

## Влияние колебаний температуры хранения на жизнеспособность криоконсервированных клеток про- и эукариот

И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, О.В. КУДОКОЦЕВА, Т.Ф. ПЕТРЕНКО, Т.М. ГУРИНА,  
М.И. ГРОШЕВОЙ, В.Ф. МАРЦЕНЮК, С.В. КОШИЙ

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

## Effect of Storage Temperature Variations on Viability of Cryopreserved Cells of Pro- and Eukaryotes

I.P. VYSEKANTSEV, O.V. KUDOKOTSEVA, T.F. PETRENKO, T.M. GURINA,  
M.I. GROSHEVOY, V.F. MARTSENYUK, S.V. KOSHCHYI

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

Экспериментально показано, что при колебаниях температуры от  $-196$  до  $-130$  и  $-100^{\circ}\text{C}$  могут дополнительно гибнуть клетки микроорганизмов, клетки эмбрионов человека, опухолевидные клетки. Изучали динамику изменения температуры в криопробирках "Nunc" с клеточными суспензиями при проведении технологических операций в низкотемпературном банке биологических объектов.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, градиенты температуры, хранение, клетки, низкотемпературный банк.

Експериментально показано, що при коливаннях температури від  $-196$  до  $-130$  і  $-100^{\circ}\text{C}$  можуть додатково гинути клітини мікроорганізмів, клітини ембріонів людини, пухлиноподібні клітини. Вивчали динаміку зміни температури в криопробірках "Nunc" з клітинними суспензіями при проведенні технологічних операцій в низькотемпературному банку біологічних об'єктів.

**Ключові слова:** криоконсервування, градієнти температури, зберігання, клітини, низькотемпературний банк.

There was experimentally found the probability of extradeath of microorganism, human embryos' and tumour cells when varying the temperature from  $-196$  up to  $-130$  and  $-100^{\circ}\text{C}$ . There was studied the dynamics of temperature change in 'Nunc' cryotubes with cell suspensions during technological operations in low temperature bank of biological objects.

**Key-words:** cryopreservation, temperature gradients, storage, cells, low temperature bank.

Криоконсервирование является безальтернативным методом консервирования клеток млекопитающих [5] и одним из основных методов длительного хранения микроорганизмов [4]. Общепринято, что основная масса повреждений, приводящих к гибели клеток, происходит на этапах охлаждения-отогрева [1]. В работах [3,9] было показано, что в замороженных растворах криопротекторов при колебании температур, близких к температурам стеклования растворов, возможно образование термомеханических напряжений, приводящих к деформации и растрескиванию ледовой матрицы. Экспериментально было также показано, что при циклическом изменении температуры хранения в диапазоне температуры стеклования дополнительно гибнут гепатоциты крыс [2].

Опыт эксплуатации низкотемпературных банков биологических объектов показывает, что при перемещении хранящихся образцов, при их транспортировке и сортировке, хранении в парах жидкого азота и других манипуляциях в криоконсервированных образцах могут возникать градиенты температуры. Учитывая вышесказанное, нельзя исключить возможность дополнительной

Cryopreservation is the single method to preserve mammalian cells [5] and one of those basic for a long-term storage of microorganisms [4]. It is of common knowledge that the major damages, resulting in a cell death occurs at cooling-thawing stages [1].

The papers [3, 9] reported that in frozen solutions of cryoprotectants when temperature altered with the values close to temperature of solution vitrification, there was possible the formation of thermomechanical tensions, resulting in deformation and cracking of ice matrix. These observations enable to suppose the possibility of development of lethal damages in cryopreserved biological objects under actual conditions of low temperature banks exploitation at storage temperature alteration. There was experimentally proved as well that during cyclic change in the storage temperature within the vitrification temperature range, additional death of cryopreserved rat's hepatocytes appeared [2].

Experience of exploiting the low temperature banks of biological objects shows that during removal of samples, during their transportation and sorting, storage in liquid nitrogen vapours and other manipulations in cryopreserved samples the temperature gradients may appear. Taking into account all mentioned above it is

**Адрес для корреспонденции:** Высеканцев И.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-26-01, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Vysekantsev I.P., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722601, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

гибели криоконсервированных клеток при колебаниях температуры хранения.

