

Разработка системной оптимизации протоколов криоконсервирования клеточных суспензий

UDC 57.043:547.42:612.79.014

N. Hofmann¹, I. Bernemann¹, D. Pogozhikh^{1,2}, B. Glasmacher¹

Development of Systematic Parameter Optimization for Cryopreservation Protocols for Cellular Suspensions

Эффективное криоконсервирование клеточных суспензий является важной задачей криобиологии. На основании предыдущих исследований была разработана методика системной оптимизации протоколов криоконсервирования клеточных суспензий. В качестве клеточной модели использовали кератиноциты человека. Исследование включало 48 протоколов с различными скоростями охлаждения (B) в двухступенчатых режимах (B1 в диапазоне от 4 до -30°C и B2 от -30 до -80°C). Все протоколы изучали при четырех различных концентрациях наиболее часто применяемого криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). Растровый анализ около 600 образцов позволил изучить полный набор возможных переменных. В дальнейших исследованиях данная методика была использована для улучшения протоколов криоконсервирования HPMEC-ST1.6R (легочные микрососудистые эндотелиальные клетки человека). Результаты исследования показали, что только определенное оптимальное сочетание скоростей охлаждения обеспечивает высокий уровень выживаемости клеток после оттаивания. Для кератиноцитов человека оптимальными протоколами замораживания были: охлаждение со скоростью 5 К/мин для B1 и 7,5 К/мин для B2, либо 5 К/мин для B1 и 10 К/мин для B2 при концентрации ДМСО 2,5%. Наиболее высокие показатели выживаемости культуры клеток HPMEC-ST1.6R были достигнуты при использовании следующих протоколов: 5 К/мин (B1) в сочетании с 5 К/мин (B2) (7,5% ДМСО); 3 К/мин в сочетании с 3 К/мин (5 или 7,5% ДМСО); 10 К/мин (B1) в сочетании с 3 К/мин (B2) (10% ДМСО).

Ключевые слова: криоконсервирование, клеточные суспензии, кератиноциты человека, HPMEC-ST1.6R, криопротекторы, ДМСО, скорость охлаждения.

Ефективне криоконсервування клітинних суспензій є важливим завданням криобіології. На підставі попередніх досліджень була розроблена методика системної оптимізації протоколів криоконсервування клітинних суспензій. У якості клітинної моделі використовували кератиноцити людини. Дослідження включало 48 протоколів з різними швидкостями охолодження (B) в двоступінчастих режимах (B1 в діапазоні від 4 до -30°C і B2 від -30 до -80°C). Усі протоколи вивчали при чотирьох різних концентраціях криопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО), який вживається найбільш часто. Растровий аналіз близько 600 зразків дозволив вивчити повний набір можливих змінних. У подальших дослідженнях дана методика була використана для поліпшення протоколів криоконсервування HPMEC-ST1.6R (легеневі микросудинні ендотеліальні клітини людини). Результати дослідження показали, що тільки певне оптимальне поєднання швидкостей охолодження забезпечує високий рівень виживання клітин після відтавання. Для кератиноцитів людини оптимальними протоколами заморожування були: охолодження зі швидкістю 5 К/хв для B1 і 7,5 К/хв для B2 або 5 К/хв для B1 і 10 К/хв для B2 при концентрації ДМСО 2,5%. Найбільш високі показники виживаності культури клітин HPMEC-ST1.6R були досягнуті при застосуванні наступних протоколів: 5 К/хв (B1) у поєднанні з 5 К/хв (B2) (7,5% ДМСО); 3 К/хв у поєднанні з 3 К/хв (5 або 7,5% ДМСО); 10 К/хв (B1) у поєднанні з 3 К/хв (B2) (10% ДМСО).

Ключові слова: криоконсервування, клітинні суспензії, кератиноцити людини, HPMEC-ST1.6R, криопротектори, ДМСО, швидкість охолодження.

Effective cryopreservation of cellular suspensions is an important task of cryobiology. A systematic parameter optimization setup for cryopreservation of cellular suspensions was established on the basis of our previous studies. Keratinocytes were used as a cellular model. The investigation included 48 protocols with different cooling rates (B) in a two-step freezing protocols (B1 in the range of 4°C to -30°C and B2 from -30°C to -80°C). All protocols have been studied with four different concentrations of the most frequently applied cryoprotective agent dimethyl sulfoxide (DMSO). Raster analysis of approximately 600 samples allowed the detection of the most comprehensive array of possible variables. In further investigations this setup was used to improve the cryopreservation protocols for HPMEC-ST1.6R (human pulmonary microvascular endothelial cells). Results revealed that only an optimal combination of cooling rates ensured the highest survival rates of cells after thawing. In case of keratinocytes, the optimal freezing protocol was composed of the cooling rates of 5 K/min for B1 and 7.5 K/min for B2, or 5 K/min for B1 and 10 K/min for B2 (2.5% DMSO concentration). The highest survival rates of HPMEC-ST1.6R cell culture were achieved with application of the following protocols: 5 K/min (B1) combined with 5 K/min (B2) (7.5% DMSO); 3 K/min, combined with 3 K/min (5% or 7.5% DMSO); and 10 K/min combined with 3 K/min (10% DMSO).

Key words: cryopreservation, cell suspensions, human keratinocytes, HPMEC-ST1.6R, cryoprotectants, Me₂SO, cooling rate.

¹ Ганноверский университет им. Лейбница, Германия;

² Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: JRG Biothermodynamik, Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover, Callinstr. 36, D-30167 Hannover; тел.: +49-511-762-19357; факс: +49-511-762-19389; электронная почта: hofmann@imp.uni-hannover.de

¹ Leibniz Universität Hannover, Germany

² Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: JRG Biothermodynamik, Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover, Callinstr. 36, D-30167 Hannover; tel.: +49-511-762-19357; fax: +49-511-762-19389; e-mail: hofmann@imp.uni-hannover.de

Криоконсервирование суспензии живых клеток, предназначенных для долгосрочного хранения, является важной областью криобиологии. Хранение в жидком азоте при температуре -196°C позволяет предотвратить развивающийся аутолиз, а также ряд других неблагоприятных процессов [9, 19, 27]. Основные физико-химические процессы, которые могут привести к повреждению клеток при криоконсервировании, не протекают в течение долгосрочного хранения, а развиваются в области температур, где происходят зарождение и рекристаллизация кристаллов льда внутри клетки и непосредственно вокруг нее, а также на этапе плавления при отогреве [1, 8]. В литературе особое внимание уделяется разработке термодинамических моделей, позволяющих определять транспортные характеристики плазматических мембран, в частности проницаемость для молекул воды и криопротекторов, и, используя эти данные, прогнозировать оптимальные скорости охлаждения для различных типов клеток [2, 4, 5, 10, 28–30].

В практике криоконсервирования клеточных суспензий широко применяют многоступенчатые режимы замораживания с разными значениями температуры переходов от этапа к этапу в зависимости от типа клеток [17, 20, 22]. При охлаждении адекватное обезвоживание клеток теоретически возможно до -30°C . Ниже этой температуры неизбежно образуется внутриклеточный лед в результате гомогенной нуклеации [23, 24, 34]. В данном температурном диапазоне вследствие рекристаллизации, интенсивность которой зависит от скоростей охлаждения, изменяется морфология кристаллов льда [6, 8, 21], а при температурах, близких к -80°C , высококонцентрированная криозащитная среда переходит в аморфное состояние [15, 16, 35].

