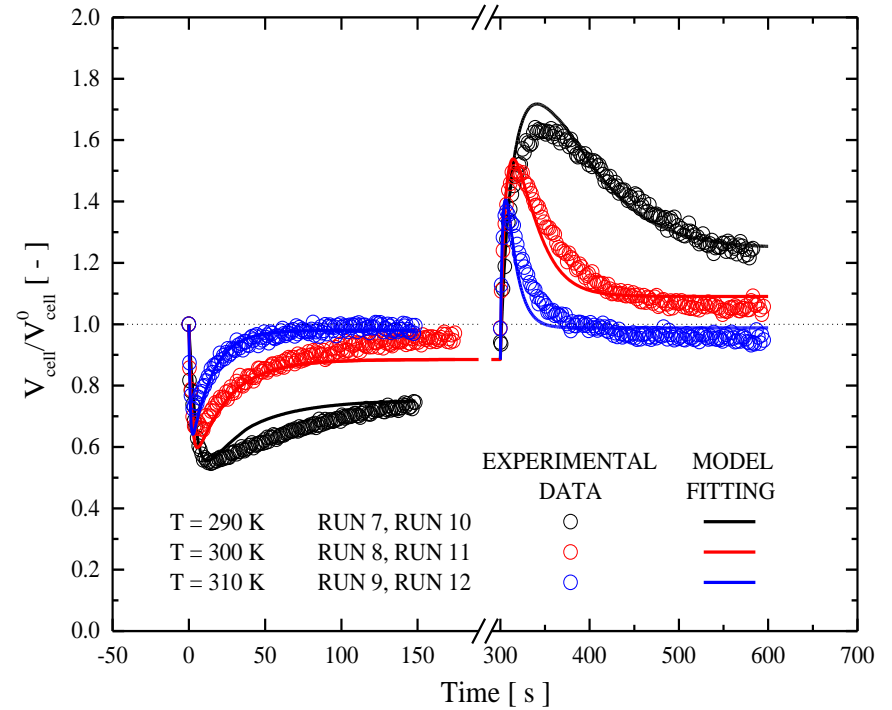
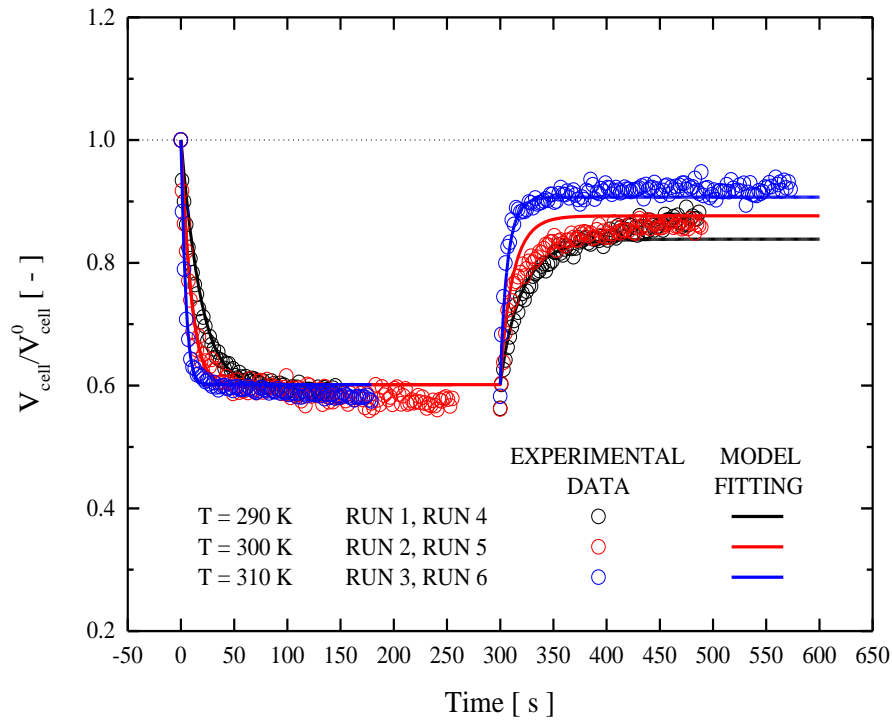