Цель данной работы – изучение влияния циклического изменения температуры хранения на жизнеспособность криоконсервированных клеток про- и эукариот и изучение температуры в криопробирках во время моделирования условий хранения в парах азота, сортировки и перезакладки образцов.

### Материалы и методы

Объектами исследования были бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* B, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, клетки аденокарциномы крыс Герена, эмбриональные клетки печени и нейроткани эмбрионов человека со сроками гестации 7-9 недель.

Бактерии выращивали в течение 18 ч при 37°C на мясопептонном агаре [6] (МПА), смывали и дополнительно культивировали в течение 12 ч с аэрацией в мясопептонном бульоне (МПБ), затем бактерии осаждали центрифугированием и ресуспендировали в следующих средах: МПБ; МПБ + 5% ДМСО; МПБ + 5% сахарозы; 0,14 М раствор NaCl; 0,14 М раствор NaCl + 5% ДМСО; 0,14 М раствор NaCl + 5% сахарозы.

Дрожжи выращивали в течение 48 ч при 30°C в жидкой среде Сабуро [6] с аэрацией. Затем дрожжи также осаждали центрифугированием и ресуспендировали в следующих средах: среда Сабуро; среда Сабуро + 5% ДМСО; среда Сабуро + 5% сахарозы; 14 М раствор NaCl; 0,14 М раствор NaCl + 5% ДМСО; 0,14 М раствор NaCl + 5% сахарозы.

Опухоль Герена перевивали в крысах по общепринятым в экспериментальной онкологии методам. Перед криоконсервированием опухоль подвергали дезагрегации ферментативным методом [10]. Полученные клетки суспендировали в 0,14 М растворе NaCl с добавлением 5% ДМСО.

Эксперименты проведены в соответствии с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Клетки эмбриональной печени и нейроткани получали из эмбрионов человека. Клетки суспендировали в консервирующей среде, содержащей 10% ДМСО.

Клеточные суспензии всех объектов вносили по 1 мл в криопробирки “Nunc” объемом 2 мл. Образцы бактерий и дрожжей замораживали по следующей программе: охлаждение от 18 до 0°C со скоростью 1°C/мин, выдерживание при 0°C в течение 5 мин, охлаждение от 0 до –40°C со скоростью 2°C/мин, погружение в жидкий азот. Клетки опухоли Герена, КЭП и нейроклетки

impossible to exclude the possibility of additional death of cryopreserved cells during storage temperature alterations.

The research aim was to study the effect of cyclic storage temperature alterations on viability of cryopreserved cells of pro- and eukaryotes and to examine the temperature in cryotubes during modelling the storage conditions in nitrogen vapours, sorting and removal of samples.

### Materials ad methods

Research objects were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* B bacteria, *Saccharomyces cerevisiae* yeast, rat Guerin’s carcinoma, embryonic liver cells (ELCs) and human embryo neuronal tissue with gestation terms of 7-9 weeks.

Bacteria were grown for 18 hrs at 37°C on meat peptone agar (MPA) [6], washed away and additionally cultured for 12 hrs with aeration in meat peptone broth (MPB), then bacteria were centrifuged and re-suspended in the following media: MPB; MPB + 5% DMSO; MPB + 5% sucrose; 0.14 M NaCl + 5% DMSO; 0.14 M NaCl + 5% sucrose.

Yeast were grown for 48 hrs at 30°C in liquid Sabouraud’s medium [6] with aeration. Afterwards yeast were sedimented with centrifugation and re-suspended in the following media: Sabouraud’s medium; Sabouraud’s medium + 5% DMSO; Sabouraud’s medium + 5% sucrose; 14 M NaCl solution; 0.14 M NaCl + 5% DMSO; 0.14M NaCl + 5% sucrose.

Guerin’s carcinoma was inoculated in rats according to traditional in experimental oncology methods. Before cryopreservation the tumour was disaggregated by enzyme method [10]. Obtained cells were suspended in 0.14 M NaCl adding 5% DMSO.

Experiments were carried-out in accordance with European Convention for the protection of Vertebrates animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1985).

Cells of embryonic liver and neurotissue were derived from human embryos. Cells were suspended in preserving medium, containing 10% DMSO.