Скорость охлаждения клеточных суспензий определяет характер кристаллизационных процессов. Концентрационные и температурные градиенты, которые возникают при высоких скоростях охлаждения системы, приводят к образованию в структуре льда дефектов различного типа (вакансии, дислокации и т. д.), а также так называемых текстур, что свидетельствует о наличии в кристаллах льда значительных деформационных напряжений [3]. Кинетические процессы, обусловленные релаксацией деформационных напряжений, могут быть причиной повреждения клеток в зоне низких температур [3, 6, 7]. В связи с этим оптимизация протоколов криоконсервирования требует, в первую очередь, тщательного исследования и анализа указанных температурных диапазонов и связанных с ними процессов кристаллизации.

Таким образом, для минимизации количества поврежденных клеток при криоконсервировании

An important field of cryobiology is the cryopreservation of living cells in suspension, which are intended for long-term storage. Storing in liquid nitrogen at -196°C allows preventing developing autolysis and other damaging processes [9, 19, 27]. The main critical physical and chemical processes that may lead to the cell damage at the process of cryopreservation do not occur during the long-term storage at extremely low temperatures, but rather during the passage through those temperature ranges that induce nucleation or recrystallisation within the cell and its nearest surrounding and at the melting stage during thawing [1, 8]. In cryobiological literature, special attention is paid to the development of thermodynamic models for determining the transport characteristics of cellular membranes, in particular the hydraulic permeability, and permeability to cryoprotectants, and to selection of optimal cooling rates for different types of cells on the basis of this data [2, 4, 5, 10, 28–30].

Multi-step freezing protocols with different temperatures of transition from stage to stage depending on a cell type are widely used in the practice of cryopreservation of cellular suspensions [17, 20, 22]. Temperature -30°C is considered as the temperature, higher to which adequate cell dehydration is theoretically possible, and below which an intracellular ice inevitably forms in result of homogeneous nucleation [23, 24, 34]. In this temperature range morphology of ice crystals is being changed, as a consequence of recrystallization, the intensity of which depends on the cooling rate [6, 8, 21]. Changes in the residual highly concentrated cryoprotective medium (its transition to an amorphous state) are possible in the temperature range approaching -80°C [15, 16, 35].

The cooling rate of cellular suspensions determines the character of crystallization processes. Concentration and temperature gradients, which occur at high rates of cooling of a system, lead to formation of various types of defects in the structure of ice (vacancies, dislocations, *etc.*) as well as the so-called textures. This indicates the presence of significant deformational stress in the ice crystals [3]. The kinetic processes, caused by the relaxation of deformational stress, can lead to the cell damage at the range of low temperatures [3, 6, 7]. For this reason, the optimization of cryopreservation protocols requires precise observation and analysis of the mentioned temperatures ranges and associated crystallization.

Therefore, freezing of biological object requires accurate selection of appropriate cooling rate, consideration of the nucleation temperature [32] and the choice of a suitable cryoprotective agent (CPA) of adjusted concentration in order to minimize the cryodamage of cells. The impact of applied cooling rates on the cells is widely described in literature [1, 8, 18, 19, 26, 27]. The CPA added to a freezing medium reduces the cell

необходимы тщательный подбор подходящей скорости охлаждения, учет температуры зарождения кристаллов льда [32] и выбор соответствующей концентрации криопротекторов (КП). Влияние скорости охлаждения на клетки достаточно полно описано в литературе [1, 8, 18, 19, 26, 27]. Добавление КП в криозащитную среду снижает повреждение клеток при замораживании и оттаивании. После оттаивания криоконсервированные клетки должны сохранять биологические функции и пролиферативные свойства. Однако современные научные исследования показывают, насколько трудно получить такие результаты. Для определения состояния клеток после оттаивания принято оценивать их жизнеспособность и функциональную активность. Оптимальные условия замораживания и оттаивания специфичны для каждого типа клеток и должны определяться индивидуально [19, 26].

Исследования [11, 13, 25, 32, 33] подтверждают, что оптимальные условия замораживания имеют большое значение для каждого типа клеток, обеспечивая более высокий уровень их сохранности после оттаивания. При подборе условий замораживания проводится полный анализ параметров (концентраций КП и скоростей охлаждения), которые позволяют оптимизировать процессы замораживания и тем самым увеличивать сохранность и жизнеспособность клеток. Предыдущие исследования в этом направлении [14] указанные параметры учитывали выборочно, и высокой корреляции между измеренными данными не было обнаружено. В данной работе способ корректировки концентраций криопротектора и скоростей охлаждения в протоколах замораживания конкретного типа клеток может быть усовершенствован благодаря применению крупномасштабной сетки измерений, позволяющей проводить объективный анализ этих параметров без ограничения области наблюдения.

Цель работы – разработка системного подхода к оптимизации протоколов криоконсервирования клеточных суспензий.

Материалы и методы

Около 600 образцов клеточных суспензий кератиноцитов человека были заморожены по разработанной схеме сочетаний скоростей охлаждения и концентраций криопротектора (рис. 1) с использованием программного замораживателя (CM 2000, Carbueros Metallicos/Air Products, Барселона, Испания). Был проведен анализ 48 различных двухступенчатых протоколов замораживания при четырех концентрациях (2,5; 5,0; 7,5 и 10,0%) наиболее часто применяемого криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). В каждом протоколе изменялся только один параметр (либо скорость охлаждения, либо концентрация КП), и таким образом путем

damage from cryopreservation during the freezing and thawing processes. After the thawing process, the cryopreserved cells should not exhibit any impairment of its biological functions and proliferative behavior. However, current scientific research shows how difficult it is to ensure such qualities. It is convenient to evaluate the condition of cells after thawing by measuring their viability and functional activity. Optimal freezing and thawing conditions are specific to the cell type and must be identified individually for each type of cells [19, 26].

Previous studies [11, 13, 25, 32, 33] support the understanding that optimized freezing conditions are essential for each type of cells, and have positive influence on higher cell survival rates. This standardized experimental process involves an extensive analysis of the freezing parameters (CPA concentration and cooling rates) that may help to optimize freezing processes and lead to increased cell survival rates. Previous studies conducted on this topic have only considered these parameters selectively and no precise correlation between the categories of measurement was identified [14]. Improved parameter adjustment of a cell specific freezing protocol could be achieved with application of a large-scale measuring grid (see Materials and methods section) that examines the parameters impartially and without prior limitation of the field of observation.

The aim of the work was the development of systematic approach to optimization of protocols for cryopreservation of cellular suspensions.

Materials and methods

About 600 individual samples of human keratinocyte cell suspensions were frozen with the developed combination scheme in a controlled manner using a controlled rate freezer (CM 2000, Carbueros Metallicos/Air Products, Barcelona, Spain). The assay included the analysis of 48 varying freezing protocols (Fig. 1) with four different concentrations (2.5, 5, 7.5, and 10%) of the commonly used cryoprotective agent dimethyl sulfoxide (DMSO). As for variation of cooling rate and CPA concentration, only one parameter has been altered at a time in each trial approach, and the evenly arranged measuring grid (Fig. 2) has been filled by systematic combination of the tested parameters.

