

УДК 615.361.014.41:57.086.13

UDC 615.361.014.41:57.086.13

Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетияБ. ФУЛЛЕР¹, К. ГРИН², В.И. ГРИШЕНКО³¹Университетский колледж Роял Фри и медицинская школа, ² Институт медицинских исследований Нортвик Парк, г. Лондон³Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков**Cryopreservation for Cell Banking: Current Concepts at the Turn of the 21st Century**B. FULLER¹, C. GREEN², V.I. GRISCHENKO³¹Royal Free & University College Medical School, ²Northwick Park Institute for Medical Research, London³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Всего более 50 лет прошло со времени первых сообщений о восстановлении живых клеток после воздействия криогенных температур, но с тех пор наука криобиология продвинулась далеко вперед, внося вклад во многие области биологии и медицины. Криоконсервирование стало главной, рутинной процедурой в таких областях, как репродуктивная медицина человека, разведение животных, хранение в низкотемпературных банках клеток разных видов (как про-, так и эукариотов), создание коллекции эталонов клеток, хранение в криобанках крови и небольших тканей. За это время был накоплен большой объем знаний в понимании основных механизмов, контролирующих смерть клеток или выживание, и цель обзора состоит в том, чтобы изложить данную информацию. Впереди остается также много вопросов, решив которые криобиология внесет свой вклад в биотехнологию и тканевую инженерию. Эти вопросы обсуждаются в данной работе.

Ключевые слова: криоконсервирование, криопротектор, тканевая инженерия.

Трохи більше 50 років минуло з часу перших повідомлень про відновлення живих клітин після дії криогенних температур, але з того часу наука криобіологія просунулась далеко вперед і внесла свій вклад в багато областей біології і медицини. Криоконсервування стало головною, рутинною процедурою в таких областях, як репродуктивна медицина людини, розпліджування тварин, зберігання в низькотемпературних банках клітин різних видів (як про-, так і еукаріотів), створення колекції еталонів клітин, зберігання в криобанках крові і фрагментів тканин. За цей час було накопичено великий об'єм знань в розумінні основних механізмів, які контролюють загибель клітин або виживання, і мета даного огляду – викладення даної інформації. У майбутньому залишається також багато питань, з вирішенням яких криобіологія зробить внесок в біотехнологію і тканинну інженерію. Ці питання обговорюються у даній роботі.

Ключові слова: криоконсервування, криопротектор, тканинна інженерія.

It is only just over 50 years since the first reports of recovery of living cells from cryogenic temperatures, but since then, the science of cryobiology has progressed to make an impact in many areas of biology and medicine. Cryopreservation has become a central, routine procedure in areas such as human reproductive medicine, animal breeding, banking of cells from many genera (both prokaryotes and eukaryotes) to establish Reference Collections, and cryo-banking of blood and small tissues. During this time, a considerable understanding has been accrued of the basic mechanisms which control cell death or survival, and the aims of the current review are to set out this information. There also remain many challenges ahead, to expand the science of cryobiology in biotechnology and tissue engineering, and these are discussed.

Key-words: cryopreservation, cryoprotectant, tissue engineering.

Сохранение жизнеспособных клеток, в частности изолированных или культивируемых, является неотъемлемой составляющей качественной биотехнологии. По сути, клетки необходимо “приостановить во времени”, чтобы затем восстановить пробы для замены культур, утративших производительность в результате старения, из-за инфекции или механического повреждения, а также для обеспечения надежности продукта необходимо сравнить различные пробы с известным типом культур.

Адрес для корреспонденции: Б. Фуллер, Университетский колледж Роял Фри и медицинская школа, г. Лондон, NW3 2QG, Великобритания, тел: 00 44 (0)207 472 6111, e-mail: b.fuller@rfc.ucl.ac.uk

The ability to preserve viable cells from a particular isolate or batch culture is an integral requirement of good product management in biotechnology. In essence the cells need to be “suspended in time” so that batches can be revitalised to replace cultures which have lost productivity through senescence, infection or mechanical failure; also, the identity of various batches must be validated against known type

Address for correspondence: B. Fuller, Royal Free & University College Medical School, London, NW3 2QG, UK, тел: 00 44 (0)207 472 6111, e-mail: b.fuller@rfc.ucl.ac.uk

Таким образом, это требование подразумевает срок хранения на протяжении многих месяцев и лет. На сегодня криоконсервирование – единственный известный метод, способный обеспечить такое длительное сохранение жизнеспособности ядерных клеток млекопитающих или растений. Процесс замораживания-высушивания (описанный ранее) – технология, подходящая для многих бактерий, грибов или водорослей, но что касается эукариотических клеток, такой процесс еще не вошел в установившуюся практику применения, хотя с недавнего времени интерес к его использованию для более сложных систем возобновляется. В работе приводится обзор того, что на сегодня известно о криоконсервировании, преимущества и недостатки существующих методов, новые разработки. Будут обсуждаться некоторые новые идеи об альтернативных подходах к хранению клеток, а также успехи, достигнутые в данной области.

1.1. Исторические перспективы криоконсервирования

Для эукариотических клеток жизненные процессы зависят от значительного постоянного потребления энергии для поддержания жизненных метаболических и ультраструктурных функций посредством множества неравновесных реакций. Эти процессы также в значительной степени зависят от роли воды как универсального растворителя и в обеспечении ферментативной функции. Взаимосвязанные процессы производства энергии, синтеза и восстановления в клетках осуществляются в водном окружении, разделенном на упорядоченные домены, которые образованы гидрофобными барьерами, представленными в виде клеточных мембран, в том числе плазматической мембраной и мембранами внутриклеточных органелл. Жизнеспособность клеток не может быть обеспечена до тех пор, пока технология хранения не будет защищать эти взаимосвязанные процессы в комплексе. Любой подход, допускающий какой-либо сдвиг химического равновесия в клетке, приводит к летальному исходу. Поскольку при нормальной температуре тела большинству биохимических реакций необходима положительная энергия активации, самый простой способ замедлить жизненные процессы – снижение свободной энергии реагентов посредством охлаждения. Тем не менее охлаждение до гипотермических температур (до 0°C без замораживания) эффективно при поддержании жизнеспособности только в том случае, если это касается сохранения в течение часов или дней в зависимости от сложности клеток. Гипотермия не останавливает биохимические реакции, и метаболические изменения (например, продукция лактата из глюкозы) могут легко определяться в охлажденных клеточных культурах. Существует множество данных по воздействию гипотермии на системы млекопитающих, что находится

cultures for assured product safety. Thus the requirement is for storage over a period of months or years. Currently, cryopreservation is the only known method capable of delivering such long-term viability for nucleated mammalian or plant cells. Freeze-drying (described previously) is a valuable technology for many bacteria, fungi or algae, but for eukaryotic cells, it is not yet in routine application, although there has been renewed interest in the recent past in applying it to more complex systems. The text will review what is known about cryopreservation, the benefits and limitations of the current methods, and new developments which have found routine application. We will also discuss some of the new ideas on alternative approaches to cell storage, and describe the progress made so far.

1.1. Historical perspectives on cryopreservation

For eukaryotic cells, life processes depend on a large, continual, expenditure of energy to maintain vital metabolic and ultrastructural functions through a multitude of non-equilibrium reactions. These processes are also heavily dependent on the role of water as the universal solvent and facilitator of enzymatic function. The inter-linked processes of energy production, synthesis and repair in cells are carried out in aqueous environments separated into ordered domains by interpolation of the hydrophobic barriers presented by cell membranes, equally presented as the limiting plasma membrane and those surrounding intracellular organelles. Viability cannot be maintained unless the storage technique protects these inter-dependent processes in a cohesive manner. Any approach which permits a random decline towards chemical equilibrium in the cell is inevitably lethal. Since at normal body temperatures, most biochemical reactions require a positive energy of activation, the simplest way to slow life processes is to lower the free energy of the reactants by cooling. However, cooling to refrigeration temperatures (down to 0°C without freezing) is effective in maintaining viability only for a matter of hours or days, depending on the complexity of the cells. Hypothermia does not halt biochemical reactions, and metabolic changes (for example, production of lactate from glucose) can be easily detected in cooled cell cultures. There is a wealth of information on effects of hypothermia on mammalian systems, which is beyond the scope of the current discussion [19], but it suffices to say that we have to proceed to far lower temperatures to be able to retain cell viability. The concept of 'frozen in time' is very apt, since we must aim for storage at temperatures where molecular interactions are inhibited over the periods we need

за рамками данного исследования [19], но достаточно сказать, что для сохранения выживаемости клеток мы должны перейти к более низким температурам. Концепция “замораживания во времени” весьма удачна, поскольку следует стремиться к хранению при температурах, когда молекулярные взаимодействия ингибируются на протяжении требуемого периода (годы). Это может быть достигнуто только при низких субнулевых температурах. Основная проблема – роль воды в клеточных процессах и законах физики, управляющих фазовым переходом воды в лед. (Если бы вода не формировала кристаллы льда до -100°C , долгосрочное хранение было бы относительно простой операцией).

1.2. Проблемы формирования льда в клетках

Термодинамика разведенных растворов может использоваться для описания изменений в клеточных суспензиях во время замораживания. Химический потенциал идеального, разведенного раствора зависит от температуры, давления и концентрации растворенных веществ. При охлаждении лед неизбежно зарождается вне клеток в окружающей среде. (Формирование льда внутри клеток – запаздывающее событие в процессе охлаждения, как будет описано далее, и никогда не возникает при некоторых обстоятельствах). Температура, при которой это происходит, будет определяться составом растворов и самим процессом образования зародышевой кристаллизации. Для клеточных культур в нормальной среде равновесная точка замораживания (или плавления) солевой смеси составляет около $-0,55^{\circ}\text{C}$ (это также температура, при которой можно определить энтальпию плавления), но при такой температуре зародышеобразование происходит нечасто. Практически растворы часто не замерзают до тех пор, пока не охладятся на несколько градусов ниже данной равновесной точки плавления – в данном случае такой раствор называется сверхохлажденным или точнее переохлажденным [18]. Это происходит потому, что для образования льда требуется зародышеобразование, создающее поверхность раздела фаз жидкость-твердое тело. Последующее снижение температуры увеличивает статистическую вероятность образования зародыша льда настолько, что сверхохлажденный раствор неизбежно будет образовывать лед (это метастабильное состояние), и охлажденная вода не будет оставаться в жидкой форме до бесконечности (до тех пор, пока другие физические параметры в системе будут изменяться, как, например, сильное повышение давления). Образование зародыша, скорее всего, ускоряется присутствующими в растворе маленькими частицами, которые принимают участие в упорядочении молекул воды, – явление, названное гетерогенной нуклеацией. (В специально приготовленных образцах чистой фильтрованной воды в виде маленьких капель возможно охлаждение до гораздо более низких температур, близких к -40°C , при которых происходит гомогенная нуклеация, катализи-

(years). This can only be achieved at deep subzero temperatures; the over-arching problem is the central role of water in cell processes, and the physical laws dictating the phase transition of water to ice. (If water did not form ice crystals until -100°C , long-term storage would be a relatively simple operation).

1.2. The problems of ice formation for cells

The thermodynamics of dilute solutions can be used to describe the changes in suspensions of cells during freezing. The chemical potential of an ideal, dilute solution is related to temperature, pressure and concentration of dissolved solutes. On cooling, ice invariably nucleates outside cells in the surrounding medium. (The formation of ice inside cells is a delayed event in the process of cooling, as will be described below, and may never happen in some circumstances). The temperature at which this occurs will be dictated by the content of solutes, and the process of nucleation itself. For cell cultures in normal medium, the equilibrium freezing (or melting) point of the saline mixture is about -0.55°C (this is also the temperature at which the enthalpy of melting can be detected), but at this temperature nucleation events are infrequent. In practical terms, solutions often will not freeze until cooled several degrees below this equilibrium melting point – the solution is said to be super-cooled (or, [18], more correctly, under-cooled). This is because ice formation requires a nucleation event which creates a solid to liquid interface. The further reduction in temperature increases the statistical likelihood of ice nucleation such that the super-cooled solution will inevitably form ice, it is a meta-stable state and the cooled water will not remain in the liquid form indefinitely (unless other physical parameters in the system are altered, such as a large increase in pressure). Nucleation events are most likely to catalysed by small particles in solution which assist the ordering of the water molecules, an event called heterogenous nucleation. (In specially prepared samples of pure water subjected to filtration and maintained in small droplets, it is possible to cool to much lower temperatures close to -40°C , at which homogenous nucleation occurs, catalysed by molecular interaction of water molecules themselves [18], but this is not a practical way of cooling cell suspensions). The changes in physical orientation of water molecules in liquid water and in ice are beyond the current discussion (see [56], for descriptions) but in simple terms, water molecules in ice become hydrogen bonded to a group of four other water molecules in a tetrahedral orientation, in such a way that the solvent interactions with other

рованная взаимодействием молекул воды [18], но этот метод не может быть использован для охлаждения клеточных суспензий). Изменения физической ориентации молекул жидкой воды и льда не относятся к данному исследованию [56], но, если говорить кратко, молекулы воды в кристалле льда соединяются посредством водородных связей с группой из четырех других молекул воды в тетраэдрической конформации таким образом, что взаимодействие растворителя с другими растворенными веществами в исходном растворе не осуществляется – лед кристаллизуется в виде чистой фазы, вытесняя ионы и другие растворенные вещества в остаточный, частично замороженный раствор. Это увеличивает осмолярность остаточного раствора во внеклеточном компартменте, снижая химический потенциал внеклеточного раствора, в сравнении с химическим потенциалом внутриклеточной воды при данной температуре. Вода будет уменьшать градиент химического потенциала, вызывая осмотический стресс и снижение клеточного объема. При последующем охлаждении кристаллы льда продолжают расти, увеличивая содержание растворенного вещества в остаточном растворе таким образом, что концентрации в остатке порядка 5 моль могут быть достигнуты при температуре -25°C [23]. Mazur [28] получил систему из 4-х уравнений для описания данного процесса, которая приводится в работе [30].