Modelli Matematici – Osmosi (Cenni) - 3

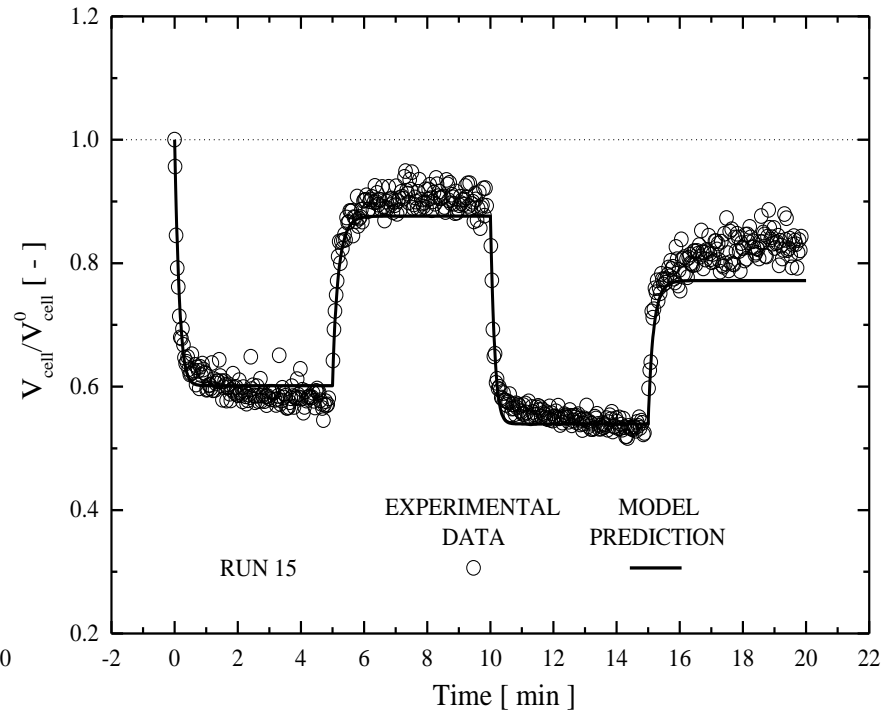
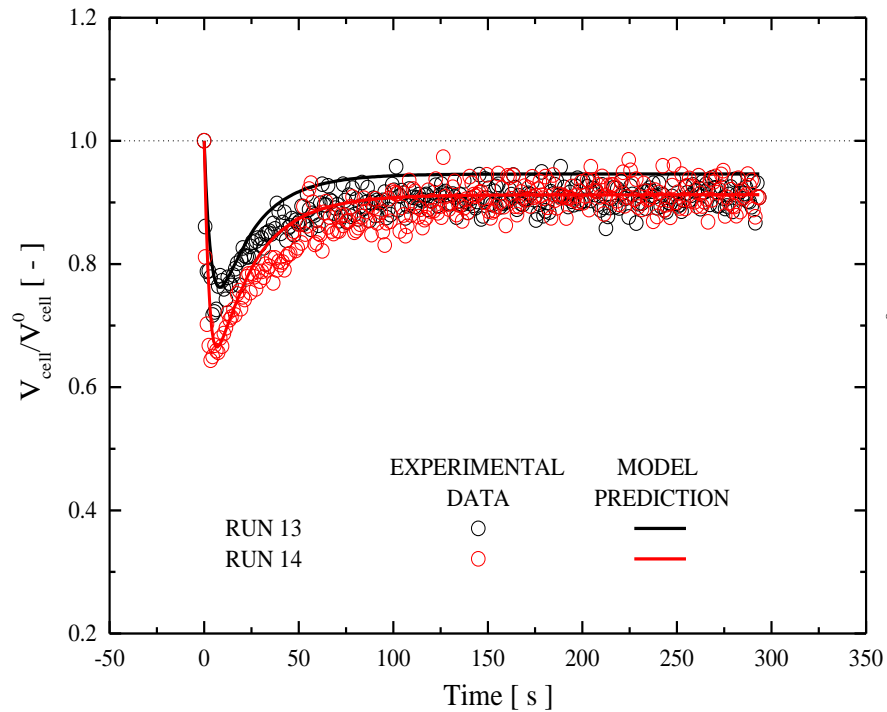
Questo diverso comportamento è descritto aggiungendo al modello 2P l'accoppiamento tra osmosi e meccanica della membrana cellulare controllata dalla Surface Area Regulation (SAR).