Controlled thawing process took place in a specifically designed heating device [32]. This procedure allows controlled and reproducible heating of the sample, which ensures that changing viability values of the cells can be ascribed to the variation of the appointed parameters during freezing process. Primary human keratinocytes (Fig. 3A) served as a first cell model that was used to test the effectiveness of the developed parameter study. Since the optimal proliferation capacity of primary cells *in vitro* only lasts a few passages

последовательного сочетания переменных были исследованы все возможные экспериментальные вариации (рис. 2).

Процесс оттаивания контролировали в специально разработанном нагревательном приборе [32]. Эта процедура позволяет получать контролируемый и воспроизводимый отогрев образца, гарантирующий, что изменения показателей жизнеспособности клеток связаны только с вариацией параметров замораживания. Первичная культура кератиноцитов человека (рис. 3, А) являлась первой клеточной моделью, которую использовали для проверки эффективности разработанной методики подбора параметров. Поскольку оптимальная пролиферационная способность клеток первичной культуры *in vitro* сохраняется всего несколько пассажей (P), а у кератиноцитов существенно снижается к 4 пассажу (P4), для экспериментов по замораживанию использовали образцы из пассажей от P0 до P2. Кератиноциты получали от небольшого пула пациентов. Последующая оценка

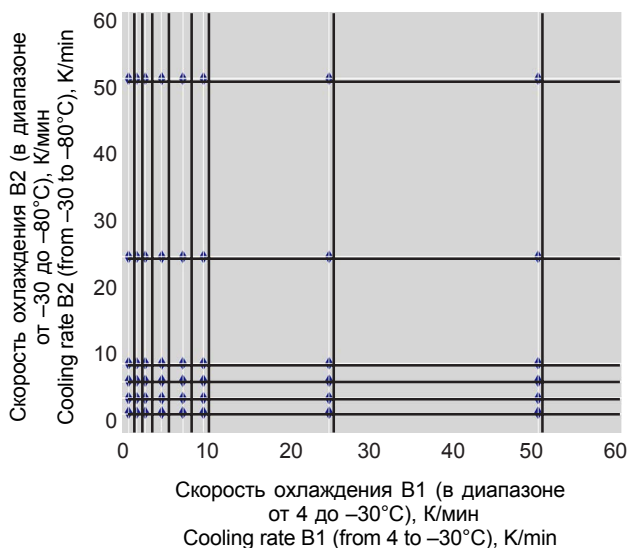


Рис. 2. Сетка измерений – основа для сбора данных двухступенчатых протоколов замораживания (B1 – в диапазоне от 4 до –30°C, B2 – в диапазоне от –30 до –80°C) [11].

Fig. 2. Measuring grid as basis for data acquisition with two-step freezing protocols (B1: in the range of 4 to –30°C; B2: in the range of –30 to –80°C) adapted from [11].

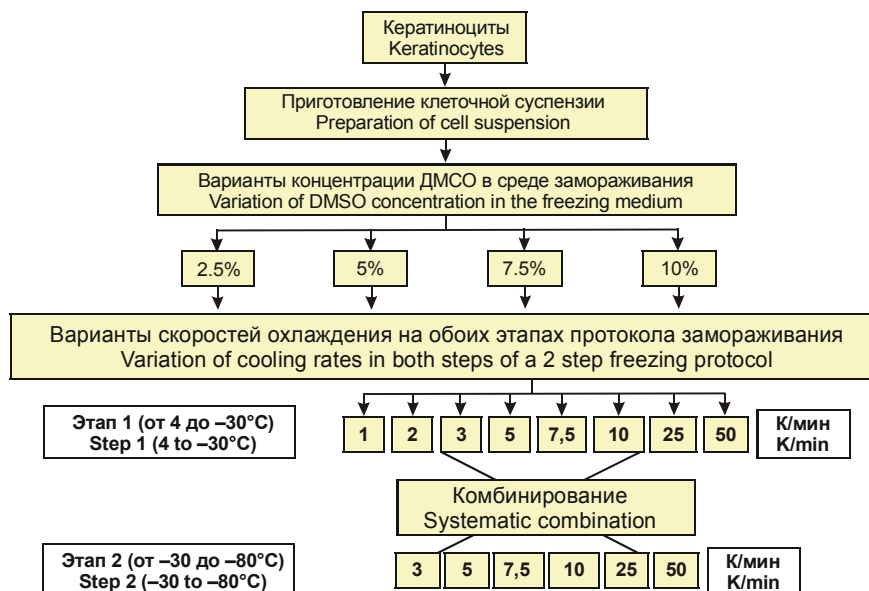


Рис. 1. Экспериментальная схема систематического сочетания скоростей охлаждения в двухступенчатых протоколах замораживания суспензии кератиноцитов человека с различной концентрацией ДМСО [11].

Fig. 1. Experiment scheme of the systematic combination of cooling rates in two-step freezing protocols with varying concentrations of DMSO for cryopreservation of keratinocytes (adapted from [11]).

(P), and in the case of keratinocytes it reduces significantly when reaching the passage 4 (P4), the frozen samples used were P0 to P2 trials. These samples were derived from a very small patient pool. For the further evaluation of the test system, a human pulmonary microvascular endothelial cell line (HPMEC-ST1.6R, Fig. 3B) was used.

Keratinocytes were cultivated *in vitro* in keratinocyte-SFM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) with EGF (1 ng/ml), BPE (30 µg/ml) and 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) at 5% CO₂ and 37°C.

For HPMEC-ST1.6R Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Biochrom AG, Germany) was used as basic culture medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS, Biochrom AG, Berlin, Germany), 1% Pen/Strep (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany), 0,5% ECGS (5 mg/ml) and 0,17% Heparine (5000 U/ml).

In order to obtain cellular suspension for freezing, the cells were incubated for three minutes with 0.25% trypsin/0.02% EDTA (Biochrom AG, Berlin, Germany) at 37°C and then separated from the bottom of the flask. 10% FBS enriched PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany) served as a stopping medium. The serum containing stopping medium was separated through centrifugation at 4°C. Subsequent cell counting was carried out in a ViCell XR (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany) using automatic TrypanBlue® staining. Cell number for each freezing sample was adjusted

тест-системы была проведена на клеточной линии человеческого легочного микрососудистого эндотелия HPMEC-ST1.6R (рис. 3, В).

Кератиноциты культивировали *in vitro* в среде keratinocyte-SFM (Invitrogen GmbH, Германия) с EGF (1 нг/мл), BPE (30 мкг/мл) и 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Invitrogen GmbH, Карлсруэ, Германия) при 5% CO₂ и 37°C.

Основной питательной средой при культивировании HPMEC-ST1.6R была DMEM (Biochrom AG, Германия) с добавлением по объему 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Biochrom AG, Германия), 1% Pen/Strep (Invitrogen GmbH, Германия), 0,5% ECGS (5 мг/мл) и 0,17% гепарина (5000 МЕ/мл).