Важнейшие факторы, которые определяют, как именно определенный тип клеток будет отвечать на охлаждение при субнулевых температурах, включают также характеристики, описывающие осмотические параметры клетки (проницаемость клеточной мембраны для воды и поверхностно-объемное соотношение клетки), изменение водной проницаемости при охлаждении, время и температуру охлаждения, а также изменение давления пара и содержания растворенных веществ во внутриклеточных и внеклеточных растворах при росте фракции льда. С помощью экспериментального измерения и теоретического вычисления этих характеристик, по указанной системе уравнений Mazur показал, что рассчитанные результаты охлаждения клеток могут в определенной степени соответствовать наблюдаемым изменениям в клетках при охлаждении до субнулевых температур [30]. Если скорости охлаждения низкие и водная проницаемость через клеточную мембрану остается в равновесии с изменением давления пара раствора, клетки могут поддерживать эффективное осмотическое равновесие с концентрированной ледяной матрицей. Если охлаждение производится с быстрыми скоростями, так что переохлажденная вода остается внутри клетки, то будет существовать большая вероятность образования внутриклеточного льда, что обычно вызывает смерть клеток. Это две составляющие дилеммы: при медленном охлаждении клетки выдерживаются более длительное время в гипертонической среде с концентрацией в 30 раз выше, чем концентрация

solutes in the original solution are restricted – ice crystallises as pure water, excluding the ions and other solutes into the residual partially-frozen solution. This increases the osmolality of the residual solution in the extracellular compartment, lowering the chemical potential of the external solution relative to that of the intracellular water at the given temperature. Water will move down this chemical potential gradient, causing an osmotic stress and a reduction in cell volume. As cooling proceeds further, ice continues to grow, increasing the solute content of the residual solution such that concentrations in excess of 5 molal can be reached by the time temperatures of -25°C have been passed [23]. Mazur [28] has described four simultaneous equation to describe this process, and a full description is given in [30]. The dominant factors which dictate how a particular cell type will respond to subzero cooling include those describing the osmotic characteristics of the cell (the water permeability of the cell membrane and the surface area/volume ratio of the cell), the change of water permeability with cooling, the time and temperature of the cooling event, and the change in vapour pressure and solute contents of intracellular and extracellular solutions as the fraction of ice increases. By measuring or computing these factors into the equations, Mazur has shown that the predictive outcomes during cell cooling can, to a reasonable degree, match the observed changes in cells during subzero cooling [30]. If cooling rates are low, and the water permeability of the cell membrane remains in balance with the changing vapour pressure of solution, the cells can maintain effective osmotic balance with the concentrated ice matrix; if the cooling is faster, such that super-cooled water remains inside the cell, then there is a strong likelihood that this will nucleate intracellular ice, commonly associated with lethal cell damage. These are the “horns of the dilemma”; cool slowly and the cells are exposed for prolonged periods to a hypertonic medium more than x30 time higher than isotonic media needed for normal survival (such an osmotic stress can cause irreversible breakdown in membrane structures and destabilise proteins); cool rapidly and intracellular ice can be formed. This has come to be known as the “2-factor” hypothesis for cell injury during cryopreservation [21] and will be described below.

On further cooling, physical changes in the frozen solution can be detected even below -80°C . For simple saline solutions, the increase in sodium chloride as ice forms leads to a point of crystallisation of the residual salt/liquid/ice mix at the eutectic temperature (measured to be -21.2°C). However, in biological samples such as cell

изотонической среды, необходимой для нормального выживания (такой осмотический стресс может вызвать необратимое повреждение структур мембраны и дестабилизировать белки); при быстром охлаждении может образоваться внутриклеточный лед. Такое расследование известно как двухфакторная теория повреждения клеток при криоконсервировании [21], и будет описано ниже.

При последующем охлаждении физические изменения в замороженном растворе могут определяться даже при -80°C . Для простых солевых растворов, увеличение концентрации хлорида натрия по мере образования льда приводит к кристаллизации остаточной смеси соль-жидкость-лед при эвтектической температуре ($-21,2^{\circ}\text{C}$). Однако в таких биологических образцах, как суспензии клеток, содержащих сложные смеси фосфолипидов в мембранах, белки и другие высокомолекулярные растворенные вещества, существование такой чистой эвтектики мало вероятно. Наблюдения с помощью калориметрического и термального анализов [7,26], а также с использованием криомикроскопа [49] показывают, что остаточная, высококонцентрированная вязкая смесь претерпевает переход в стекловидную матрицу в диапазоне температур от -100 до -120°C . До тех пор, пока такое состояние не будет в конечном итоге достигнуто, настоящее долговременное сохранение жизнеспособности невозможно. Это считается одной из причин, почему клетки могут храниться только в течение некоторого времени (несколько недель или месяцев) при -80°C ; при этой температуре все еще происходит медленная, но постоянная деградация молекул, несовместимая с клеточной выживаемостью. Приведенные данные показывают, что управление условиями охлаждения является важной частью успешного консервирования. Тем не менее, перед более детальным обсуждением этого вопроса мы должны указать, что клетки млекопитающих не могут выживать как при быстром, так и медленном охлаждении без добавления защитных или замещающих растворенных веществ, известных как криопротекторы.

1.3. Роль криопротекторов в замораживании клеток

История успешного криоконсервирования относительно коротка. Всего 50 лет прошло с тех пор, как появились сообщения о работе по сохранению жизнеспособных клеток (в данном случае спермы петуха) [45], и история этого успеха также является историей поиска криопротекторов. Первый успех был связан только с использованием относительно высоких концентраций глицерина. С того времени множество исследований было посвящено веществам, которые могут быть использованы как криопротекторы. При работе над криоконсервированием эритроцитов Lovelock [24] идентифицировал центральный механизм защиты,

содержащих сложные смеси фосфолипидов в мембранах, белки, и другие высокомолекулярные растворенные вещества, маловероятно, что такая чистая эвтектика существует. Доказательства из калориметрических и термальных анализов [7,26], и из наблюдений с использованием криомикроскопа [49] предполагают, что остаточная, высококонцентрированная, вязкая смесь претерпевает переход к стекловидной матрице, при температурах между -100 и -120°C . Это не до тех пор, пока это состояние наконец достигнуто, что истинное, долгосрочное сохранение жизнеспособности может быть обеспечено. Это считается одной из причин, почему клетки могут храниться только для промежуточного времени (недели или месяцы) при -80°C ; все еще происходит медленная, но постоянная молекулярная деградация при этой температуре, которая несовместима с жизнеспособностью клеток. Из этих описаний очевидно, что контроль условий охлаждения является важной частью успешного криосохранения. Однако, перед обсуждением этого в более подробных деталях, следует отметить, что млекопитающие клетки не могут выжить ни при быстром, ни при медленном охлаждении без добавления защитных или совместимых растворенных веществ, также известных как криопротективные агенты (CPA).

1.3. The role of cryoprotectants in cell freezing

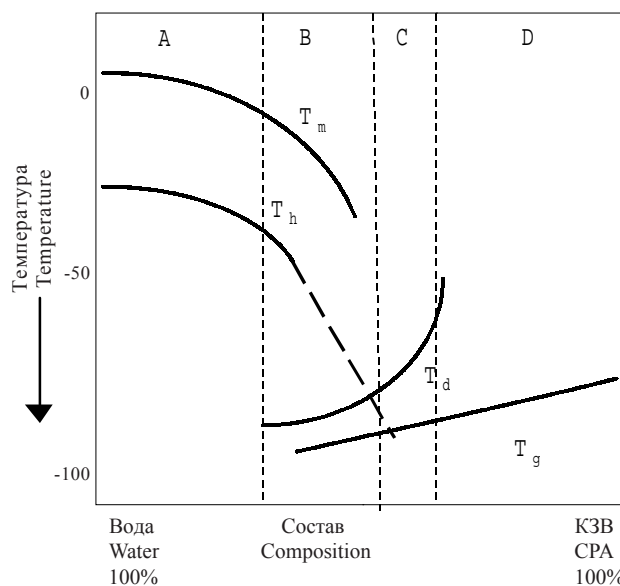
The history of successful cryopreservation is relatively short. It is a mere fifty years since the seminal paper on recovery of viable cells (in this case fowl semen) was reported [45], and the story of that success is also the story of the identification of cryoprotectants (CPA). It was only by the use of relatively high concentrations of glycerol that this first success was achieved. Since that time, several investigations have focused on agents which can be used as CPA. Working on cryopreservation of red cells, Lovelock [24] identified a central mechanism of protection when he hypothesised that agents such as glycerol can act as colligative effectors at the concentrations used in cryopreservation; they could be added in high concentrations (in excess of 10% w/v), at which level they would significantly reduce the quantity of ice formed at a given subzero temperature (i.e. act by a solute depression of freezing point on a molar basis). Lovelock identified a range of neutral solutes, including dimethyl sulphoxide (Me_2SO) which possessed such activity, but (of equal importance) could be tolerated by cells without lethal toxic effects. One important point which was established early on [24] was that the CPA needed to be present in both intra- and extracellular solutions, and thus the cell membrane permeability for a given CPA is of great significance. Agents such as glycerol or various sugars (including sucrose) also increase the

выдвинув гипотезу, что такие криопротекторы, как глицерин, могут действовать как коллигативные эффекторы в концентрациях, используемых при криоконсервировании: они могут добавляться в высоких концентрациях (превышающих 10% масса/объем), при которых они значительно снижали бы количество образовавшегося льда при данной субнулевой температуре (т.е. действовали бы посредством снижения точки замораживания растворенного вещества на молярной основе). Lovelock идентифицировал некоторое количество нейтральных растворенных веществ, включая диметилсульфоксид (ДМСО), которые характеризовались такими же свойствами, но (что также важно) могли бы переноситься клетками без летальных токсических воздействий. Важный момент, обнаруженный ранее [24], заключался в том, что криопротекторы должны присутствовать как во внутри-, так и внеклеточных растворах, и таким образом очень важна проницаемость клеточной мембраны для этих веществ. Такие вещества, как глицерин или различные сахара (включая сахарозу), также увеличивают вязкость раствора при низкой температуре, что может эффективно кинетически ингибировать рост кристаллов льда при охлаждении, усиливая вероятность достижения стеклования. Этот эффект может достигаться и при использовании таких высоких концентраций полимерных веществ, как полиэтиленгликоль. В данном случае этот раствор можно назвать “неидеальным”, поскольку содержание льда при данной низкой температуре все еще ниже, чем предполагалось, но не может быть объяснено статистически достоверным концентрационным снижением точки замерзания, поскольку эти растворенные вещества имеют высокую молекулярную массу. Таким образом, для клеток млекопитающих криопротекторы могут быть разделены на низко- и высокомолекулярные, но для стандартных процедур криоконсервирования существенным является использование проникающего, низкомолекулярного криозащитного вещества, даже если оно комбинировано с другими высокомолекулярными веществами. Не было получено стандартной процедуры криоконсервирования для ядерных клеток млекопитающих с использованием только внеклеточных криопротекторов.

На рисунке представлена гипотетическая фазовая диаграмма изменений в растворе, содержащем криозащитные вещества при замораживании. Кривая ликвидуса (T_m) следует увеличивающейся концентрации остаточного раствора по мере того, как образуется лед в системе в равновесных условиях. Температура гомогенного зародышеобразования (T_h) снижается с увеличением концентрации растворенных веществ в смеси, но образование льда будет происходить при температуре, близкой к -50°C . При высоких концентрациях криозащитных веществ увеличивается температура стеклования (T_g), но расстеклование может произойти во время нагревания (T_d). В практическом

viscosity of the solution at low temperatures, and this may effectively inhibit on a kinetic basis ice crystal growth during cooling whilst enhancing the likelihood of achieving a vitreous transformation. This effect may also be achieved by using high concentrations of polymeric agents such as polyethylene glycol, and the effect in this case is termed ‘non-ideal solution’ since the ice content at a given low temperature is still lower than predicted, but the effect cannot be assigned to a true molar depression of freezing point since these solutes are of high molecular weight. Thus for mammalian cells, CPA can be divided into high and low molecular weight categories, but it is essentially true for standard cryopreservation procedures that a permeating low molecular weight CPA is essential, even if it is combined with other high molecular weight agents. No routine cryo-preservation protocols for nucleated mammalian cells have been formulated using only extracellular CPA.