Cell suspensions of all objects were placed by 1 ml in “Nunc” cryotubes of 2-ml volume. Samples of bacteria and yeast were frozen on the programme: cooling from 18°C down to 0°C with the rate of 1°C/min, maintaining at 0°C during 5 min, cooling from 0 to –40°C with the rate of 2°C/min, plunging into liquid nitrogen. Cells of Guerin’s carcinoma, ELCs and neurocells were frozen on the described programme [2]. All samples were thawed on water bath at 40°C.

Viability of microorganisms was found by Koch’s plate method [8] on the number of macrocolonies, formed on agarised media. Viability of embryonic cells and those of Guerin’s tumour were assessed on staining with trypan blue [5].

замораживали по программе, описанной в [2]. Все образцы отогревали на водяной бане при 40°C.

Жизнеспособность микроорганизмов определяли чашечным методом Коха [8] по количеству микроколоний, сформировавшихся на агаризированных средах. Жизнеспособность эмбриональных клеток и клеток опухоли Герена оценивали по окрашиванию трипановым синим [5].

Часть замороженных до -196°C образцов хранили в течение года без изменения температуры (контроль). Три части образцов отогревали от -196°C соответственно до -150, -130 и до -100°C и хранили при этих температурах также в течение года. Оставшиеся образцы подвергали воздействию циклически изменяющейся температуры хранения. Один цикл состоял из пребывания образцов 16 ч в жидком азоте и последующего хранения в течение 8 ч в его парах при температурах -150, -130 или -100°C.

Динамику изменения температуры в криопробирках "Nunc" с клеточными суспензиями определяли дифференциальной термопарой "медь-константан". Один спай термопары находился при 0°C. Измерительный спай рабочей термопары располагали в контрольной ампуле с замораживаемой суспензией в ее геометрическом центре. В опытах по моделированию условий сортировки и перезакладки криопробирок измерительный спай рабочей термопары в некоторых пробирках размещали рядом со стенкой. Электродвижущую силу рабочей термопары измеряли вольтметром В7-21А. Температурное поле в парах азота исследовали в стандартном низкотемпературном хранилище биобъектов ХБ-0,5. Термометр сопротивления вводили через горловину хранилища внутрь и перемещали его от поверхности жидкого азота до верхней кромки горловины хранилища при разных уровнях жидкого азота. Минимальным уровнем считали его уровень ниже дна карусели с укладками.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым в биологии методам [7]. Достоверность расчетов 95%.

### Результаты и обсуждение

Было установлено, что однократное повышение температуры от -196 до -150, -130, -100°C с последующим хранением при этих температурах в течение 1 года не вызывает дополнительной гибели клеток. Количество клеток микроорганизмов и эукариот в образцах, хранившихся при указанных температурах, не отличалось от количества клеток, хранившихся при -196°C.

Циклическое изменение температуры от -196 до -150°C на протяжении 5 и 10 циклов также не вызывало дополнительной гибели клеток (рис. 1-2).

Part of frozen down to -196°C samples was stored during a year at this temperature (control). The parts of samples were thawed from -196°C up to -150, -130 and -100°C, correspondingly and also they were stored at the same temperatures during a year. The rest samples were affected by cyclic changing temperature of storage. One cycle comprised the staying of samples for 16 hrs in liquid nitrogen and following storage for 8 hrs in its vapours at -150°C, and either at -130 or -100°C.

Dynamics of temperature change in "Nunc" cryotubes with cell suspensions was detected with copper-constantan differential thermocouple. One soldered joint was at 0°C. Measuring soldered joint of operating thermocouple was located in a control ampoule with the suspension to be frozen in its geometrical centre. In experiments on modelling the sorting conditions and those of re-laying of cryotubes the measurement soldered joint of operating thermocouple in some vials was put just near the wall. Electromotive force (EMF) of operating thermocouple was measured using voltmeter V7-21A. Temperature field in liquid nitrogen vapours was examined in standard low temperature storehouse of biological objects KhB-0.5. Resistance thermometer was placed via vessel orifice and moved it from liquid nitrogen surface to upper edge of vessel orifice at various levels of liquid nitrogen. Minimum level was the one beyond the bottom of carousel with packing.