Для получения суспензии для замораживания клетки инкубировали в течение 3 мин с 0,25% trypsin/0,02% EDTA (Biochrom AG, Германия) при 37°C, а затем отделяли от дна матраса. Средой, останавливающей пролиферацию, являлся 10% FBS, обогащенный PBS (Biochrom AG, Германия). Сыворотку, содержащую тормозящую среду, удаляли центрифугированием при 4°C. Последующий подсчет клеток осуществляли на приборе ViCell XR (Beckman Coulter GmbH, Германия) с автоматическим окрашиванием Trypan Blue®. Исходная концентрация клеток во всех экспериментах была постоянной и составляла 2×10⁵ кл/мл. Среду замораживания (культуральная среда + 20% FBS с различной концентрацией ДМСО) добавляли капельным путем. Образцы объемом 1,5 мл замораживали в криопробирках (Nalgene, Thermo Fischer Scientific, Германия). В каждом эксперименте одновременно замораживали три ампулы одного и того же образца. Скорости охлаждения варьировали в обеих частях двухступенчатого протокола замораживания: первую скорость охлаждения (B1) в диапазоне от 4 до -30°C; вторую (B2) – от -30 до -80°C. В случае, когда скорости на первом и втором этапах были равны (B1 = B2), протокол замораживания был одноступенчатым. После охлаждения до -80°C образцы помещали в морозильные камеры с температурой -152°C (Sanyo MDF-1155, Германия) и хранили минимум одну неделю. Поскольку хранение образцов при -152°C было идентичным для всех образцов, при анализе результатов его не выделяли в качестве отдельного этапа протокола замораживания. Контролируемый отогрев криокон-

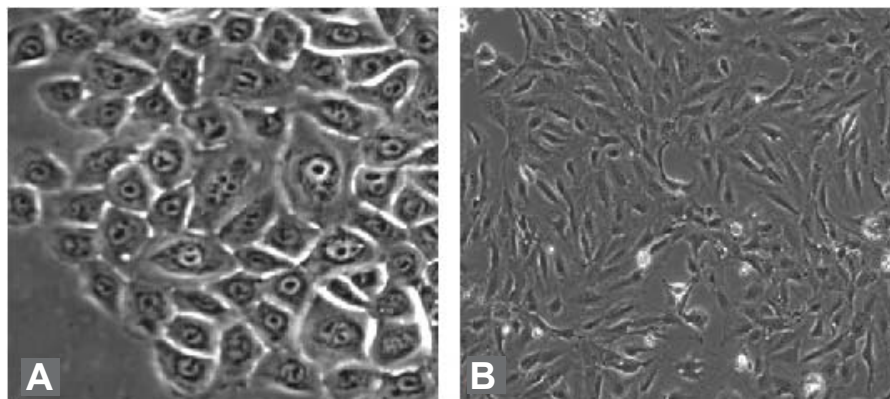


Рис. 3. Первичная культура кератиноцитов человека и HPMEC-ST1.6R. Адгезировавшие кератиноциты (А) и HPMEC-ST1.6R (В) формируют в культуре субконфлюэнтный монослой.

Fig. 3. Primary cultures of human keratinocytes and HPMEC-ST1.6R. Adherent keratinocytes (A) and HPMEC-ST1.6R (B) in culture form a nearly confluent monolayer.

ted to the desired value of 2×10⁵ cells/ml. Freezing medium (culture medium + 20% FBS with varying DMSO concentration) was added drop by drop. All trials were frozen in three parallels each at 1.5 ml in cryotubes (Nalgene, Thermo Fischer Scientific, Langselbold, Germany). The cooling rates were altered in both cooling sections of the two-step freezing protocol: first cooling rate (B1) from 4°C to -30°C; second cooling rate (B2) from -30°C to -80°C. In cases when B1 rate was equal to B2, the protocols were one-step. The samples that were cooled down to -80°C were then stored at -152°C (Sanyo MDF-1155, Landgraf, Hannover, Germany) for a minimum of one week. Since storage at -152°C was identical for all studied samples, we did not distinguish it as a separate step in freezing protocols during analysis. The controlled reheating of the cryopreserved samples to the temperature of 4°C was carried out in a 20°C water flow in a specially designed thawing apparatus [32] that was regulated by a LabView® control system. Firstly the samples were heated to 4°C for 10 s, then to 20°C for 150 s and finally they were kept at 4°C for 60 s [12]. Due to subsequent drop by drop adding of the respective culture medium into cell suspension that was performed immediately after the controlled warming, the DMSO was able to slowly diffuse out of the cells and thereby prevent them from damage.

After thawing the membrane integrity of the cells was determined by TrypanBlue® staining using an automatic cell counter (ViCell XR) and cell proliferation was tested by recultivation for 24 hours, *i. e.* a period shorter than the regular doubling time of the cells. The recultivated cells were counted, first those in the supernatant of the culture flask and then other cells, which were adhered to the bottom of the flask. The nonadhered cells were assumed as dead ones respectively not able to proliferate again, the adhered ones were

сервированных образцов до температуры 4°C проводили в проточной воде при 20°C в специально разработанном аппарате оттаивания [32], регулируемом системой управления LabView®. Вначале образцы нагревали до 4°C в течение 10 с, затем – до 20°C в течение 150 с и оставляли при температуре 4°C в течение 60 с [12]. Сразу же после отогрева в клеточную суспензию по каплям добавляли соответствующую питательную среду, что позволяло ДМСО медленно диффундировать из клеток и тем самым предохранять их от повреждения.

После оттаивания целостность мембран клеток оценивали окрашиванием TrypanBlue® с помощью автоматического счетчика клеток (ViCell XR), а пролиферативную активность клеток проверяли путем рекультивации в течение 24 ч, т. е. меньшему времени, чем время удвоения количества клеток. После рекультивирования сначала подсчитывали клетки в супернатанте из пластикового матраса для культивирования, а затем адгезировавшие на дне матраса. Неадгезировавшие клетки считали мертвыми и утратившими способность к пролиферации, а адгезировавшие – живыми и способными к пролиферации. Жизнеспособность клеток рассчитывали по этим значениям для сравнения полученных результатов с данными о сохранности, т. е. количестве клеток с неповрежденными мембранами.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов метода последовательного варьирования параметров замораживания, который вначале был апробирован на кератиноцитах человека, ясно показал, что только определенное сочетание скоростей охлаждения гарантирует максимально возможную жизнеспособность клеток. Даже незначительное изменение параметров оптимального протокола замораживания может привести к значительному уменьшению количества клеток с поврежденными мембранами, в результате чего достоверно снижается сохранность клеток после оттаивания. Как следует из данных, приведенных на рис. 4, при отклонении скорости охлаждения на первом и/или втором этапе от оптимальной всего на несколько градусов в минуту снижение сохранности клеток может достигать 30%.

При подборе оптимальных скоростей охлаждения для кератиноцитов человека с учетом необходимой концентрации криопротектора было установлено, что наилучшие результаты (сохранность клеток более 92%) могут быть достигнуты при использовании определенных протоколов даже при

assumed as alive and able to proliferate. The cell survival rate was calculated from these values to compare the results with those of the membrane integrity.

The results were statistically processed by the Student-Fisher test.

Results and discussion

The results of the parameter analysis, which was at first applied to human keratinocytes, clearly showed that only an optimal combination of cooling rates guaranteed the highest possible cell survival rates. Even minor aberration from such an optimal combination of cooling rates may lead to a severe reduction of membrane integrity, resulting in a significant decrease of cell viability after the thawing process. If the first and/or second cooling rate varies only by a few percent, the resulting membrane integrity might decrease by up to 30% (Fig. 4).