Modello Osmotico VS Exp Data



Modello Osmotico VS Exp Data - 2



Citotossicità del DMSO

La citotossicità del DMSO è stata investigata facendo variare la temperatura (10, 22, 37 °C), la concentrazione di CPA (da 0 a 30 % vol) e il tempo di esposizione (equilibratura, da 5 a 120 minuti).

Sono state effettuate delle misure ripetute attraverso:

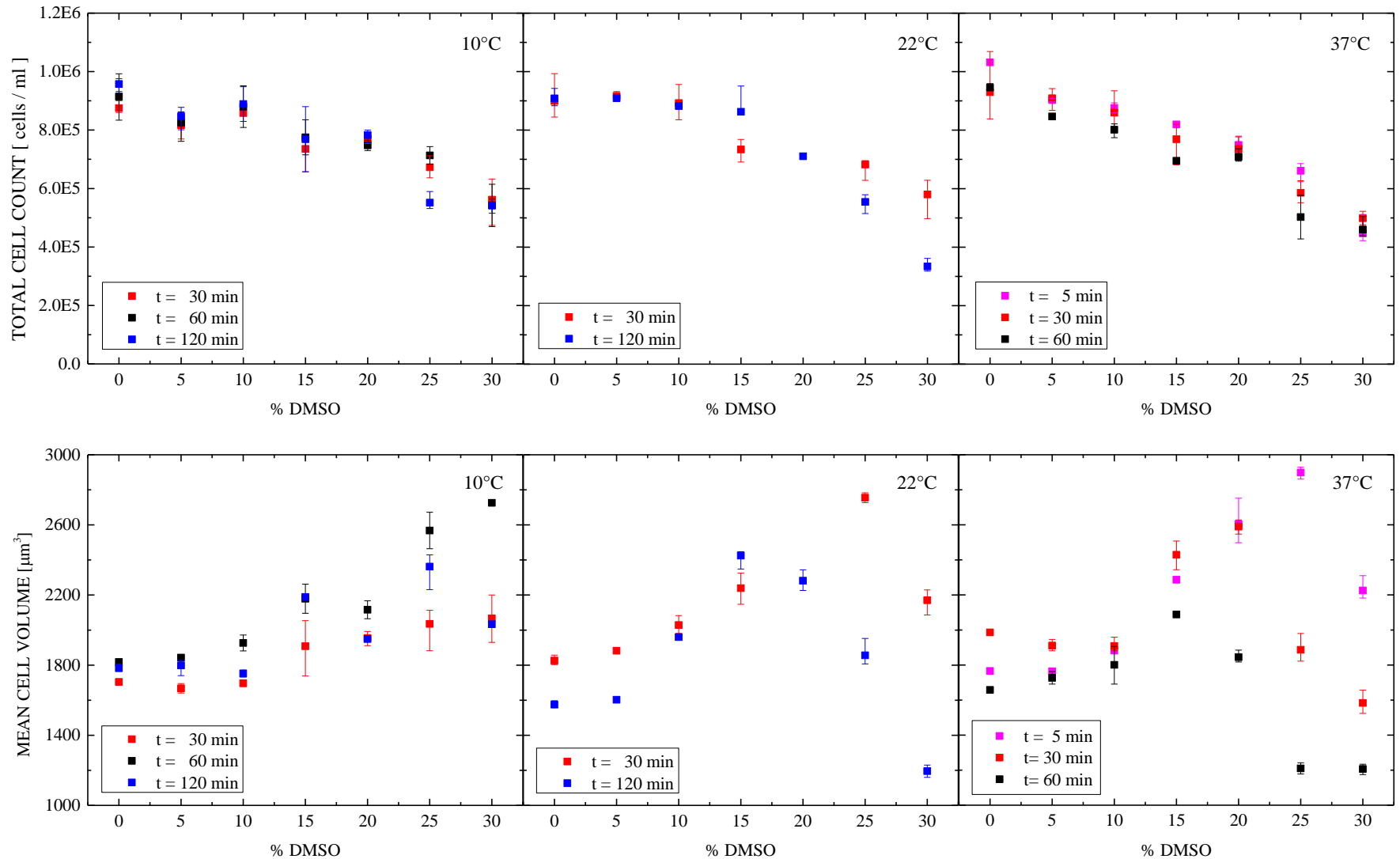
- Coulter Counter
- Citofluorimetro (Annexin V + PI)