In Figure is a hypothetical phase diagram for the changes during freezing seen with a CPA. The liquidus curve (T_m) follows the increasing concentration of the residual solution as ice forms in the system under equilibrium conditions. The homogenous nucleation temperature (T_h) is lowered by increasing solute concentration in the mixture,



Гипотетическая фазовая диаграмма для водного раствора криопротектора (КЗВ) при охлаждении до низких температур: T_m – кривая ликвидуса (или плавления в равновесных условиях); T_h – кривая гомогенной нуклеации; T_g – кривая стеклоперехода; T_d – кривая расстеклования после отогрева; подробности см. пункт 1.3.

A hypothetical phase diagram for an aqueous solution of cryoprotectant (CPA) during cooling to low temperatures: T_m – liquidus (or equilibrium melting) curve; T_h – homogenous nucleation curve; T_g – glass transition curve; T_d – devitrification curve on warming. For explanations, see Text 1.3.

криоконсервировании (с использованием начальных концентраций криозащитных веществ 10-20% масса/объем) считается, что окончательная смесь, в основном, содержит лед с небольшой остаточной стекловидной матрицей из криозащитных растворенных и водорастворимых веществ. Поэтому в области А витрификация практически невозможна, так как при охлаждении как гетерогенное, так и гомогенное зародышеобразование происходит при низких концентрациях криозащитных веществ. В области В образцы могут охлаждаться в условиях, когда формирование льда основной массы ингибируется, но могут присутствовать потенциальные зародыши кристаллов льда, которые приведут к девитрификации и кристаллизации при отогреве (с концентрациями криозащитных веществ около 40-60%). Это явление было названо как “вдвойне нестабильное” [15].

В таблице представлен перечень наиболее часто используемых криозащитных веществ. Он включает как низкомолекулярные, проникающие в клетку вещества, так и высокомолекулярные, внеклеточные макромолекулы.

Полезным может быть использование комбинаций криозащитных веществ для увеличения выживаемости. Так, при криоконсервировании таких типов клеток млекопитающих, как предимплантационные эмбрионы, проникающие в клетку криозащитные вещества, например, ДМСО, могут использоваться в сочетании с добавлением сахаров, в частности, сахарозы [52]. Она может действовать несколькими путями, помимо обычного коллигативного. В качестве непроникающего растворенного вещества сахар будет действовать как осмотический агент, снижающий содержание воды во внутриклеточном компартменте еще до начала образования льда. Как растворенное вещество с высокой вязкостью при низких температурах сахар будет также увеличивать вязкость смеси во время замораживания и способствовать переходу ее в стекловидное состояние. Подобный дополнительный эффект может быть получен при использовании таких полимеров, как гидроксиэтилкрахмал в комбинации с традиционными криозащитными веществами, как ДМСО, при криоконсервировании стволовых клеток костного мозга [55]. В некоторых случаях добавление полимерных веществ делает возможным снижение необходимой концентрации проникающих в клетку криозащитных веществ, что является преимуществом, если существует опасность токсического воздействия низкомолекулярных веществ [54,55].

Еще одним свойством криозащитных веществ (косвенно связанным с увеличением степени обезвоживания) является способность стабилизировать структуры посредством избирательного исключения из гидратной оболочки таких важных клеточных компонентов, как белки или липиды, содержащихся в мембранных бислоях. Изначально данная теория была

but ice formation will occur by this route at temperatures close to -50°C . At high concentrations of CPA, the glass transition temperature (T_g) increases, but devitrification during warming can occur during warming (T_d). In practical cryopreservation, (using initial CPA concentrations of 10-20% w/v), the final mixture is thought to comprise largely ice with a small residual glassy matrix of CPA solutes and hydrates. In Region A, therefore, vitrification is practically impossible, because on cooling, both heterogenous and homogenous nucleation occur at low CPA concentrations. In Region B, the samples can be cooled under conditions where bulk ice formation is inhibited, but potential ice nuclei can be present, which will devitrify and freeze on rewarming (with CPA concentrations in the region of 40-60%). This has been termed a “doubly-unstable” [15].

In Table 1 are shown a list of common CPA. These include both the low molecular weight, cell permeating agents and the high molecular weight, extracellular macromolecules.

It can be beneficial to use additive combinations

Перечень известных криопротекторов (другие растворяющие вещества использовались при случайных обстоятельствах, но указанные в списке применялись более одного раза)

A list of common cryoprotectants (other solutes have been used in occasional circumstances, but those on the list have been used in more than one application)

Растворяющие вещества с низкомолекулярным весом – OH Low molecular weight – OH solutes	Сахара Sugars
Глицерин Glycerol	Сахароза Sucrose
Этиленгликоль Ethylene glycol	Раффиноза Raffinose
Пропиленгликоль Propylene glycol	Трегалоза Trehalose
Метанол Methanol	Сорбитол Sorbitol
Этанол Ethanol	
Полиэтиленоксид Polyethylene oxide	
Полимеры Polymers	Другие вещества Other compounds
Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) Hydroxyethyl starch (HES)	Диметилсульфоксид Dimethyl sulphoxide
Поливинилпирролидон (ПВП) Polyvinyl pyrrolidone (PVP)	Ацетамид Acetamide
Декстраны Dextrans	
Бычий сывороточный альбумин Bovine serum albumin	

описана [3,59] и применялась для действия криозащитных веществ [9]. Это исключение энтропически невыгодно, оно приводит к стабилизации макромолекул, к чрезмерному обезвоживанию во время медленного замораживания, что вызовет дестабилизацию мембран. Еще один эффект, связанный с резким обезвоживанием во время медленного замораживания, является частью гипотезы, что некоторые сахара, например трегалоза, могут действовать как молекулы, замещающие воду, защищая фосфолипидные бислои от дестабилизации при медленном обезвоживающем замораживании [2]. Трегалоза и подобные вещества были идентифицированы в природе у хорошо адаптированных организмов (некоторые виды полярных насекомых), способных переживать замораживание [6], и, вероятно, их эффекты будут подобны, по крайней мере, частично тем, которые были получены в лабораторных исследованиях. Тем не менее, следует отметить (и указать причины, почему трегалоза не может использоваться как единственное криозащитное вещество для установленной процедуры банкирования клеток), что результаты наблюдения в природе показывают: для выживания трегалоза должна присутствовать внутри клетки, а не только в окружающей среде – насекомые синтезируют сахар как часть процесса адаптации к холоду. Поскольку клетки млекопитающих слабо проницаемы для такого рода сахаров, само по себе добавление их к клеткам в суспензии не может обеспечить полноценную защиту от повреждения при замораживании. (Тем не менее, рассматриваются новейшие подходы к данной проблеме, и они будут обсуждаться далее). Еще одно преимущество добавления криопротекторов связано с их способностью действовать как ловушки свободных радикалов, например, ДМСО является потенциальной ловушкой свободных радикалов и их “сигналы” определялись в культурах клеток растений при криоконсервировании [17]. (Скорее всего такое образование свободных радикалов происходит из-за аномального метаболизма в клетках, восстанавливающихся после криоконсервирования, чем из-за первоначальных эффектов образования льда *per se*, но, тем не менее, дополнительный эффект может играть постоянную определенную роль в успешном восстановлении клеток непосредственно после оттаивания).

Видно, что криозащитные вещества имеют разнообразный спектр эффектов, которые могут дополнять друг друга, если рассматривать это применительно для каждой отдельной клеточной популяции. Но пока многие из указанных эффектов изучены хотя бы частично, не существует определенного теста, позволяющего идентифицировать в будущем оптимальный режим криозащитных веществ без предварительного тестирования на восстановление клеток перед применением в полном объеме. Также будет отмечено, что многие из защитных воздействий наблюдаются во время медленного обезвоживающего

of CPA to maximise survival. For example, when cryopreserving some mammalian cells types, such as pre-implantation embryos, a cell-penetrating CPA such as Me₂SO may be used in combination with an addition of a sugar such as sucrose [52]. This sugar may act in several ways beyond the simple colligative effect. As a non-penetrating solute, the sugar will act as an osmotic agent, reducing the water content in the intracellular compartment even before ice formation begins. As a solute with a high viscosity at low temperatures, the sugar will also increase overall viscosity of the mixture during freezing and facilitate the transition to a glassy state. A similar additive effect can be gained using polymers such as hydroxyl ethyl starch, in combination with traditional CPA such as Me₂SO in cryopreservation of bone marrow stem cells [55]. In some cases, addition of polymeric agents may permit a reduction in the required concentration of cell permeable CPA, which is of benefit if toxic effects of the low molecular weight agent might be causing problems in the system [55,54].

Another effect of CPA (indirectly related to amelioration of the amount of dehydration) has been the ability to stabilise structures by preferential exclusion from the hydration layers of important cellular components, such as proteins or lipids comprising membrane bilayers. The theory was originally described by Timasheff and colleagues [59,3] and applied to the effects of CPA by Crowe and colleagues [9]. Because the exclusion is entropically unfavourable, it drives the stabilisation of the macromolecules in the face of extreme dehydration during slow freezing which would act to cause molecular destabilisation. Another effect, related again to extreme dehydration, has been linked to the hypothesis that some sugars, such as trehalose, can act as ‘water replacement’ molecules, protecting phospholipids bilayers from undergoing destabilisation during slow dehydrative freezing [2]. Sugars such as trehalose have been identified in the natural world in highly selected organisms (such as polar insect species) which can survive freezing [6], and presumably their effects will be similar, at least in part, to what has been hypothesised for laboratory cryopreservation. However, a note of caution, (and a probable reason why trehalose cannot be used as sole CPA for routine cell banking) results from the observation in nature that trehalose must be present in the intracellular compartment, not only in the surrounding environment, for survival – the insects synthesise the sugar as part of a cold hardening process. Since mammalian cells are only poorly permeable to such sugars, simply adding them to cells in suspension cannot provide full protection against freezing damage. (However, novel approaches

замораживания. Роль криопротекторов в защите при быстром охлаждении, когда может образовываться внутриклеточный лед, будет описана ниже.

Какими бы ни были защитные эффекты выбранных криопротекторов, существуют проблемы при использовании данных веществ в достаточно высоких концентрациях. Кратко такой эффект может быть назван как явление осмотической и химической токсичности. Добавление проникающих криозащитных веществ (обычно в концентрациях, варьирующих между 10-15% масса/объем) подвергает клетки осмотическому стрессу, который хотя и не является таким экстремальным, как во время самого охлаждения, но может превышать рамки толерантности для клетки. Во многих работах, например [41], описываются изменения объема в клетках (в данном случае мышинные ооциты), подверженных действию криозащитных веществ. Отмечалось значительное изначальное сжатие и снижение объема клетки по мере того, как вода выходила из нее под действием осмотических сил. Затем она постепенно входила в клетки при проникновении глицерина в них – клеточный объем при этом медленно восстанавливается до изначальных показателей (данное двухфазное влияние на клеточный объем происходит в результате того, что в общем клетки гораздо более проницаемы для воды, чем для нейтральных растворенных веществ, используемых в качестве криопротектора).

После защиты клеток следующим этапом криоконсервирования является обратная процедура (удаление криопротектора и перенос клеток в нормальную культуральную среду). В этом случае будет наблюдаться обратный зеркальный эффект: вода будет входить быстро с помощью осмоса в клетку, нагруженную криозащитным веществом, вызывая резкое увеличение ее объема, которое затем будет обратимо только постепенно уменьшаться по мере выхода криопротектора из клетки. Эмпирические наблюдения показали, что такие осмотические переходы являются дополнительным повреждающим фактором всего режима криоконсервирования. Изменения клеточного объема выше/ниже $\pm 30\%$ нормального изотонического объема плохо переносятся [4, 67]. Таким образом, главная задача при создании успешной методики – знать о существовании таких изменений. Эту проблему можно минимизировать, если добавлять криопротекторы и отмывать их небольшими последовательными шагами, а не однократным использованием всей концентрации. Размеры таких шагов могут быть определены для данного типа клеток с помощью исследования осмотической проницаемости для воды и растворенных веществ, а также дальнейшего расчета оптимального диапазона изменений [40, 67]. Основное правило, которое может использоваться для большинства типов клеток, состоит в том, чтобы избегать добавления или удаления криозащитных веществ шагами больше, чем 0.5M, с

to this problem are being considered and will be discussed later). Yet another benefit from addition of CPA has been linked with their ability to act as free radical scavengers; for example Me_2SO is a potential radical scavenging agent, and free radical 'signatures' have been detected in plant cell cultures following cryopreservation [17]. (It is likely that such free radical formation is likely to result from deranged metabolism in cells recovering from cryopreservation, rather than from a primary effect of ice formation *per se*, but never-the-less, this added effect of CPA may play a consistent small part in successful recovery in the immediate post-thawing period).