Regarding the established optimal cooling rates for keratinocytes (with membrane integrity rates of more than 92%) with consideration of the necessary concentrations of CPA, leads to the conclusion that best results for these cells can be achieved with these protocols even at a low applied concentration of DMSO of 2.5% (v/v). Higher DMSO concentrations in this case do not result in increased membrane integrity in cellular population. Therefore the concentration of DMSO can be reduced to the ascertained minimum, ensuring a cell friendly freezing process, if the optimal cooling

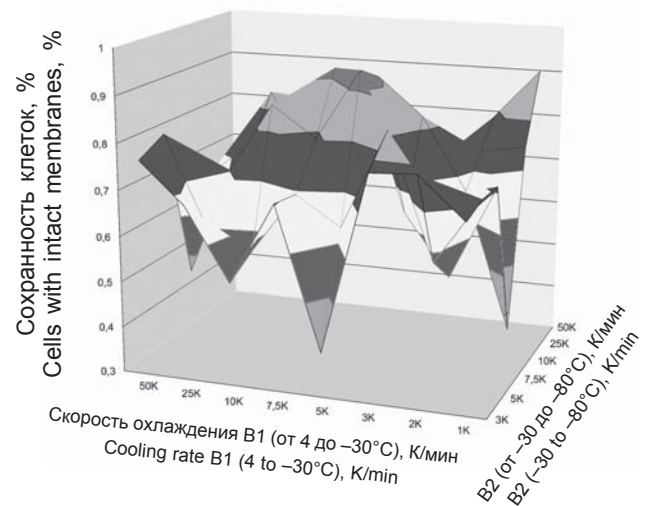


Рис. 4. Процент кератиноцитов человека с неповрежденными мембранами после оттаивания в зависимости от двухступенчатых протоколов замораживания. Приведены результаты для среды замораживания, содержащей 2,5% ДМСО (по объему), средние значения для $n = 3$, среднее отклонение 3,8 [11].

Fig. 4. Percentage of keratinocytes with intact membrane after thawing plotted against the according two-step freezing protocol. Exemplified results for 2.5% (v/v) DMSO in freezing medium, mean values from $n = 3$ with an average deviation of 3.8 (results of [11]).

низкой концентрации ДМСО (2,5% по объему). В этом случае повышение концентрации ДМСО не увеличивало сохранность в популяции клеток. Поэтому применение оптимальных скоростей охлаждения может значительно снизить необходимую для создания благоприятных условий замораживания клеток концентрацию ДМСО. При субоптимальных скоростях охлаждения показатели сохранности клеток могут быть улучшены путем некоторого повышения концентрации ДМСО в соответствии с протоколом.

При криоконсервировании культуры клеток HPMEC-ST1.6R повышение концентрации ДМСО может улучшить показатели сохранности клеток (рис. 5). Однако использования высоких концентраций ДМСО, при которых проявляется его цитотоксичность, вероятно, можно избежать путем определения оптимального сочетания скоростей охлаждения для каждого конкретного типа клеток, опираясь на результаты данного исследования.

Как показывают наши исследования, двухступенчатые режимы замораживания могут улучшить показатели сохранности и жизнеспособности кератиноцитов человека по сравнению с одноступенчатым замораживанием [31], что достигается при определенном сочетании скорости охлаждения на втором этапе (B2) и скорости охлаждения на первом (B1). Детальный анализ конкретных результатов позволил сделать заключение относительно оптимизации процессов замораживания кератиноцитов человека. Оценка сохранности криоконсервированных по разным режимам клеток непосредственно после оттаивания показала, что 94% клеток оставались неповрежденными. Наибольший процент сохранности клеток (> 90%) был получен при использовании различных двухступенчатых протоколов замораживания: 5 К/мин (B1) в сочетании с 7,5 К/мин (B2); 5 К/мин в сочетании с 10 К/мин и 7,5 К/мин в сочетании с 10 К/мин. Протоколы замораживания с применением скоростей охлаждения на первом этапе 25 К/мин и более напротив приводили к снижению сохранности клеток.

Для HPMEC-ST1.6R высокие показатели сохранности клеток были достигнуты при использовании следующих протоколов: 5 К/мин (B1) в сочетании с 5 К/мин (B2) (93%-я жизнеспособность клеток, 7,5% ДМСО), 3 К/мин в сочетании с 3 К/мин (92%-я жизнеспособность клеток, 5,0 или 7,5% ДМСО, рис. 5, А) и 10 К/мин в сочетании с 3 К/мин (90%-я жизнеспособность клеток, 10% ДМСО). Протокол замораживания 3/3 (рис. 5, А) показал наиболее высокие показатели сохранности и жизнеспособности клеток. В то же время при использовании протокола 3/5 (рис. 5, В), с незначительным отличием скорости охлаждения на вто-

rate is applied. At suboptimal cooling rates, however, the results of membrane integrity measurements may be improved with generally higher DMSO concentrations according to the protocol.

In the case of HPMEC-ST1.6R, an increased concentration of DMSO can lead to elevated membrane integrity (Fig. 5). However, the high strain on cells that is caused by CPA's toxicity can possibly be avoided by application of this report's findings, which allow the optimal and cell specific adaptation of cooling rates.

The investigated keratinocytes in the present study elucidate that two-step cooling programs may give rise to better membrane integrity and survival rates than single-step freezing protocols [31]. With the cooling programs that were applied in this study, an increase in cell cultivability is realized as the second cooling rate (B2) is adapted to the first cooling rate (B1).

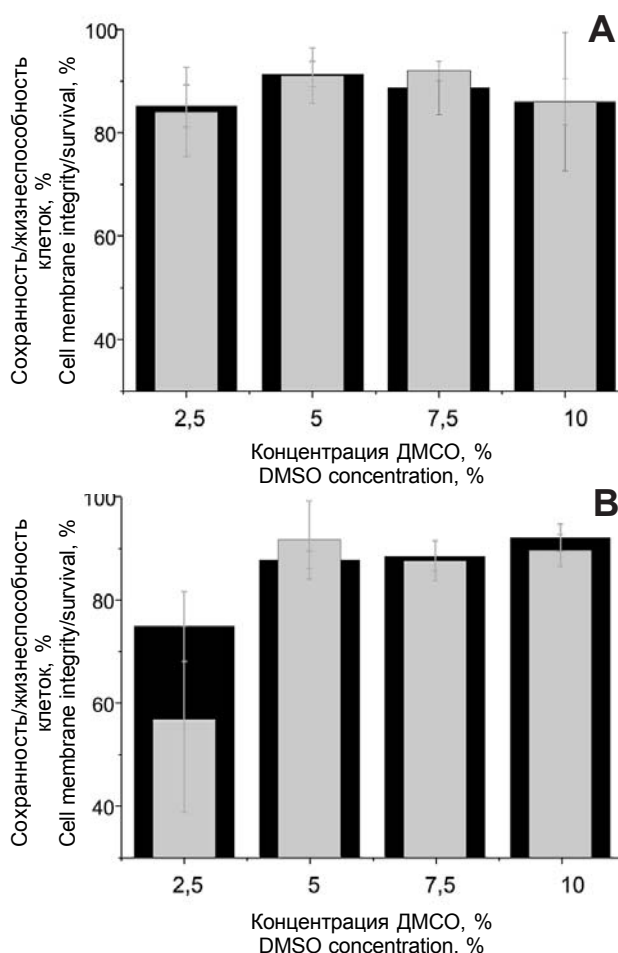


Рис. 5. Сохранность клеток HPMEC-ST1.6R непосредственно после оттаивания (■) и жизнеспособность (□) после рекультивирования в зависимости от концентрации ДМСО в среде замораживания: А – B1 – 3 К/мин, B2 – 3 К/мин; В – B1 – 3 К/мин, B2 – 5 К/мин.