Fenomeni fisico chimici:

- Osmosi
- Citotossicità

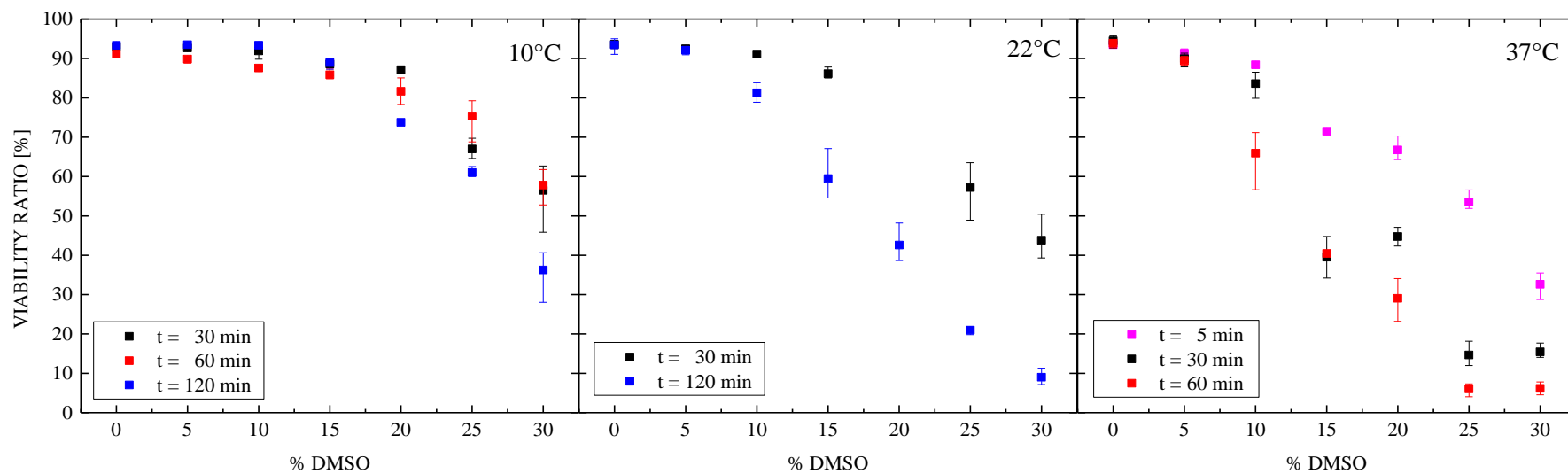
Citotossicità del DMSO - 2

Coulter Counter



Citotossicità del DMSO - 3

Citofluorimetro



Conclusioni

- Il processo di crioconservazione presenta diversi fenomeni chimico-fisici quali osmosi, formazione di ghiaccio e/o vetro, citotossicità.
- I fenomeni chimico-fisici presentati possono causare perdita di cellule anche nel se non si forma ghiaccio, qualora le fasi del processo non vengano ottimizzate.
- L'osmosi può causare una riduzione nel numero di cellule
- La citotossicità può ridurre invece la vitalità e/o funzionalità

Grazie per l'attenzione

Referenze

- Casula E, et al. (2017). Osmotic behaviour of human mesenchymal stem cells: Implications for cryopreservation. *PLOS ONE* 12(9): e0184180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184180>.
- Casula E. Modelling the osmotic behaviour of human mesenchymal stem cells. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 15 November 2019, 107296. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107296>
- Jacobs M.H. (1933). The simultaneous measurement of cell permeability to water and to dissolved substances. *J. Cell. Comp. Physiol.*;2:427–444
- Kleinhans F.W. (1998). Membrane Permeability Modeling: Kedem–Katchalsky vs a Two-Parameter Formalism, *Cryobiology*, Volume 37, Issue 4, Pages 271-289, ISSN 0011-2240, <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2135>.