It will be seen that CPA have a diverse range of effects, which can be used in additive fashion when considering application to a specific cell population. However, although many of these documented effects are at least partly understood, there is at present no specific predictive test which can be used to prospectively identify an optimal CPA regime, without entering into preliminary testing on cell recovery before full scale application. It will also be noted that many of the protective effects have been documented during slow dehydrative freezing. The role of CPA in protection during rapid cooling, when intracellular ice may be formed, will be discussed later.

Whatever protective effects are sought by use of chosen CPA, there are generic problems with the use of these agents in the necessary high concentrations. These can be summarised succinctly as: osmotic and chemical toxicity. The addition of the permeating CPA (commonly in concentrations of between 10-15% w/v) imposes an osmotic stress on the cells, which although not as extreme as experienced during the cooling itself, can exceed the tolerable limits for the cell. Studies such as those reported in [41], record the volume changes in cells (in this case, murine oocytes) exposed to CPA. There was a large initial shrinkage and reduction of cell volume as water flowed out under osmotic control, to be replaced more gradually during the period when the glycerol started to permeate into the cells, shown by a slow recovery of cell volume towards initial values (this biphasic effect on cell volume results from the fact that in general cells are much more permeable to water than to neutral solutes such as used for CPA). Having protected the cell during cryopreservation, the opposite procedure (removal of the CPA and return of the cells to normal culture medium) will be the desired goal (this will be discussed later). In this instance, a mirror-image reverse effect will occur; now water will flow by osmosis rapidly into the CPA-loaded cell, causing acute cell swelling, which is only gradually reversed

определенной паузой между шагами (примерно 5 мин при температуре 20°C). Еще один способ уменьшения осмотического повреждения при удалении криозащитных веществ заключается в добавлении осмотически активного буфера на начальных этапах отмывания. Для обычно используемых концентраций криозащитных веществ (т.е. 10% масса/объем) добавление такого непроницающего сахара, как сахароза в концентрациях 0.1-0.3M, может предотвратить чрезмерное набухание клеток [40]. Неоспоримым является тот факт, что необходимо проверять влияние криопротекторов при экспозиции и отмывании на восстановление специфичных функций клеточной линии перед любыми стадиями замораживания. Также не возникает сомнений, что предотвращение значительных осмотических изменений может быть даже более необходимым после процедур охлаждения и отогрева, которые могли повредить такие компоненты клетки, как плазматическая мембрана (см. ниже).

1.4. Повреждение клеток во время медленного охлаждения

Большинство стандартных процедур криоконсервирования в банках клеток основаны на использовании скоростей охлаждения в области 1°C/мин. Получить такие скорости относительно легко на постоянной основе, используя программные замораживатели или пассивное охлаждение в закрытых емкостях в криогенном веществе, например парах жидкого азота, но успех в данном случае скорее обусловлен простотой применения. Для большинства ядерных клеток млекопитающих проницаемость клеточной мембраны для воды и изменение данного параметра во время охлаждения требуют, чтобы во время охлаждения при данных скоростях содержание воды в клетке осталось в равновесии с увеличивающимся осмотическим потенциалом матрицы лед-вода. Вследствие этого клетки обезвоживаются и внутри клетки остается незначительное количество воды, которая может замерзнуть. (Это не выполняется для таких специализированных или крупных клеток, как ооциты млекопитающих, для охлаждения которых необходимы еще меньшие скорости). Так, например, McGann и др. [34] провели измерения транспортных параметров клеточной мембраны для клеток-предшественников костного мозга при охлаждении, и, используя сопряженные уравнения (аналогичные описанным [30]), обнаружили, что со скоростями 1-3°C/мин данный тип равновесного замораживания возможен. Было показано, что скорости, больше 10°C/мин, чаще будут приводить к внутриклеточной кристаллизации, и действительно практика криоконсервирования с использованием таких скоростей замораживания приводит к более низкой выживаемости клеток.

Таким образом, медленное охлаждение до температур, при которых обезвоживание клеток еще может

as the CPA diffuses out of the cell. It has been established by empirical observation that these osmotic transients are an additional damaging factor in the overall cryopreservation regime. Cell volume excursions beyond about plus or minus 30% of normal isotonic volume are poorly tolerated [4,67]. Thus an integral part of designing a successful protocol is to be aware of these changes. The problem can be reduced by adding CPA and by washing it out in small sequential steps rather than by direct immersion in the full final concentration. The limits of the steps can be measured for a given cell type by undertaking osmotic measurements of water and solute permeability, and prospectively calculating the optimal range of changes [40,67]. A "rule of thumb" which can be used for most cell types is to avoid addition or removal of CPA in steps of greater than 0.5M, allowing time (again as a rough guide - 5 min at temperatures of 20°C) between steps. Another way to reduce osmotic damage during CPA removal is to include an osmotic buffer in the initial washing steps. For the commonly-used concentrations of CPA (i.e. 10%w/v), addition of a non-permeating sugar such sucrose at between 0.1 to 0.3M concentrations can avoid excessive cell swelling [40]. It is certainly true that the effects of CPA exposure and removal should be checked against the specific functional recovery of the cell line of interest before any freezing steps are introduced. It is also true that the avoidance of these large osmotic transients may be even more critical after the cooling and rewarming procedures, which will already have subjected cell components such as the limiting plasma membrane to damage (see below).

1.4. Cell damage during slow cooling

Most routine cryopreservation procedures in cell banks have been based on use of cooling rates in the region of 1°C/minute. Such rates are relatively easy to achieve on a consistent basis, using either programmable freezing machines or passive cooling in insulated boxes in a cryogen such as vapour phase above liquid nitrogen, but in fact their success results from more than practical ease alone. For most nucleated mammalian cells, the cell membrane permeability to water and the changes of this parameter during cooling dictate that by cooling at these rates, the cell water content remains effectively in equilibrium with the increasing osmotic potential of the ice-water matrix. Therefore, the cells become dehydrated and there is little remaining intracellular water to participate in ice formation. (This is not true for some specialised or large cells such as mammalian oocytes, which require even slower rates of cooling). For example, [40] made

продолжиться (примерно до -50°C , хотя эта граничная точка еще точно не известна), делает возможным успешное криоконсервирование, когда эти образцы затем переносят в жидкий азот. Лучше всего, если многие режимы медленного охлаждения предусматривают охлаждение со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до “безопасной” промежуточной температуры (-70°C), после чего ампулы могут быть непосредственно охлаждены с переходом через конечную температуру стеклования (около -100°C) до температуры хранения (паровая или жидкая фаза азота). Следовательно, даже если выживаемость клеток достигается тщательным выбором криозащитных веществ и условий охлаждения, клетки испытают воздействие замораживания с обезвоживанием. Обратимость или необратимость данных явлений, а также “тяжесть” повреждения будут обуславливать выживаемость или же смерть каждой отдельной клетки.

В ранних исследованиях повреждений, вызванных медленным замораживанием, рассматривалась вероятность, что высокая концентрация внеклеточных солей вызвала бы “солевую нагрузку” клеток при низких температурах, что может приводить к осмотическому дисбалансу, чрезмерному набуханию и лизису после оттаивания [23]. Защита, обеспечиваемая криопротекторами, например глицерином, возможна благодаря коллигативному эффекту, снижающему концентрацию соли и предотвращающему повреждение. Впоследствии это было объяснено тем, что в условиях медленного равновесного охлаждения разница между внутри- и внеклеточной концентрацией растворенных веществ будет незначительной, таким образом, солевая нагрузка мало вероятна [44]. Maryman предположил, что повреждение может быть результатом обезвоживания до осмотических потенциалов, вызывающих максимальное сжатие, которое будет ниже минимального объема клетки, однако это также не было подтверждено последующим биофизическим моделированием. Иное влияние замораживания с обезвоживанием связано с большим объемом внешнего льда, образующегося при медленном охлаждении. Он вытесняет клетки в узкие каналы между крупными кристаллами льда, что вызывает плотную упаковку клеток и тесный контакт со льдом; данный эффект был назван реологическим повреждением [32].

Криозащитные вещества при этом увеличивают размеры межкристаллических каналов, снижая количество льда при медленном охлаждении. Без сомнения, существует некоторый эффект “упаковки клеток” при медленном охлаждении (который практически объясняет выбор оптимизированных концентраций клеток во время стандартного процесса криоконсервирования). В работах по эритроцитам [38,43] и таким ядерным клеткам, как гепатоциты [12], было показано, что увеличение объема упакованных клеток криоконсервируемых суспензий ухудшает результаты

measurements of cell membrane transport parameters on cooling for bone marrow progenitor cells, and using coupled equations (similar to those described by [30]), found that rates of between $1-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ permitted this type of equilibrium freezing during cooling. Rates faster than $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ were predicted to have a high incidence of intracellular freezing, and indeed at a practical level, cryopreservation with these faster cooling rates was associated with poor cell survival. Thus slow cooling over the temperature range where cell dehydration can proceed (down to about -50°C , although this end temperature is not exactly known) allows successful cryopreservation when these samples are eventually transferred to liquid nitrogen. Effectively, many slow cooling regimens are planned by cooling at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to a “safe” intermediate temperature (-70°C), from which the ampoules can be directly transferred through the final glass transition temperature (at around -100°C) to the storage temperature (in either the vapour or liquid phase of nitrogen). Thus, even if cell survival is achieved by careful selection of CPA and cooling conditions, the cells will experience the effects of dehydrative freezing. It will be the reversibility or irreversibility of these events, the “damage load”, which will dictate survival or death on an individual cell basis.

The early studies on injury from slow freezing focused on the possibility that the high external salt concentration would drive a low temperature “salt loading” of the cells, which would result in osmotic imbalance, excessive swelling and lysis on thawing [23]. The protection offered by CPA such as glycerol was afforded by the colligative effect reducing the salt concentration and thus avoiding the damage. It has subsequently been argued that under the conditions of slow equilibrium cooling, there would be little difference between internal and external solute concentrations, so salt loading would be unlikely [44]. Maryman suggested that damage could result from dehydration to osmotic potentials which would effectively cause maximal shrinkage beyond a minimum cell volume, but again this has not been supported by subsequent biophysical modelling. Another postulated effect of dehydrative freezing has been linked to the large volume of external ice formed during slow cooling, which has been shown to leave the cells trapped in narrow channels between large ice crystals, causing dense packing of cells and close approximation to the ice; this has been called rheological damage [32]. Again, by reducing the amount of ice during slow cooling, CPA reduce the narrowing of inter-ice channels. There is certainly some effect of “cell packing” during slow cooling (which translates at a practical level to selection of optimised cell concentrations

процедуры.

В других исследованиях повреждений при медленном охлаждении внимание было сконцентрировано на плазматической мембране как основном участке повреждения (такого рода повреждения часто могут определяться в клетках сразу после отогрева с помощью микроскопии и методик окрашивания, основанных на проникновении красителей через поврежденные мембраны). В работе по изолированным протопластам растений Steponkus и коллеги показали, что замораживание с обезвоживанием может приводить к появлению блебов и вздутий на плазматической мембране, при этом клетки становятся чрезмерно сморщенными. При сильном обезвоживании изменения в молекулярной архитектуре липидного бислоя могут стать результатом потери ламеллярной структуры мембраны, что приводит к появлению небислойных “трубок” или мицелл, нарушающих необходимую избирательную проницаемость мембраны [53,63,65]. Также было показано, что при сжатии клеток в стеки “искривленных бислоев” под воздействием замораживания с экстремальным обезвоживанием могут наблюдаться явления слияния между наружным и внутренним бислоями и между бислоями прилегающих клеток, приводящие к необратимым повреждениям после оттаивания [2,9,61]. Тот факт, что некоторые из этих эффектов могут негативно воздействовать на образцы клеток во время медленного замораживания, более чем вероятно, и это говорит о том, что необходимо уделять внимание всем стадиям режима криоконсервирования (включая стадии разведения после оттаивания, переноса и центрифугирования) для максимального восстановления этих частично подверженных стрессу клеток (условия нагревания также важны и далее будут описаны отдельно). обстоятельное обсуждение явлений повреждения при медленном охлаждении во время криоконсервирования было недавно представлено [31,36].

1.5. Повреждение клеток при быстром охлаждении

Из вышеописанного очевидно, что для выживания клеток при обычном криоконсервировании будут естественными оптимальный выбор криозащитных веществ и медленное охлаждение. В данном случае необходимо лишь кратко рассмотреть быстрое охлаждение, чтобы разъяснить известные механизмы повреждения. Быстрое охлаждение применяется в технологии витрификации (см. ниже), но многие другие процедуры протокола различаются, и не должны вызывать удивление изменения, как результат охлаждения клеток с использованием традиционных криопротекторов (при обычных концентрациях около 10% масса/объем), например при погружении ампул с клетками непосредственно в жидкий азот. Как упоминалось ранее, основной проблемой быстрого

during routine cryopreservation), since it has been shown in studies on red blood corpuscles [38,43] and nucleated cells such as hepatocytes [12] that increasing the packed cell volume of the suspension to be cryopreserved reduces the success of the procedure.