Fig. 5. Mean values of membrane integrity directly after thawing (■) and survival rate (□) of HPMEC-ST1.6R after recultivation, arranged by DMSO concentration: А) B1 – 3K/min, B2 – 3K/min; В) B1 – 3K/min, B2 – 5K/min.

ром этапе в интервале температур от -30 до -80°C показатели сохранности клеток после оттаивания заметно не отличались, в то время как жизнеспособность клеток была значительно ниже при всех концентрациях ДМСО.

Следует отметить, что сами по себе скорости охлаждения как на первом, так на втором этапе не влияют на увеличение сохранности клеток. Количество поврежденных клеток минимизируется только при оптимальном сочетании этих скоростей.

Исходя из этих данных, можно заключить, что использование двухступенчатых протоколов замораживания с окончанием первого этапа охлаждения около -30°C улучшает результаты криоконсервирования кератиноцитов человека по сравнению с одноступенчатыми протоколами [31]. Как утверждает Mazur P. [26] и подтверждено результатами других исследований [13, 25], для различных типов клеток необходимы разные оптимальные скорости охлаждения, которые позволяют максимально улучшить показатели сохранности и жизнеспособности клеток.

Таким образом, криоконсервирование клеточных суспензий с обеспечением максимальных показателей жизнеспособности при минимальных концентрациях криопротектора зависит от точного подбора оптимальных параметров замораживания. Разработанная методика системного тестирования комбинаций скоростей охлаждения B1 и B2 и концентраций криопротектора позволяет определять оптимальные условия замораживания, специфические для конкретного типа клеток. Этот подход исключает необходимость исследования одиночных, а иногда случайно выбранных скоростей охлаждения и концентраций криопротектора. Он позволяет проводить надежный подбор оптимумов путем применения тест-сетки (растра) с большим числом контрольных точек измерения. Как показывают данные исследования, разница в количестве клеток с неповрежденными мембранами может достигать 30% даже у протоколов, расположенных близко друг к другу на сетке измерения (рис. 4, 5), т. е. небольшие вариации скоростей охлаждения могут приводить к значительному снижению сохранности клеток. Поэтому для достижения надежных результатов подробный сбор данных в представленном виде является не только целесообразным, но и необходимым.

Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе точного определения оптимальных протоколов замораживания, обеспечивающих после отогрева максимальную сохранность и жизнеспособность клеток. Оптимальное сочетание скоростей охлаждения B1 и B2 позволяет также сни-

Detailed examination of the particular results, allowed drawing certain conclusions about optimized freezing processes for human keratinocytes. If membrane integrity of the differently cryopreserved samples was measured directly after thawing, up to 94% of the cells could be detected as undamaged. Cell survival of the greatest extent ($> 90\%$) was discovered when using the various two-step protocols: 5 K/min (B1) combined with 7.5 K/min (B2); 5 K/min, combined with 10 K/min, and 7.5 K/min combined with 10 K/min. In contrast, cooling protocols with first step rates of 25 K/min or more, lead to reduced membrane integrity.

For HPMEC-ST1.6R the highest cell survival rates were achieved with the protocols: 5 K/min (B1) combined with 5 K/min (B2) (93% cell survival, 7.5 % DMSO), 3 K/min, combined with 3 K/min (92% cell survival, 5% or 7.5% DMSO, Fig. 5A), and unexpectedly 10 K/min combined with 3 K/min (90% cell survival, 10% DMSO). Freezing protocol 3/3 (Fig. 5A) has the highest values of membrane integrity and cell survival. At the same time, with the application of protocol 3/5 (Fig. 5B), with a minor deviations in the rate of cooling at the second stage in the range from -30°C to -80°C , membrane integrity levels after thawing are close in value, while the cell survival is significantly lower at all concentrations of DMSO.

Notably, neither the first nor the second cooling rate alone seems to be responsible for the increased membrane integrity, but the combination of both values leads to optimization of this parameter.

From these results, it can be assumed that the application of a two-step protocol, with first step to -30°C , improves cryopreservation of keratinocytes compared to single-step protocols [31]. As stated by Mazur P. [26], and affirmed in other previous studies [13, 25], different cells require varying optimal cooling rates that lead to maxima in membrane integrity and cell viability.

Therefore, cryopreservation of cells in suspension with maximum survival rates and minimum CPA addition depends on the exact adjustment of the optimal freezing parameters. By using the newly developed system of testing of combinations of cooling rates B1 and B2 and CPA concentrations, the optimal freezing conditions that are specific for a particular cell type can be identified. This approach replaces the investigation of single, selective and sometimes quite randomly chosen cooling rates and CPA concentrations. Instead, it leads to reliable optima findings, by applying a test grid with a high number of measuring points. As this study shows, the recession in percentages of membrane integrity may be as high as 30% for cooling rates lying close together on the measuring grid. Minor changes in cooling rates may result in unexpectedly high differences of membrane integrity (Fig. 4, 5). Detailed

зять концентрацию цитотоксического криопротектора и обеспечить более мягкий процесс замораживания, что приведет к более быстрому и легкому удалению токсического реагента после отогрева.

Таким образом, можно заключить, что стандартизированная система тестирования, использующая последовательную экспериментальную схему изучения и оценки широкого спектра скоростей охлаждения, а также концентраций криозащитных агентов, может обеспечить успешное криоконсервирование любого типа клеток.

Выводы

1. Представленный в работе метод системной оптимизации протоколов криоконсервирования различных клеточных суспензий позволяет определить наиболее эффективное сочетание скоростей двухступенчатого охлаждения и концентрации криопротектора, обеспечивающих максимальное сохранение клеток после отогрева.

2. Установлено, что в случае исследованных кератиноцитов человека наивысшая сохранность (> 90%) была получена при использовании различных двухступенчатых протоколов охлаждения: 5 К/мин (B1) в сочетании с 7,5 К/мин (B2), 5 К/мин в сочетании с 10 К/мин и 7,5 К/мин в сочетании с 10 К/мин. При этом достаточная концентрация криопротектора ДМСО составляла всего 2,5%.

3. В рамках изученных параметров наиболее высокие показатели жизнеспособности культуры клеток HPMEC-ST1.6R были достигнуты при использовании следующих протоколов охлаждения: 5 К/мин (B1) в сочетании с 5 К/мин (B2) (93% жизнеспособных клеток, 7,5% ДМСО); 3 К/мин в сочетании с 3 К/мин (92% жизнеспособных клеток, 5,0 или 7,5% ДМСО); 10 К/мин в сочетании с 3 К/мин (B2) (90% жизнеспособных клеток, 10% ДМСО).

4. Охлаждение исследуемых образцов с оптимальными скоростями позволяет снизить концентрацию ДМСО в среде замораживания до определенного минимума, обеспечивающего благоприятный для клеток процесс замораживания. В то же время при субоптимальных скоростях охлаждения показатели сохранности клеток могут быть улучшены путем небольшого повышения концентрации ДМСО в соответствии с протоколом.

Авторы благодарят Дж. Киркпатрика (J. Kirkpatrick) за предоставление клеточной линии HPMEC-ST1.6R, а также Р. Шпиндлера (R. Spindler), К. Штолля (C. Stoll) и Х. Сун (H. Sun) за техническую поддержку. Работа проводилась при финансовой поддержке Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Немецкого исследовательского фонда) для Кластера передового опыта "REBIRTH" ("From Regenerative Biology to Reconstructive Therapy" – "От регенеративной биоло-

data acquisition, as presented, is not only advisable, but essential, in order to achieve reliable statements.