Appendice A: Equazioni Osmosi

$$\begin{cases} \frac{dV_w}{dt} = -L_p S_{Sph} (\Delta P - \Delta \Pi) \\ V_w = V_w^0, \quad @ \quad t = 0 \end{cases}$$

$$\Delta \Pi = RT(M^{INT} - M^{EXT})$$

$$M^{INT} = M_{Ions}^{INT} + M_{CPA}^{INT}$$

$$M^{EXT} = M_{Ions}^{EXT} + M_{CPA}^{EXT} + M_{Sucrose}^{EXT}$$

$$M_{Ions}^{INT} = \frac{\varphi}{\tilde{v}_{Ions}} \frac{V_{Ions}}{V_w}$$

$$M_{CPA}^{INT} = \frac{1}{\tilde{v}_{CPA}} \frac{V_{CPA}}{V_w}$$

$$L_p = L_p^\infty \exp\left(-\frac{E_{ATT,W}}{RT}\right)$$

$$\Delta P = p^{INT} - p^{EXT} = \frac{2h\Delta\sigma}{r}$$

$$r = \sqrt[3]{\frac{3V_{Cell}}{4\pi}}$$

$$\Delta\sigma = \sigma - \sigma_R$$

$$\sigma = \frac{K}{2} \left(\frac{S_{Sph}}{S_{Ref}} - 1 \right)$$

$$S_{Sph} = 4\pi \left(\frac{3V_{Cell}}{4\pi} \right)^{\frac{2}{3}}$$

$$\begin{cases} \frac{dV_{CPA}}{dt} = \tilde{v}_{CPA} P_{CPA} S_{Sph} (M_{CPA}^{EXT} - M_{CPA}^{INT}) \\ V_{CPA} = V_{CPA}^0 \quad @ \quad t = 0 \end{cases}$$

$$P_{CPA} = P_{CPA}^\infty \exp\left(-\frac{E_{ATT,CPA}}{RT}\right)$$

$$\begin{cases} \frac{dV_{Ions}}{dt} = P_{Ions} S_{Sph} (M_{Ions}^{EXT} - M_{Ions}^{INT}) \\ V_{Ions} = V_{Ions}^0 \quad @ \quad t = 0 \end{cases}$$

$$P_{Ions} = \begin{cases} 0 & \sigma \leq \sigma_R \\ P_{Ions}^\infty \exp\left(-\frac{E_{ATT,Ions}}{RT}\right) & \sigma > \sigma_R \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{dS_{Ref}}{dt} = k_S \Delta\sigma (2\pi hr) \\ S_{Ref} = S_{Ref}^0 \quad @ \quad t = 0 \end{cases}$$

$$V_{Ions}^0 = \frac{(V_{Cell}^0 - V_B)}{1 + \frac{\varphi}{\tilde{v}_{Ions} M_{Ions}^{INT,0}}}$$

$$V_{Water}^0 = V_{Cell}^0 - V_{Ions}^0 - V_B$$

$$S_{Ref}^0(\Delta\sigma = 0) = \frac{S_{Sph}^0}{1 + \frac{2\sigma_R}{K}}$$

Appendice A – 2: Parametri Osmosi

Parameter	Value	Unit
$E_{ATT,CPA}$	72075.5	[J mol ⁻¹]
$E_{ATT,Ions}$	22165.6	[J mol ⁻¹]
$E_{ATT,w}$	49845.9	[J mol ⁻¹]
h	0.5	[μm]
K	33000	[Pa]
k_S	$1.179876 \cdot 10^{-4}$	[Pa ⁻¹ s ⁻¹]
L_P^∞	65.8676	[μm Pa ⁻¹ s ⁻¹]
P_{CPA}^∞	$1.04023 \cdot 10^{12}$	[μm s ⁻¹]
P_{Ions}^∞	$4.50577 \cdot 10^{-3}$	[μm s ⁻¹ L mOsm ⁻¹]
R	8.314472	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]
σ_R	826	[Pa]
v_B	0.2	[-]
\tilde{v}_{CPA}	$7.1 \cdot 10^{-5}$	[m ³ mol ⁻¹]
\tilde{v}_{Ions}	$2.7 \cdot 10^{-5}$	[m ³ mol ⁻¹]
φ	2	[-]