Other studies on slow cooling injury have focused on the plasma membrane as a major site of injury (given that freezing damage can often be detected on thawed cells very soon after warming by microscopy or staining techniques which pick up loss of membrane permeability). In work on isolated plant protoplasts, Steponkus and colleagues have shown that dehydrative freezing can result in “blebbing” and “budding off” of the plasma membrane when the cells become excessively shrunken. In more extreme dehydration, changes in the molecular architecture of the celsius lipids bilayer can result from loss of the lamellar structure of the membrane, resulting in appearance of non-bilayer “tubes” or micelles, which destroy the essential selective permeability of the membrane [65,63,53]. It has also been shown that when cells are compressed by extreme dehydrative freezing into stacks of “contorted bilayers”, there can be fusion events between outer and inner bilayers and between bilayers of adjacent cells, resulting in irreparable damage on thawing [2,9,61]. It is more than likely that several of these effects will impinge on cells samples during slow freezing, so it can be seen that care must be given to all stages of the cryopreservation regime (including post-thaw dilution steps, handling and centrifugation) to maximise recovery of these partially-stressed cells. (The conditions of warming are also important and will be discussed separately below). A comprehensive discussion of the events in slow cooling injury during cryopreservation has recently been provided by [31,36].

1.5. Cell damage during rapid cooling

From the preceding text, it will have become obvious that for cell survival during routine cryopreservation, judicious selection of CPA and slow cooling will be the norm. In that case, it is only necessary to briefly discuss rapid cooling to give an insight into what is known the damage mechanisms. Rapid cooling is employed in the technique of vitrification, (see below), but in that situation, many of the other procedures of the protocol are different, and should not be confused with the changes induced by cooling cells exposed to traditional CPA (at the usual concentrations of about 10% w/v) by, for example, plunging ampoule of cells directly into liquid nitrogen. As alluded to above, the major problem with rapid cooling and departure from the equilibrium conditions of cell osmotic response to

охлаждения является переход осмотического ответа клеток в условиях равновесного состояния к условиям внеклеточных высоких концентраций растворенного вещества в матрице льда и наличие остаточной незамороженной воды в клетке, которая будет находиться в переохлажденном состоянии. Вероятность образования внутриклеточного льда увеличивается со степенью переохлаждения, поэтому невозможно миновать “опасную зону” зародышеобразования между -20 и -50°C без формирования льда внутри клеток. Присутствие льда в клетках в условиях быстрого охлаждения показано с помощью электронной микроскопии замороженных фракций [16] и криомикроскопии [48,60], в которых внутриклеточное “черное мерцание” относят к преломлению света кристаллами льда. Поскольку очевидно, что клеточные мембраны затрудняют прохождение кристаллов льда из наружной ледяной матрицы, обсуждение данной проблемы сконцентрировано на том, как кристаллы льда могут “прорасти” внутри клетки. В 60-х годах Mazur предложил теорию о том, что кристаллы льда могут зародиться через существующие поры в плазматической мембране [29]. В течение многих лет этот факт не принимали во внимание, основываясь на расчетах необходимых размеров пор и кривизны растущих кристаллов льда, но недавнее открытие белковых “водных пор” или аквапоринов [62] в некоторых клетках млекопитающих дали новую жизнь этой концепции. Другая теория сконцентрирована на ультраструктурных и молекулярных изменениях в сильно обезвоженных мембранах (см. выше), которые рассматривались как потенциальные “участки зародышеобразования”. Она называется теорией зародышеобразования, катализируемого мембраной [20]. Muldrew и McGann [37] представили данные о том, что при высоких скоростях охлаждения (и быстром росте внеклеточной матрицы льда) поток воды из клетки под действием осмотических сил настолько значительный, что его движение может индуцировать силу трения, способную привести к разрыву мембраны (предоставив кристаллам льда возможность роста). Практически все эти теории связаны со смертью клеток в изученных условиях. Таким образом, рекомендуется избегать указанных условий при процедуре криоконсервирования. По-видимому, клетки могут выдерживать небольшую фракцию внутриклеточного льда не погибая [49], но эта фракция так мала, что не может быть точно вычислена во всей клеточной популяции, поэтому эффективное восстановление клеток, вероятно, будет значительно варьировать.

Оригинальный и очень эффективный метод сверхбыстрого замораживания гамет и эмбрионов с помощью специальной аппаратуры разработали Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А., при этом использовался полифункциональный криоконсервант, который содержит холин, низкие концентрации

external high solute in the ice matrix, is the residual unfrozen cell water, which will be in the supercooled state. The likelihood of intracellular ice formation increase with the degree of supercooling, so it is not possible to pass through the nucleation ‘danger zone’ between about -20 and -50°C without ice forming inside the cells. The presence of ice in cells under conditions of rapid cooling has been demonstrated by freeze-fracture electron microscopy [16] and by cryomicroscopy [48,60] where intracellular “black flashing” has been linked to refraction of light by ice crystals. Since the weight of evidence suggests that cell membranes inhibit the passage of ice crystals from the external ice matrix, the debate in this area has centred on how ice can nucleate inside the cell. In the 1960’s, Mazur proposed that ice could nucleate through existing pores in the plasma membrane [29]. For many years this was discounted based on calculations of the necessary sizes of pores and the surface of curvature of growing ice crystals, but the more recent discovery of protein “water pores” or aquaporins [62] in some mammalian cells has revitalised this concept. Another theory has focussed on the ultrastructural and molecular changes in severely dehydrated membranes (see above) which have been proposed to expose “nucleation sites”. This has been called the membrane-catalysed nucleation theory [20]. Yet another group [37] have presented evidence that at high cooling rates (and rapid growth of the extracellular ice matrix) the osmotically-driven flux of water out of the cell is so rapid that it’s movement can impose frictional forces capable of rupturing the membrane (allowing ice crystals then to grow in). At a practical level, all these theories have been linked with cell death under the studied conditions, so avoidance of these in routine cryopreservation is strongly recommended. There is some evidence that cells may tolerate a very small fraction of intracellular ice without death [49], but it is such a small amount that it cannot be accurately predicted across a cell population, so effective cell recoveries would be likely to vary considerably.

An original and very efficient method of ultrarapid freezing of gametes and embryos using special equipment was elaborated by [1].

1.6. Vitrification

A large part of the previous discussion has centred on the achievement of a “glassy” state at low temperatures for long-term maintenance of viability. It has been for a long time known from a theoretical basis that it should be possible to vitrify aqueous solutions [25], but that extremely high rates (tens of thousands of degrees Celsius of cooling per minute), which would be impractical for routine cell

криопротектора [1].

1.6. Витрификация

Предыдущее обсуждение было, в основном, посвящено тому, как достигается состояние витрификации при низких температурах с целью длительного поддержания жизнеспособности. Теоретически давно известно, что водные растворы можно витрифицировать [25], но для этого необходимы крайне высокие скорости охлаждения (в десятки тысяч градусов по Цельсию в минуту), которые невозможно было получить при стандартных методиках хранения клеток в низкотемпературных банках. Данная концепция была вновь представлена Fahy, MacFarlane, Rall [15,47], исследовавших использование высоких концентраций криозащитных веществ для получения стеклования при скоростях охлаждения, которые могли бы использоваться в ежедневной практике. Было показано, что для многих криозащитных веществ, таких как ДМСО, глицерин и другие полиолы с концентрациями в диапазоне 40-60% масса/объем делают возможной низкотемпературную витрификацию, но все же требуют скоростей охлаждения в несколько сотен градусов Цельсия в минуту. Эти высококонцентрированные смеси растворенных веществ увеличивают вязкость (благоприятствуя стеклованию) и обладают сильным коллигативным эффектом (снижая статистическую вероятность образования зародышей льда во время быстрого охлаждения). Такая методика успешно применяется для криоконсервирования небольшого количества таких ценных клеток, как эмбрионы человека или животных в репродуктивной медицине [5], в которых небольшие объемы среды могут охлаждаться, например, в пластиковых соломинках [8]. Как нам известно, эта методика еще не применяется для хранения клеточных линий в низкотемпературных банках клеток или биотехнологии. Один из основных вопросов применения данного метода – это токсичность криопротекторов для определенных типов клеток при высоких начальных концентрациях (около 40% масса/объем), которые, несомненно, влияют осмотически и химически на клетки.

1.7. Важность скоростей отогрева

Важность контроля скоростей отогрева основывается на необходимости прохождения образца криоконсервированных клеток в обратном порядке через такие биофизические явления, как девитрификация стекловидной матрицы (в диапазоне -100 до -80°C), начало движения молекулы воды в пределах матрицы лед-растворенное вещество (выше -60°C) и момент времени в процессе оттаивания, когда рекристаллизация льда становится значительной (особенно внутри клеток) в диапазоне -40°C. Эти диапазоны температур приближительны, но физические явления, которые в них происходят, нельзя предотвратить. Они вытекают из фазовой диаграммы смеси лед-растворенное вещество-

banking. The concept was re-vitalised by [15,47] who made extensive studies on the use of high concentrations of CPA to permit the vitreous transformation at cooling rates which could be used in every-day application. It has been shown that for many CPA such as Me₂SO, glycerol and other polyols, concentrations in the region of 40-60%w/v will allow low temperature vitrification, but still require cooling rates of several hundred degrees Celsius/minute). These high solute mixes increase viscosity (favouring glass formation) and have a strong colligative action (reducing the statistical likelihood of ice nucleation during rapid cooling. This has been successfully applied to the cryopreservation of small numbers of valuable cells such as animal or human embryos in reproductive medicine [5], where very small volumes of medium can be cooled for example in thin plastic straws [8]. The technique has not yet been applied to our knowledge for storage of cell lines in banking or biotechnology. One major issue is the toxicity of the CPA to particular cell types at these high initial starting concentrations (around 40% w/v), which undoubtedly have osmotic and chemical effects on cells.

1.7. The importance of warming rates

The importance of control of warming rates stems from the necessity to bring the sample of cryopreserved cells back through the biophysical events as the glassy matrix “devitrifies” (around -100 to -80°C), water molecules begin to mobilise within the ice-solute matrix (above -60°C), and ice recrystallisation becomes significant (particularly inside the cells) on the time scale of the thawing process (above -40°C). These temperature ranges are only approximate, but are unavoidable physical events dictated by the phase diagram of the particular ice/solute/CPA mixture in a given cell sample. For samples which have been cooled “rapidly” (i.e. under non-equilibrium conditions), and where there is a high probability that ice nucleation centres have formed inside the cell (even though these may be down at the level of molecular clusters too small to detect by microscopy), then there is a high statistical likelihood that ice crystals will grow during recovery from very low temperatures. Put another way, it can be described as “ice formation during warming” [49]. The obvious approach is to attempt to bring the cell sample up through the “danger zone” for ice crystal growth as fast as possible, and it has been known for some time that rapid thawing rates have implications for improved cell survival after rapid cooling [57]. There is strong supporting evidence for the harmful effects of ice crystal growth during warming in cells (such as murine embryos) which are large enough to permit this

криопротектор в данном образце клетки. Для быстро охлажденных образцов (т.е. в неравновесных условиях) существует большая вероятность, что центры зародышеобразования льда сформируются внутри клетки (если они расположены на уровне молекулярных кластеров, их размеры будут слишком малы, чтобы их можно было определить с помощью микроскопии) и это может привести к тому, что кристаллы льда будут расти во время отогрева после воздействия низких температур. По-другому это может быть описано как “образование льда во время отогрева” [49]. Чтобы предотвратить образование льда, необходимо перенести образец клеток через “опасную зону” роста кристаллов льда как можно быстрее. Известно, что большие скорости отогрева приводят к увеличению выживаемости клеток после быстрого охлаждения [57]. Вредное воздействие роста кристаллов льда при отогреве в клетках (таких как мышинные эмбрионы), очевидно, так как эти кристаллы достаточно велики, чтобы их можно было увидеть с помощью криомикроскопии [50]. Тем не менее, такие факторы, как геометрия и объем образца клетки, теплопроводные свойства используемых в криоконсервировании ампул и трубок, ограничивают абсолютную скорость повторного отогрева. Самый простой метод отогрева - поместить образцы клеток на водяную баню при 37°C с помешиванием, чтобы предотвратить появление локальных температурных градиентов в воде, но для образцов объемом 1 мл такой способ не позволяет получить скорости отогрева до нескольких сотен градусов в минуту. Для некоторых смесей растворенных веществ было рассчитано, что для предотвращения как образования, так и значительного роста кристаллов льда в температурной зоне около -60°C образцы должны отогреваться при скоростях выше 1200°C/мин [42]. Таким образом, ясно, что скорости отогрева, которых можно достичь при стандартной процедуре низкотемпературного консервирования клеток, находятся как раз на краю потенциальной неудачи, в связи с чем необходимо внимательно осуществлять все стадии низкотемпературного протокола.