It also shows how advantageous the precise determination of an optimal cooling protocol is, with respect to the post-thaw membrane integrity and survival of the cells. The optimal combination of B1 and B2 cooling rates allows achieving the reduction of cytotoxic CPA concentration and proves the freezing process to be milder, which results in an easier and faster removal of the toxic reagent after thawing.

In summary, it can be concluded that a standardized testing system that uses a consistent experiment pattern to examine and evaluate a large variety of cooling rates and cryoprotective agent concentrations may lead to successful cryopreservation of any tested cell type.

Conclusions

1. Presented method of systematic optimization of protocols for cryopreservation of various cellular suspensions allows determining the most effective combination of the rates of two-step cooling with concentration of cryoprotectant for maximal preservation of the cells after thawing.

2. It was established that in the case of studied cellular suspension of human keratinocytes, the highest survival (> 90%) was achieved with application of various two-step cooling protocols: 5 K/min (B1) combined with 7.5 K/min (B2); 5 K/min, combined with 10 K/min; and 7.5 K/min combined with 10 K/min. Sufficient concentration of DMSO was only 2.5%.

3. Within the studied parameters the highest cell survival rates for HPMEC-ST1.6R were achieved with the following cooling protocols: 5 K/min (B1) combined with 5 K/min (B2) (93% cell survival, 7.5% DMSO); 3 K/min, combined with 3 K/min (92% cell survival, 5% or 7.5% DMSO); and 10 K/min combined with 3 K/min (B2) (90% cell survival, 10% DMSO).

4. Application of optimal cooling rates for the studied samples allowed reduction of applied concentration of DMSO to the ascertained minimum, while still ensuring a cell friendly freezing process. At the same time, at suboptimal cooling rates, membrane integrity values after thawing could be improved with slight increase of DMSO concentrations according to the protocol.

We thank J. Kirkpatrick for providing the HPMEC-ST1.6R cell line as well as R. Spindler, C. Stoll, and H. Sun for their outstanding technical support. This work was supported by funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) for the Cluster of Excellence REBIRTH (from Regenerative Biology to Reconstructive Therapy) (EXC 62/1) and BMBF (80/049).

Authors express gratitude to Dr. L.G. Kuleshova for useful discussion.

Авторы выражают благодарность рецензенту Кулешовой Л.Г. за плодотворную дискуссию.

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 142 с.
2. Давыдова Е.В., Гордиенко О.И. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности // Проблемы криобиологии.– 2009.– Т. 19, №3.– С. 261–272.
3. Кулешова Л.Г. Исследование структурных особенностей замороженных водных растворов ПЭО–400 // Современные вопросы криобиологии: Сб. научных трудов.– Киев: Наук. думка, 1976.– С. 11–13.
4. Кулешова Л.Г., Коваленко И.Ф. Определение транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточной кристаллизации // Проблемы криобиологии.– 2006.– Т. 16, №1.– С. 3–12.
5. Кулешова Л. Г., Коваленко И.Ф. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий // Вестник Харьковского национального университета. Биофиз. вестник. – 2008.– Вып. 20 (1).– С. 56–64.
6. Кулешова Л. Г., Розанов Л.Ф. Роль структуры внеклеточного льда в процессе криповреждения клеток // Моделирование криобиологических процессов: Сб. научных трудов.– Харьков, 1988.– С. 25–34.
7. Осецкий А. И., Кирилюк А. Л., Гурина Т. М. О возможном механизме повреждения криоконсервируемых биологических объектов за счет пластической релаксации давлений в замкнутых жидкофазных включениях // Проблемы криобиологии.– 2007.– Т. 17, № 3.– С. 272–281.
8. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.– Киев: Наук. думка, 1972.– 242 с.
9. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия // Проблемы криобиологии.– 2003.– №2.– С. 62–83.
10. Чернобай Н.А., Пахомов А.В., Коваленко И.Ф. и др. Зависимость проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для молекул ряда криопротекторов от температуры // Проблемы криобиологии.– 2010.– Т. 20, №2.– С. 153–158.
11. Bernemann I., Hofmann N., Szentivanyi A., Glasmacher B. Development of a standard procedure to systematically optimize the cryopreservation protocol of suspended cells // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N3.– P. 408.
12. Bernemann I., Hofmann N., Szentivanyi A. et al. Optimisierung von Kryokonservierungsprotokollen: Systematische Parameteranalyse. // KI Kälte-Lüft-Klimatechnik, 2008.– Vol. 1–2.– P. 24–27.
13. Bernemann I., Kuberka M., Petersen A. et al. Cryopreservation of human fibroblasts and epithelial cells: Comparison of different freezing methods // Cryobiology.– 2005.– Vol. 51, N3.– P. 397.
14. Bischof J.C., Fahssi W.M., Smith D. et al. A parametric study of freezing injury in ELT-3 uterine leiomyoma tumour cells // Hum. Reprod.– 2001.– Vol. 16, N2.– P. 340–348.
15. Boutron P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glassforming tendency in aqueous cryoprotective solutions // Cryobiology.– 1986.– Vol. 23, N1.– P. 88–102.

References

1. Gordiyenko Ye.A., Pushkar N.S. Physical principles of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 142 p.
2. Davydova E.V., Gordienko O.I. Temperature effect on erythrocyte membrane permeability for cryoprotectants with different hydrophobicities // Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol. 19, N3.– P. 261–272.
3. Kuleshova L.G. Investigation of structure peculiarities of frozen aqueous solutions of PEO-400 // Current problems of cryobiology: Collection of scientific articles.– Kiev: Naukova Dumka, 1976.– P. 11–13.
4. Kuleshova L.G., Kovalenko I.F. Determining transport characteristics for cell plasma membranes under extracellular crystallisation // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N1.– P. 3–12.
5. Kuleshova L.G., Kovalenko I.F. Theoretical prediction of optimal cooling rates of cell suspensions // Vestnik of Kharkov National University. Biophysical Bulletin.– 2008.– Issue 20 (1).– P. 56–64.
6. Kuleshova L.G., Rozanov L.F. Role of extracellular ice structure in the process of cell cryoinjury // Modeling of cryobiological processes: Collection of scientific articles.– Kharkov, 1988.– P. 25–34.
7. Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M. On possible mechanism of damage in frozen-thawed biological objects due to pressure plastic relaxation in closed liquid phase inclusions // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N3.– P. 272–281.
8. Pushkar N.S., Belous A.M., Itkin Yu.A. et al. Low temperature crystallization in biological systems.– Kiev: Naukova Dumka, 1972.– 242 p.
9. Fuller B., Green C., Grischenko V.I. Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century // Problems of Cryobiology.– 2003.– N2.– P. 62–83
10. Chernobai N.A., Pakhomov A.V., Kovalenko I.F. et al. Temperature dependence of testes interstium cell membrane permeability for cryoprotectant molecules // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N2.– P. 153–158.
11. Bernemann I., Hofmann N., Szentivanyi A., Glasmacher B. Development of a standard procedure to systematically optimize the cryopreservation protocol of suspended cells // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N3.– P. 408.
12. Bernemann I., Hofmann N., Szentivanyi A. et al. Optimisierung von Kryokonservierungsprotokollen: Systematische Parameteranalyse. // KI Kälte-Lüft-Klimatechnik, 2008.– Vol. 1–2.– P. 24–27.
13. Bernemann I., Kuberka M., Petersen A. et al. Cryopreservation of human fibroblasts and epithelial cells: Comparison of different freezing methods // Cryobiology.– 2005.– Vol. 51, N3.– P. 397.
14. Bischof J.C., Fahssi W.M., Smith D. et al. A parametric study of freezing injury in ELT-3 uterine leiomyoma tumour cells // Hum. Reprod.– 2001.– Vol. 16, N2.– P. 340–348.
15. Boutron P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glassforming tendency in aqueous cryoprotective solutions // Cryobiology.– 1986.– Vol. 23, N1.– P. 88–102.
16. Boutron P., Mehl P., Kaufmann A., Angibaud P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons : I. Binary systems water-polyalcohol // Cryobiology.– 1986.– Vol. 23, N5.– P. 453–469.
17. Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E. Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // Cryobiology.– 1977.–Vol. 14, N3.– P. 273–286.
18. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperature.– Cambridge: University Press, 1985.– 210 p.
19. Fuller B.J., Lane N., Benson E.E. Life in a frozen state.– Boca Raton: CRC Press, 2004.– 696 p.

16. *Boutron P., Mehl P., Kaufmann A., Angibaud P.* Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons : I. Binary systems water-polyalcohol // *Cryobiology.*– 1986.– Vol. 23, N5.– P. 453–469.
17. *Farrant J., Walter C.A., Lee H., McGann L.E.* Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1977.–Vol. 14, N3.– P. 273–286.
18. *Franks F.* Biophysics and biochemistry at low temperature.– Cambridge: University Press, 1985.– 210 p.
19. *Fuller B.J., Lane N., Benson E.E.* Life in a frozen state.– Boca Raton: CRC Press, 2004.– 696 p.
20. *Higgins A.Z., Cullen D.K., La Placa M.C., Karlsson J.O.* Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // *J. Neurosci. Meth.*– 2011.– Vol. 201, N1.– P. 9–16.
21. *Ishiguro H., Rubinsky B.* Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification // *Cryobiology.*– 1994.– Vol. 31, N5.– P. 483–500.
22. *Karlsson J. O. M., Eroglu A., Toth T. L. et al.* Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol // *Hum. Reprod.*– 1996.– Vol. 11, N6.– P. 1296–1305.
23. *Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Borel Rinkes I.H.M. et al.* Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide // *Biophys. J.*– 1993.– Vol. 65, N6.– P. 2524–2536.
24. *Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Toner M.* A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing // *J. Appl. Phys.*– 1994.– Vol. 75, N9.– P. 4442–4455.
25. *Kuberka M., Rau G., Glasmacher B.* Cryopreservation of epithelial kidney cells // *Biomedizinische Technik.*– 2003.– Vol. 48, Suppl. 1.– P. 322–323.
26. *Mazur P.* Freezing of living cells: Mechanism and implication // *Am. J. Physiol.*– 1963.– Vol. 247.– P. 125–142.
27. *Mazur P., Leibo S.P., Chu E. H.Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell Res.*– 1972.– Vol. 71.– P. 345–355.
28. *Mazur P.* Kinetics water loss from cells at subzero temperature and the likelihood of intracellular freezing // *J. Gen. Physiol.*– 1984.– Vol. 47, N2.– P. 347–369.
29. *Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P.* Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability // *Cell Biophys.*– 1984.– Vol. 6, N3.– P. 197–213.
30. *McGrath J.J.* Quantitative measurement of cell membrane transport: Technology and applications // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 34, N4.– P. 315–334.
31. *Pasch J., Schiefer A., Heschel I., Rau G.* Cryopreservation of keratinocytes in a monolayer // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 39, N2.– P. 158–168.
32. *Petersen A., Schneider H., Rau G., Glasmacher B.* A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature // *Cryobiology.*– 2006.– Vol. 53, N2.– P. 248–257.
33. *Schneider H., Petersen A., Rau G., Glasmacher B.* First experimental application of new freezing devices for cryopreservation of human cells under controlled ice nucleus formation // *Cryobiology.*– 2005.– Vol. 51, N3.– P. 411.
34. *Trad F.S., Toner M., Biggers J.D.* Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes // *Hum. Reprod.*– 1999.–Vol. 14, N6.– P. 1569–1577.
35. *Wowk B.* Thermodynamic aspects of vitrification // *Cryobiology.*– 2010.– Vol. 60, N1.– P. 11–22.
20. *Higgins A.Z., Cullen D.K., La Placa M.C., Karlsson J.O.* Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // *J. Neurosci. Meth.*– 2011.– Vol. 201, N1.– P. 9–16.
21. *Ishiguro H., Rubinsky B.* Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification // *Cryobiology.*– 1994.– Vol. 31, N5.– P. 483–500.
22. *Karlsson J. O. M., Eroglu A., Toth T. L. et al.* Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol // *Hum. Reprod.*– 1996.– Vol. 11, N6.– P. 1296–1305.
23. *Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Borel Rinkes I.H.M. et al.* Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide // *Biophys. J.*– 1993.– Vol. 65, N6.– P. 2524–2536.
24. *Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Toner M.* A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing // *J. Appl. Phys.*– 1994.– Vol. 75, N9.– P. 4442–4455.
25. *Kuberka M., Rau G., Glasmacher B.* Cryopreservation of epithelial kidney cells // *Biomedizinische Technik.*– 2003.– Vol. 48, Suppl. 1.– P. 322–323.
26. *Mazur P.* Freezing of living cells: Mechanism and implication // *Am. J. Physiol.*– 1963.– Vol. 247.– P. 125–142.
27. *Mazur P., Leibo S.P., Chu E. H.Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell Res.*– 1972.– Vol. 71.– P. 345–355.
28. *Mazur P.* Kinetics water loss from cells at subzero temperature and the likelihood of intracellular freezing // *J. Gen. Physiol.*– 1984.– Vol. 47, N2.– P. 347–369.
29. *Mazur P., Rall W.F., Leibo S.P.* Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability // *Cell Biophys.*– 1984.– Vol. 6, N3.– P. 197–213.
30. *McGrath J.J.* Quantitative measurement of cell membrane transport: Technology and applications // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 34, N4.– P. 315–334.
31. *Pasch J., Schiefer A., Heschel I., Rau G.* Cryopreservation of keratinocytes in a monolayer // *Cryobiology.*– 1999.– Vol. 39, N2.– P. 158–168.
32. *Petersen A., Schneider H., Rau G., Glasmacher B.* A new approach for freezing of aqueous solutions under active control of the nucleation temperature // *Cryobiology.*– 2006.– Vol. 53, N2.– P. 248–257.
33. *Schneider H., Petersen A., Rau G., Glasmacher B.* First experimental application of new freezing devices for cryopreservation of human cells under controlled ice nucleus formation // *Cryobiology.*– 2005.– Vol. 51, N3.– P. 411.
34. *Trad F.S., Toner M., Biggers J.D.* Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes // *Hum. Reprod.*– 1999.–Vol. 14, N6.– P. 1569–1577.
35. *Wowk B.* Thermodynamic aspects of vitrification // *Cryobiology.*– 2010.– Vol. 60, N1.– P. 11–22.

Accepted 18.07.2011

Поступила 18.07.2011
Рецензент Л.Г. Кулешова