Необходимость быстрого отогрева является более острой в случае, если при хранении образцов использовали процедуры витрификации. Мы обсуждали факт (см. выше), что практические методы витрификации клеток реально сводятся (из-за токсичности смесей криопротекторов) к так называемой “квазивитрификации”; образованию низкотемпературного стекловидного вещества, в пределах которого присутствует потенциально большое количество центров образования зародышей льда (из которых был предотвращен рост значительных кристаллов при охлаждении, но при отогреве такая вероятность очень велика). В данной ситуации оттаивание должно быть даже более быстрым, и это одна из причин, почему объемы образцов сводятся к минимуму, к нескольким микролитрам, тогда как часто

visualisation by cryomicroscopy [50]. However, factors such as the geometry and volume of the cell sample, and the heat transfer properties of the ampoule or tube used for cryopreservation, combine to restrict the absolute rate of achievable rewarming. The most common method of warming is to plunge the cell samples into a water bath at 37°C, with shaking to avoid local thermal gradients in the water, but for samples of 1 ml volumes, this restricts the maximum warming rates to a few hundred degrees Celsius per minute. It has been calculated for some mixtures of solutes that to safely avoid the probability of both ice nuclei forming, and significant ice crystal growth, in the temperature zone above -60°C, samples should be warmed at rates in excess of 1200°C/min [42]. Thus it will be obvious that the warming rates which can be achieved in routine cell banking are right on “the edge” of potential disaster, reinforcing the view that care and vigilance must be taken in all steps of the protocol.

The need for rapid warming is even more acute where samples have been stored using vitrification protocols. We have discussed the fact (see above) that practical cell vitrification methods are limited (due to toxicity of the CPA mixtures) to what is effectively “quasi-vitrification”; establishment of a low temperature glass within which are a potentially high number of ice nucleation centres (prevented from growing into significant ice crystals during cooling, but primed to catalyse ice formation on warming). In this situation, thawing must be even more rapid, and this is one reason why sample volumes are kept to a minimum of a few μl , whilst often the samples have been cooled, not in traditional cryo-tubes, but on receptacles such as electron microscope grids [27] which have a very high heat transfer capacity in comparison with glass or plastic ampoules. There have also been attempts to use agents such as “antifreeze” or “thermal hysteresis proteins” (proteins which occur in freeze-tolerant species of insects or plants [68] and which have an ability to block the addition of water molecules to the surface of growing ice crystals on a kinetic basis) as additives to vitrification media with some improvement of recovery [39], but the problems have so far not been fully resolved.

The optimal selection of warming rates for “slowly” cooled cells are more complex to predict. The reasons for this are not fully understood, but may in part relate to biophysical characteristics of a given cell type, including the membrane water permeability (and the rate of increase for this at subzero temperatures during warming) and the cell surface to volume ratio. For most cells (including those commonly encountered in routine cell banking) preserved by slow dehydrative “equilibrium” cooling,

образцы охлаждаются не в обычных криопробирках, а в таких емкостях, как решетки электронного микроскопа [27], которые имеют очень высокую теплопроводность по сравнению со стеклянными или пластиковыми ампулами. Также были попытки использовать такие вещества, как “антифризы” или “белки температурного гистерезиса” (белки видов насекомых или растений, толерантных к замораживанию [68], которые способны блокировать поступление молекул воды к поверхности растущих кристаллов льда на кинетической основе) в качестве добавок к витрификационным средам. При этом наблюдается некоторое увеличение показателя выживаемости [39], однако эта проблема еще полностью не решена.

Гораздо сложнее оптимально подобрать скорости отогрева для “медленно” охлаждаемых клеток. Причины этого до конца не раскрыты, но могут частично зависеть от биофизических характеристик данного типа клеток, включая проницаемость мембран для воды (и степень ее увеличения при субнулевых температурах во время отогревания) и поверхностно-объемное отношение клеток. Для основной массы клеток (включая те, которые обычно используют в стандартных процедурах низкотемпературного консервирования клеток), консервированных с использованием медленного “равновесного” охлаждения с обезвоживанием, выживаемость клеток увеличивается при быстром отогреве [28,33]. Это увеличение может быть связано с такими факторами, как сокращение времени, в течение которого могут расти кристаллы льда (см. выше), или дополнительный дегидратационный период (например, реорганизация мембраны или слияния (см. выше) при медленном отогреве, но явная очевидность любой из этих теорий в настоящее время отсутствует. Для некоторых типов клеток (как, например, эмбрионы и ооциты млекопитающих) показана эффективность среднемедленных скоростей отогрева (около 8°C/мин) [64]. Причина этого состоит в скорости движения воды или растворенных веществ через плазматическую мембрану, когда клетка чрезмерно сжимается при охлаждении, что вызывает высокий результирующий осмотический потенциал для оставшегося внутриклеточного содержимого. Быстрый отогрев (с высвобождением свободных молекул воды в уменьшающуюся матрицу льда вокруг клеток) мог бы усиливать резкий поток воды в клетку, вызывая повреждение самой мембраны (см. выше теорию “повреждений при быстром охлаждении путем разрыва мембран”), или лизис из-за “сверхгидратации”, особенно если есть эффект нагрузки растворенными веществами при медленном охлаждении (см. выше). Более медленный отогрев может вызывать регидратацию со скоростями, препятствующими этим повреждающим воздействиям. По данным на сегодняшний день, однако, такое благотворное воздействие медленного отогрева оказывается характерным только для ограниченного

cell recoveries are improved by rapid warming [28,33]. This improvement has been linked to factors such as avoidance of time for excessive intracellular ice growth (see above) or an additional period of dehydration damage (such as membrane re-organisation or fusion – see above) during slow warming, but unequivocal evidence for either theory is at present lacking. For some selected cell types (such as mammalian embryos or oocytes), there is evidence that an intermediate slow warming rate (in the region of 8°C/min) is beneficial [64]. The reason for this may lie in the rate of movement of water or solutes across the plasma membrane in the situation where the cell has been excessively shrunken during cooling, with a resultant high osmotic potential for the remaining intracellular contents. Rapid warming (liberating free water molecules into the diminishing ice matrix around the cells) could encourage a dramatic influx of water into the cell, causing membrane damage itself (see the “membrane rupture” theory of rapid cooling damage, above), or lysis by “overhydration”, particularly if there has been a solute loading effect during the slow cooling (see above). Warming more slowly may permit rehydration to proceed at rates which avoid these damaging effects. However, this slow warming benefit does appear to be a characteristic phenomenon only for a limited number of large cells, as far as we are currently aware.

1.8. Novel approaches to cell preservation

The requirement to store cells at ultra-low temperatures below the glass transition of the solute mixture has some drawbacks including cost and availability of cryogenics, the need for continued surveillance to ensure adequate cryogen in the cell bank containers (this usually necessitates temperature alarm devices and routine “topping up” with liquid nitrogen on a weekly basis in most cases). It also means that valuable samples for despatch have to be kept at the same low temperatures (for example in a cryogen-cooled “dry shipper”). If nucleated cells could be either lyophilised or “dried at ambient temperatures” many of these problems would be avoided. Having said this, the problems in these approaches remain formidable. However, based on the molecular studies of Crowe and his colleagues [11,10] into the mechanisms of the protective effects of disaccharides, especially (but not exclusively) trehalose, in organisms such as the brine shrimp (*Artemia sp.*) which can exist in a dry state at ambient temperatures for many years, there has been a recent revival into research in this area. What has become apparent from the natural systems is that trehalose is required on both sides of the plasma membrane of cells to exert its full protection,

количества крупных клеток.

1.8. Новые подходы к консервированию клеток

Требование хранить клетки при сверхнизких температурах, ниже температуры стеклования смеси растворенных веществ, имеет некоторые недостатки, включая затраты на криогенные вещества, необходимость продолжительного наблюдения за адекватностью криогенного вещества в контейнерах банка клеток (обычно для этого необходимы температурные контрольные датчики и рутинная процедура дозаправки жидким азотом, в большинстве случаев каждую неделю). Это также означает, что ценные образцы для отправки должны поддерживаться при тех же низких температурах (например, в криогенно охлаждаемом сосуде для сухой транспортировки). Если бы ядерные клетки могли быть лиофилизированы или высушены при температуре окружающей среды, можно было бы избежать многих из этих проблем. Следует сказать, что проблемы при данных подходах остаются трудно-преодолимыми. Тем не менее, основываясь на проведенных Crowe и коллегами [10,11] молекулярных исследованиях механизмов защитного действия дисахаридов, особенно (но не только) трегалозы, в таких организмах, как креветка морская (*Artemia sp.*), которые могут существовать в сухом состоянии при температуре окружающей среды на протяжении многих лет, данная область исследования с недавних пор вновь начала развиваться. Как стало очевидным, в естественных системах трегалоза должна присутствовать с обеих сторон плазматической мембраны клеток для того, чтобы проявить все свои защитные свойства, следовательно, один из главных вопросов создания банка клеток, как ввести сахар в клетки (такого типа дисахариды обычно не проходят через плазматическую мембрану в достаточных концентрациях). Одним из подходов стала попытка создания “управляемой поры” путем введения α -гемолизина (из *Staphylococcus aureus*), которая будет открываться при изменении ионного состава среды, что позволит трегалозе входить посредством диффузии [51]. Управляемые “проницаемые отверстия”, полученные с помощью термального порообразования [66] или “электропорации” [13] предложены как альтернативные методы для загрузки внеклеточных протекторов, в то время как применение микроинъекций изучалось в ситуациях [14], когда нужно сохранить небольшое количество клеток (таких как отдельные ооциты). Недавно сообщалось об успешном применении данных подходов для лиофилизации тромбоцитов крови млекопитающих с сохранением некоторых физиологических функций [66], тогда как “высушивание при температурах окружающей среды” в условиях потока сухого воздуха позволило сохранить обычные клетки млекопитающих жизнеспособными, по крайней мере, в течение нескольких дней

so one major issue has been how to introduce the sugar into the cells of interest for banking (this type of disaccharide would not normally cross the plasma membrane in sufficient concentrations). One approach has been to try and engineer a “switchable pore” by introducing α -hemolysin (from *Staphylococcus aureus*), which can be controlled to “open” by changing the ion composition of the medium, allowing trehalose to enter by diffusion [51]. Controlled “permeability breaches” using “thermal poration” [66] or electro-poration [13] have been suggested as other methods for loading extracellular protectants, whilst micro-injection has been studied [14] in situations where a small number of cells (such as individual oocytes) might be stored. Having used these approaches, freeze drying of mammalian blood platelets has been recently reported with successful preservation of some physiological functions [66], whilst assisted “ambient drying” by exposure to conditions such as exposure to a gas flow of desiccated air has also been reported to permit survival of normal mammalian cells, at least for a period of a few days [46]. Again, the hope using such approaches is to achieve a “glassy state” to “freeze in time” the metabolism and ultrastructure of the cells. However this technology remains firmly to the future for routine cell banking. A great deal of further research is required into how sugars such as trehalose interact with nucleated cells in the desiccated state, whether glass transition of the cell constituents can truly be achieved, and the stability of such glasses at elevated temperatures to physical and chemical (especially oxidative) degradation.

1.9. Safety Issues in Cell Banking

The ready availability of cryogenics such as liquid nitrogen has greatly increased the application of cryo-banking for cell resources. However, the use of these agents introduce considerations of safety and cross-infection, which need to be foremost in the minds of those involved in cryopreservation activities. The obvious dangers when handling cryopreserved specimens relate to skin ‘burns’ resulting from touching extremely cold materials, or potential explosions of vials or containers caused by rapid expansion of the liquid nitrogen into the gas phase on warming. These problems can be readily overcome as long as correct use of safety gloves and eye protection are routinely employed. Where large volumes of liquid nitrogen are used in multiple containers, consideration must be given to potential oxygen deprivation in the local atmosphere if the liquid cryogen spills and vaporizes. Good ventilation and use of oxygen detectors in the storage room should minimise any risk to staff. Another issue, perhaps not so obvious, is the need

[46]. Опять же при использовании этих методик мы надеемся достигнуть “стекловидного состояния”, чтобы “заморозить во времени” метаболизм и ультраструктуру клеток. Тем не менее, данная технология остается пока в будущем для повседневного использования в процедурах консервирования в низкотемпературных клеточных банках. В будущем потребуется приложить много сил, чтобы выяснить, как такие сахара, как трегалоза, взаимодействуют с ядерными клетками в высушенном состоянии, будут ли достигнуты стеклование элементов клетки и устойчивость такого состояния при повышающихся температурах к физической и химической (особенно окислительной) деградации.

1.9. Вопросы безопасности при консервировании клеток в низкотемпературных банках

Доступность таких хладагентов, как жидкий азот, привела к значительному росту применения низких температур хранения клеточных ресурсов. Однако при использовании таких веществ необходимо принимать во внимание вопросы безопасности и кросс-инфекции, которые в первую очередь должны рассматриваться всеми, кто связан с криоконсервированием. К очевидным опасностям при обращении с криоконсервированными образцами относятся и “ожоги” кожи в результате контакта со сверххолодными материалами или возможные взрывы пробирок или контейнеров, вызванные быстрым переходом жидкого азота в газовую фазу при нагревании. Такие проблемы легко преодолимы при условии применения защитных перчаток и очков. При использовании объемов жидкого азота в большом количестве контейнеров необходимо обращать внимание на потенциальное уменьшение содержания кислорода в случае утечки жидкого криоагента и его испарения. Хорошая вентиляция и использование датчиков содержания кислорода в хранилище должны снизить любой риск для сотрудников. Еще одна проблема, возможно, не такая очевидная, состоит в необходимости удостовериться, что образцы, хранящиеся при низких температурах, не могут быть инфицированы, например, вирусами, случайно попавшими в сосуд из других зараженных образцов. Сообщалось о переносе вирусов от одного образца костного мозга к другому при хранении в одном резервуаре с жидким азотом [58], что могло возникнуть из-за повреждения загрузочного отверстия в упаковке для хранения. В большинстве случаев вирусы могут выживать после замораживания в жидком азоте. Также существуют мнения, что некоторые виды пластиковых контейнеров, как, например, соломинки для замораживания, используемые в репродуктивной медицине, могут быть чувствительны к небольшим утечкам потенциально зараженных образцов во время замораживания [22], что может быть вызвано некоторыми этапами в процедуре обработки, в

to ensure that samples, stored at low temperatures, cannot be infected with agents, especially viral agents, inadvertently released into the storage tanks from other infected samples. There has been a report of a viral transmission between samples of bone marrow stored in the same liquid nitrogen storage tank [58], which may have arisen from failure of the filling ports on the storage bags. Viruses in general may survive immersion in liquid nitrogen. There are also concerns that some types of plastic containers, such as freezing straws used in reproductive medicine, may be susceptible to small leakages of potentially-infectious samples during freezing [22], due to some steps in the handling procedures, particularly the sealing procedure of the straws. Thus, as a general warning, staff handling cryopreserved samples should treat them with the same precautions as fresh samples, and remain vigilant about procedures for filling and rewarming the samples. It has also been suggested that storage in the vapour phase (rather than in liquid nitrogen-filled tanks) may reduce chances of cross infection. However, such use of vapour phase storage requires very good temperature recording and increased frequency of monitoring to ensure that there are not risks of inadvertent warming and destruction of the cell bank.

1.10. Summary

Cryobiology has progressed to an amazing degree in the past 50 years. Subjects such as physiology and anatomy were grounded in detailed investigations reported over hundreds of years since the Renaissance, but in cryobiology it is only 60 years since the pioneering reports from Luyet, Polge and like-minded colleagues. The establishment of the ability to recover viable cells from deep subzero temperatures has made a huge impact on the everyday management of living resources in biology and medicine, sometimes to such an extent that the technology is taken for granted. However, as we move towards an era where cell cryopreservation will be called upon more and more to confront new problems, such as conservation of endangered species or manipulation of stem cells for research and therapy, it will be essential to fully understand the complete spectrum of changes encountered by living systems which are maintained “frozen in time”. There still remain a host of molecular and biophysical questions to be answered about how cells respond to cryopreservation processes, and this must be the focus of research for the second 50 years in the history of cryobiology.

частности, запечатывания соломинок.

Таким образом, следует заметить, что персонал, работающий с криоконсервированными образцами, должен обращаться с материалом, следуя всем тем правилам, которые существуют для работы со свежими образцами, и соблюдать осторожность при процедурах наполнения и отогрева образцов. Также предполагается, что хранение в парах азота (в большей мере, чем в резервуарах, наполненных жидким азотом) может снизить вероятность кросс-инфекции. Тем не менее, такое использование паров азота при хранении требует наличия должного контроля за температурой и частого контроля и наблюдений, чтобы убедиться в отсутствии риска случайного отогрева и разрушения банка клеток.

1.10. Резюме

За последние 50 лет криобиология достигла удивительных успехов. Такие предметы, как физиология и анатомия, основывались на детальных исследованиях, сообщения о которых можно найти на протяжении сотен лет, начиная с эпохи Возрождения, а в истории криобиологии прошло всего лишь 60 лет с момента появления самых первых сообщений Люйе, Польжа и других придерживающихся того же взгляда ученых. Осознание возможности восстанавливать жизнеспособные клетки после применения низких субнулевых температур внесло огромный вклад в процедуру рутинной обработки живых ресурсов в биологии и медицине, иногда настолько значительный, что данные технологии были приняты безоговорочно.

Тем не менее, так как мы входим в новую эру, в которой криоконсервирование клеток будет призвано к решению таких проблем, как сохранение редких вымирающих видов или использование стволовых клеток в исследованиях и лечении, необходимо осознать в полной мере весь спектр изменений, с которыми сталкиваются живые системы, поддерживающиеся в состоянии “замороженных во времени”. Все еще остается множество требующих разъяснения молекулярных и биофизических вопросов, как клетки реагируют на процессы криоконсервирования, и именно на этом следует сфокусировать свои исследования в следующие 50 лет в области криобиологии.

Литература

1. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 3.– С.3-13.
2. Anchooguy T., Rudolph A., Carpenter J., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // *Cryobiology*.– 1987.– Vol. 24.– P. 324-331.
3. Arakawa T., Timasheff S.N. The stabilisation of proteins by osmolytes // *Biophys. J.*– 1985.– Vol. 47.– P. 411-414.
4. Armitage J., Mazur P. Osmotic tolerance of human granulocytes // *Amer. J. Physiol.*– 1984.– Vol. 247.– P. 373-381.

References

1. Grischenko V.I., Kalugin Yu.V., Luchko N.A. Ultrarapid cooling and vitrification solutions in cryobiology // *Problems of Cryobiology*.– 1993.– N3.– P. 3-13.
2. Anchooguy T., Rudolph A., Carpenter J., Crowe J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing // *Cryobiology*.– 1987.– Vol. 24.– P. 324-331.
3. Arakawa T., Timasheff S.N. The stabilisation of proteins by osmolytes // *Biophys. J.*– 1985.– Vol. 47.– P. 411-414.
4. Armitage J., Mazur P. Osmotic tolerance of human granulocytes // *Amer. J. Physiol.*– 1984.– Vol. 247.– P. 373-381.
5. Bernard A., Fuller B. Cryopreservation of human oocytes : a review of current problems and perspectives // *Hum. Reprod. Update*.– 1996.– Vol. 2.– P. 193-207.
6. Block W. Cold tolerance of insects and other arthropods // *Phil. Transac. Royal Society Ser. B.*– 1990.– Vol. 326.– P. 613-631.
7. Boutron P., Mehl P., Kaufann A., Angibaud P. Glass forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons // *Cryobiology*.– 1986.– Vol. 23.– P. 453-469.
8. Chen S-U., Lien Y-R., Chen H-F. et al. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15.– P. 2598-2603.
9. Crowe J.H., Carpenter J., Crowe L., Anchooguy T. Are freezing and dehydration the same vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules // *Cryobiology*.– 1990.– Vol. 27.– P. 219-231.
10. Crowe J.H., Crowe L., Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms : the role of trehalose // *Science*.– 1984.– Vol. 223.– P. 701-703.
11. Crowe J.H., Jackson S., Crowe L. Non-freezable water in anhydrobiotic nematodes // *Mol. Physiol.*– 1983.– N3, Vol.99.– P. 105.
12. De Loecker W., Koptelov V., Grischenko V., De Loecker P. Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation // *Cryobiology*.– 1998.– Vol. 37.– P. 103-109.
13. Djuzenova C.S., Zimmermann U., Frank H. et al. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporabilized myeloma cells // *Biochim Biophys Acta*.– 1996.– Vol. 1284.– P. 143-152.
14. Eroglu A., Toner M., Toth T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes // *Fertil Steril*.– 2002.– Vol. 77.– P. 152-158.
15. Fahy G., MacFarlane D., Angell C., Meryman H. Vitrification as an approach to cryopreservation // *Cryobiology*.– 1984.– Vol. 21.– P. 407-426.
16. Farrant J., Walter C., Lee H. et al. A structural and functional aspects of biological freezing techniques // *J. Microscopy*.– 1977.– Vol.123.– P. 17-34.
17. Fleck R.A., Benson E., Bremner D., Day J.G. Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: a novel approach for developing protistan cryopreservation strategies // *Free Radic Res.*– 2000.– Vol. 32.– P. 157-70.
18. Franks F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In *water : a comprehensive treatise* // F Franks, ed. Plenum Press (New York).– 1982.– Vol. 7.– P. 215-338.
19. Fuller B. Organ preservation : the profit and loss account of using hypothermia to maintain viability // *Transplantation Rev.*– 1998.– Vol. 13.– P. 55-66.
20. Karlsson J. O. M., Cravahlo E.G., Toner M. A model for diffusion limited ice growth inside biological cells during freezing // *J. Appl. Physiol.*– 1994.– Vol. 75.– P. 4442-4455.
21. Leibo S.P., Farrant J., Mazur P. et al. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions : interactions of cooling and

5. *Bernard A., Fuller B.* Cryopreservation of human oocytes : a review of current problems and perspectives // *Hum. Reprod. Update.*– 1996.– Vol. 2.– P. 193-207.
6. *Block W.* Cold tolerance of insects and other arthropods // *Phil. Transac. Royal Society Ser. B.*– 1990.– Vol. 326.– P. 613-631.
7. *Boutron P., Mehl P., Kaufann A., Angibaud P.* Glass forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons // *Cryobiology.*– 1986.– Vol. 23.– P. 453-469.
8. *Chen S-U., Lien Y-R., Chen H-F. et al.* Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws // *Hum. Reprod.*– 2000.– Vol. 15.– P. 2598-2603.
9. *Crowe J.H., Carpenter J., Crowe L., Anchordoguy T.* Are freezing and dehydration the same vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules // *Cryobiology.*– 1990.– Vol. 27.– P. 219-231.
10. *Crowe J.H., Crowe L., Chapman D.* Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms : the role of trehalose // *Science.*– 1984.– Vol. 223.– P. 701-703.
11. *Crowe J.H., Jackson S., Crowe L.* Non-freezable water in anhydrobiotic nematodes // *Mol. Physiol.*– 1983.– N3, Vol.99.– P. 105.
12. *De Loecker W., Koptelov V., Grischenko V., De Loecker P.* Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation // *Cryobiology.*– 1998.– Vol. 37.– P. 103-109.
13. *Djuzenova C.S., Zimmermann U., Frank H. et al.* Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporabilized myeloma cells // *Biochim Biophys Acta.*– 1996.– Vol. 1284.– P. 143-152.
14. *Eroglu A., Toner M., Toth T.L.* Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes // *Fertil Steril.*– 2002.– Vol. 77.– P. 152-158.
15. *Fahy G., MacFarlane D., Angell C., Meryman H.* Vitrification as an approach to cryopreservation // *Cryobiology.*– 1984.– Vol. 21.– P. 407-426.
16. *Farrant J., Walter C., Lee H. et al.* Structural and functional aspects of biological freezing techniques // *J. Microscopy.*– 1977.– Vol.123.– P. 17-34.
17. *Fleck R.A., Benson E., Bremner D., Day J.G.* Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: a novel approach for developing protistan cryopreservation strategies // *Free Radic Res.*– 2000.– Vol. 32.– P. 157-70.
18. *Franks F.* The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In water : a comprehensive treatise // *F Franks, ed. Plenum Press (New York).*– 1982.– Vol. 7.– P. 215-338.
19. *Fuller B.* Organ preservation : the profit and loss account of using hypothermia to maintain viability // *Transplantation Rev.*– 1998.– Vol. 13.– P. 55-66.
20. *Karlsson J. O. M., Cravahlo E.G., Toner M.* A model for diffusion limited ice growth inside biological cells during freezing // *J. Appl. Physiol.*– 1994.– Vol. 75.– P. 4442-4455.
21. *Leibo S.P., Farrant J., Mazur P. et al.* Effects of freezing on marrow stem cell suspensions : interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol // *Cryobiology.*– 1970.– Vol. 6.– P. 315-332.
22. *Letur-Konirsch H., Collin G., Sifer C. et al.* Safety of cryopreservation straws for human gametes or embryos : a study with human immunodeficiency virus-1 under cryopreservation conditions // *Hum. Reprod.*– 2003.– Vol. 18.– P. 140-144.
23. *Lovelock J.* The hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1953.– Vol. 10.– P. 414-426.
24. *Lovelock J.* The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // *Biochem. J.*– 1954.– Vol. 56.– P. 265-270.
25. *Luyet B., Geheunio P.M.* Life and death at low temperatures // *Biodynamica Press.*– Normandy.– 1940.
26. *MacFarlane D.* Physical aspects of vitrification in aqueous solutions // *Cryobiology.*– 1987.– Vol. 24.– P. 181-195.
27. *Martino A., Songsasen N., Leibo S.P.* Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling // *Biol. Reprod.*– 1996.– Vol. 54.– P. 1059-1069.
28. *Mazur P.* Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing // *J. Gen. Physiol.*– 1963.– Vol. 47.– P. 347-369.
29. *Mazur P.* The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*– 1965.– Vol. 125.– P. 658-676.
30. *Mazur P.* Equilibrium, quasi-equilibrium and non-equilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell Biophys.*– 1990.– Vol. 17.– P. 53-92.
31. *Mazur P.* Principles of cryobiology // In 'Life in the Frozen State'. Eds B. Fuller, E. Benson & N. Lane. Taylor and Francis (London).– In press.– 2003.
32. *Mazur P., Cole K.W.* Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // *Cryobiology.*– 1989.– Vol. 26.– P. 1-29.
33. *McGann L.E., Farrant J.* Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196°C. II. Warming rate and dimethyl sulphoxide concentration // *Cryobiology.*– 1976.– Vol. 13.– P. 269-273.
34. *McGann, L.E., Janowska-Weiczorek A., Turner A. et al.* Water permeability of human hematopoietic stem cells // *Cryobiology.*–1987.– Vol. 24.– P. 112-119.
35. *Meryman H.T.* The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury // In 'The Frozen Cell. CIBA Foundation Symposium, London'. Ed O'Connor G.E.W. Churchill Press.– 1970.– P. 565-569.
36. *Muldrew K., Acker J., Elliot G., McGann L.E.* The transition of water to ice // In 'Life in the Frozen State'. Eds B. Fuller, E. Benson & N. Lane. Taylor and Francis London. In press.– 2003.
37. *Muldrew K., McGann L.E.* The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury // *Biophysical J.*– 1994.– Vol. 66.– P. 532-541.
38. *Nei T.* Mechanism of freezing injury to erythrocytes : Effect of initial cell concentration on the post thaw hemolysis // *Cryobiology.*– 1981.– Vol. 18.– P. 229-237.
39. *O'Neil L., Paynter S., Fuller B. et al.* Vitrification of mouse oocytes in a 6 M Me₂SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins // *Cryobiology.*– 1998.– Vol. 37.– P. 59-66.
40. *Paynter S., O'Neil L., Fuller B., Shaw R.* Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane -1,2 -diol // *Fertility&Sterility.*–2001.– Vol. 75.– P. 532-538.
41. *Paynter S., McGrath J., Fuller B., Shaw R.* A method for differentiating non-unique estimates of membrane transport properties : mature mouse oocytes exposed to glycerol // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 39.– P. 205-214.
42. *Pegg D.E.* The nature of cryobiological problems. In "Low Temperature Biotechnology : Emerging applications and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol // *Cryobiology.*– 1970.– Vol. 6.– P. 315-332.

- solutions // *Cryobiology*.– 1987.– Vol. 24.– P. 181-195.
27. *Martino A., Songsasen N., Leibo S.P.* Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling // *Biol. Reprod.*– 1996.– Vol. 54.– P. 1059-1069.
 28. *Mazur P.* Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing // *J. Gen. Physiol.*– 1963.– Vol. 47.– P. 347-369.
 29. *Mazur P.* The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*– 1965.– Vol. 125.– P. 658-676.
 30. *Mazur P.* Equilibrium, quasi-equilibrium and non-equilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell Biophys.*– 1990.– Vol. 17.– P. 53-92.
 31. *Mazur P.* Principles of cryobiology // In 'Life in the Frozen State'. Eds B. Fuller, E. Benson & N. Lane. Taylor and Francis (London).– In press.– 2003.
 32. *Mazur P., Cole K.W.* Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes // *Cryobiology*.– 1989.– Vol. 26.– P. 1-29.
 33. *McGann L.E., Farrant J.* Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196°C. II. Warming rate and dimethyl sulphoxide concentration // *Cryobiology*.– 1976.– Vol. 13.– P. 269-273.
 34. *McGann, L.E., Janowska-Weiczorek A., Turner A. et al.* Water permeability of human hematopoietic stem cells // *Cryobiology*.– 1987.– Vol.24.– P. 112-119.
 35. *Meryman H.T.* The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury // In 'The Frozen Cell. CIBA Foundation Symposium, London'. Ed O'Connor G.E.W. Churchill Press.– 1970.– P. 565-569.
 36. *Muldrew K., Acker J., Elliot G., McGann L.E.* The transition of water to ice // In 'Life in the Frozen State'. Eds B. Fuller, E. Benson & N. Lane. Taylor and Francis London. In press.– 2003.
 37. *Muldrew K., McGann L.E.* The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury // *Biophysical J.*– 1994.– Vol. 66.– P. 532-541.
 38. *Nei T.* Mechanism of freezing injury to erythrocytes : Effect of initial cell concentration on the post thaw hemolysis // *Cryobiology*.– 1981.– Vol. 18.– P. 229-237.
 39. *O'Neil L., Paynter S., Fuller B. et al.* Vitrification of mouse oocytes in a 6 M Me₂SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins // *Cryobiology*.– 1998.– Vol. 37.– P. 59-66.
 40. *Paynter S., O'Neil L., Fuller B., Shaw R.* Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane -1,2-diol // *Fertility&Sterility*.– 2001.– Vol. 75.– P. 532-538.
 41. *Paynter S., McGrath J., Fuller B., Shaw R.* A method for differentiating non-unique estimates of membrane transport properties : mature mouse oocytes exposed to glycerol // *Cryobiology*.– 1999.– Vol. 39.– P. 205-214.
 42. *Pegg D.E.* The nature of cryobiological problems. In "Low Temperature Biotechnology : Emerging applications and engineering contributions"// Eds. McGrath, J.J. and Diller, K. American Society of Mechanical Engineers.– 1988.– P. 3-21.
 43. *Pegg D.E., Daiper M.* The packing effect in erythrocyte freezing // *CryoLetters*.– 1983.– Vol. 4.– P. 129-136.
 44. *Pegg D.E., Daiper M.* On the mechanism of injury of slowly frozen erythrocytes // *Biophysical J.*– 1988.– Vol. 54.– P. 471-488.
 45. *Polge C., Smith A., Parkes A.* Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures // *Nature (Lond.)*.– 1949.– Vol. 164.– P. 666-667.
 46. *Puhlev I., Guo N., Brown D.R., Levine F.* Desiccation tolerance in human cells // *Cryobiology*.– 2001.– Vol. 42.– P. 207-217.
 47. *Rall W., Fahy G.* Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification // *Nature (Lond.)*.– 1985.– Vol. 220.– P. 1315-1317.
 48. *Rall W., Mazur P., McGrath J.J.* Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol // *Biophysical J.*– 1983.– Vol. 41.– P. 1-12.
 49. *Rall W., Reid D., Farrant J.* Innocuous biological freezing during warming. *Nature (Lond.)*.– 1980.– Vol. 286.– P. 511-514.
 50. *Rall W., Reid D., Polge C.* Analysis of slow-freezing injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods // *Cryobiology*.– 1984.– Vol. 21.– P. 106-121.
 51. *Russo M.J., Bayley H., Toner M.* Reversible permeabilization of plasma membranes with an engineered switchable pore // *Nature Biotech.*– 1997.– Vol. 15.– P. 278-282.
 52. *Stein A., Fisch B., Tadir Y. et al.* Cryopreservation of rat blastocysts: a comparative study of different cryoprotectants and freezing/thawing methods // *Cryobiology*.– 1997.– Vol. 30.– P. 128-134.
 53. *Steponkus P.L., Langis R., Fujikawa S.* Cryopreservation of plant tissues by vitrification // In 'Advances in Low Temperature Biology'. Ed. P.L. Steponkus. JAI Press, London.– 1992.– P. 1-61.
 54. *Stiff P.J.* Cryopreservation of hematopoietic stem cells // In 'Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation'. Lasky, L.C. and Warkentin P.I. (eds). Bethesda: American Association of Blood Banks.– 1995.– P. 69-82.
 55. *Stiff P.J., Murgo J.A., Zaroulis C.G. et al.* Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // *Cryobiology*.– 1983.– Vol.20.– P. 17-24.
 56. *Taylor M.J.* Physico-chemical principles in low temperature biology // In 'The Effects of Low Temperatures on Biological Systems', Edward Arnold (London & Baltimore).– 1987.– P. 3-71.
 57. *Taylor M., Bank H., Benton M.* Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages // *Cryobiology*.– 1987.– Vol. 24.– P. 91-102.
 58. *Tedder R., Zuckerman M., Goldstone A. et al.* Hepatitis B transmission from a contaminated cryopreservation tank // *Lancet*.– 1995.– Vol. 346.– P. 137-140.
 59. *Timasheff S.N., Lee J., Pitz, E., Tweedy N.* The interactions of tubulin and other proteins with structure stabilising solutes // *J. Colloid Interface Sci.*– 1976.– 55.– P. 658-663.
 60. *Toner M., Cravahlo E., Karel M.* Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells // *J. Appl. Phys.*– 1990.– Vol. 67.– P. 1582-1593.
 61. *Uemara M., Steponkus P.L.* Cold acclimation of *Aradopsis thaliana* : effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions // *Plant Physiol.*– 1995.– Vol. 109.– P. 15-30.
 62. *Verkmann A., Hoek A., Ma T. et al.* Water transport across mammalian cell membranes // *Amer. J. Physiol.*– 1996.– Vol. 270.– P. 12-30.
 63. *Webb M., Steponkus P.L.* Dehydration-induced hexagonal phase formation in phospholipids bilayers // *Cryobiology*.– 1990.– Vol. 27.– P. 666-667.
 64. *Whittingham D., Leibo S., Mazur P.* Survival of mouse engineering contributions"// Eds. McGrath, J.J. and Diller, K. American Society of Mechanical Engineers.– 1988.– P. 3-21.

50. *Rall W., Reid D., Polge C.* Analysis of slow-freezing injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods // *Cryobiology.*– 1984.– Vol. 21.– P. 106-121.
51. *Russo M.J., Bayley H., Toner M.* Reversible permeabilization of plasma membranes with an engineered switchable pore // *Nature Biotech.*– Vol. 15.– P. 278-282.
52. *Stein A., Fisch B., Tadir Y. et al.* Cryopreservation of rat blastocysts: a comparative study of different cryoprotectants and freezing/thawing methods // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 30.– P. 128-134.
53. *Steponkus P.L., Langis R., Fujikawa S.* Cryopreservation of plant tissues by vitrification // In 'Advances in Low Temperature Biology'. Ed. P.L. Steponkus. JAI Press, London.– 1992.– P. 1-61.
54. *Stiff P.J.* Cryopreservation of hematopoietic stem cells // In 'Marrow and Stem Cell Processing for Transplantation'. Lasky, L.C. and Warkentin P.I. (eds). Bethesda: American Association of Blood Banks.– 1995.– P. 69-82.
55. *Stiff P.J., Murgu J.A., Zaroulis C.G. et al.* Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch // *Cryobiology.*– 1983.– Vol.20.– P. 17-24.
56. *Taylor M.J.* Physico-chemical principles in low temperature biology // In 'The Effects of Low Temperatures on Biological Systems', Edward Arnold (London & Baltimore).– 1987.– P. 3-71.
57. *Taylor M., Bank H., Benton M.* Selective destruction of leucocytes by freezing as a potential means of modulating tissue immunogenicity: membrane integrity of lymphocytes and macrophages // *Cryobiology.*– 1987.– Vol. 24.– P. 91-102.
58. *Tedder R., Zuckerman M., Goldstone A. et al.* Hepatitis B transmission from a contaminated cryopreservation tank // *Lancet.*– 1995.– Vol. 346.– P. 137-140.
59. *Timasheff S.N., Lee J., Pitz, E., Tweedy N.* The interactions of tubulin and other proteins with structure stabilising solutes // *J. Colloid Interface Sci.*– 1976.– 55.– P. 658-663.
60. *Toner M., Cravahlo E., Karel M.* Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells // *J. Appl. Phys.*– 1990.– Vol. 67.– P. 1582-1593.
61. *Uemara M., Steponkus P.L.* Cold acclimation of *Aradopsis thaliana* : effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions // *Plant Physiol.*– 1995.– Vol. 109.– P. 15-30.
62. *Verkmann A., Hoek A., Ma T. et al.* Water transport across mammalian cell membranes // *Amer. J. Physiol.*– 1996.– Vol. 270.– P. 12-30.
63. *Webb M., Steponkus P.L.* Dehydration-induced hexagonal phase formation in phospholipids bilayers // *Cryobiology.*– 1990.– Vol. 27.– P. 666-667.
64. *Whittingham D., Leibo S., Mazur P.* Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C // *Science.*– 1972.– Vol. 178.– P. 411-414.
65. *Wolfe J., Dowgert M. Steponkus P.L.* Mechanical properties of the plasma membrane of isolated protoplasts : mechanisms of hyperosmotic and extracellular freezing injury // *Plant Physiol.*– 1983.– Vol. 71.– P. 276-285.
66. *Wolkers W.F., Walker N.J., Tablin F., Crowe J.H.* Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying // *Cryobiology.*– 2001.– Vol. 42.– P. 79-87.
67. *Wusteman M., Pegg D.E.* Differences in the requirements for cryopreservation of porcine aortic smooth muscle and endothelial cells // *Tissue Engineer.*– 2001.– Vol. 7.– P. 507-518.
68. *Zachariassen K., Zachariassen E.* Ice nucleation and Antinucleation in Nature // *Cryobiology.*– 2000.– Vol.41.– P. 257-279.

Accepted in 26.05.2003

Поступила 26.05.2003