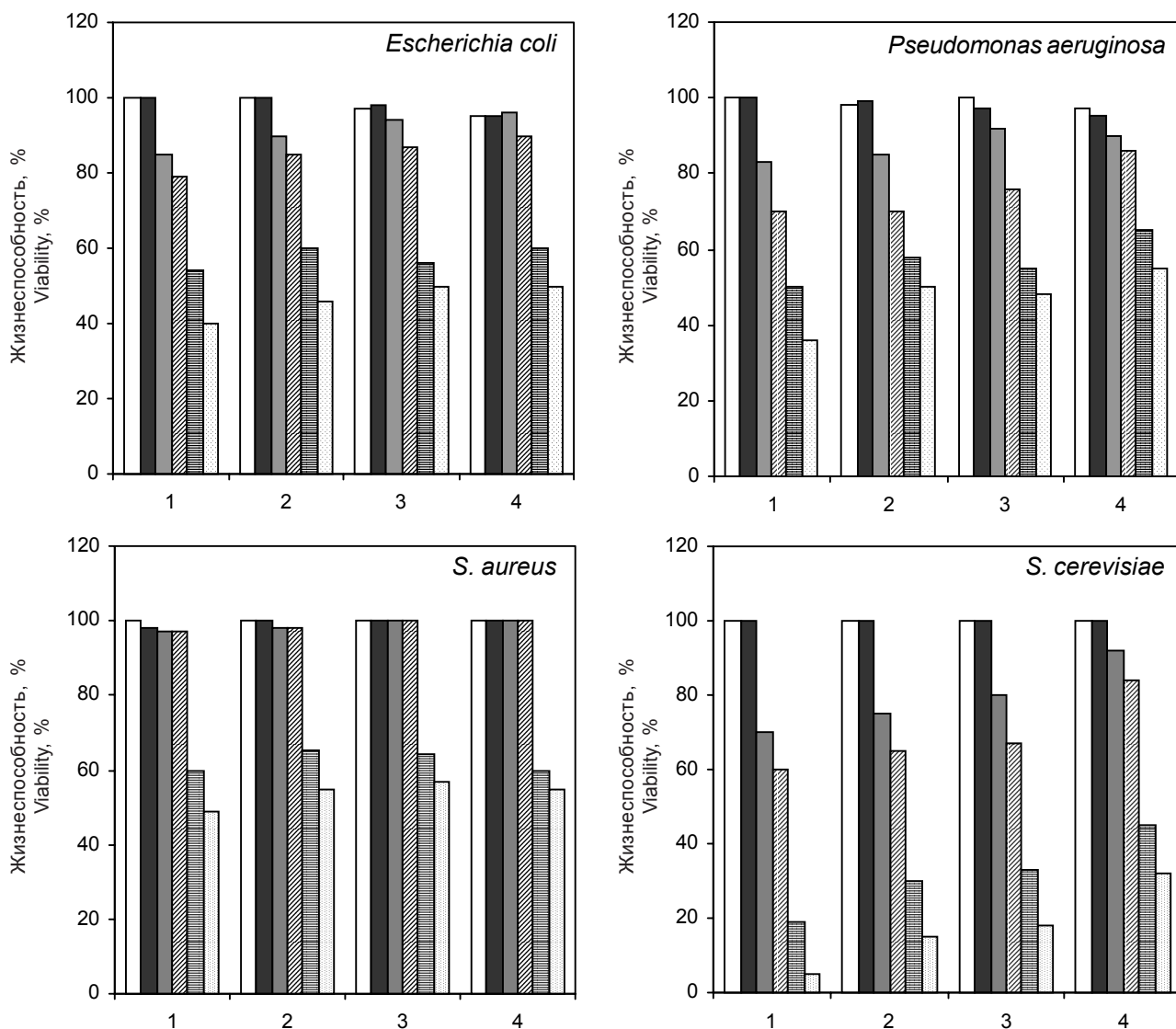
Statistical processing of the obtained results was performed using traditional in biology methods [7]. Calculation reliability is 95%.

### Results and discussion

It has been established that single rise of temperature from -196 up to -150, -130 and -100°C with following storage at these temperatures for 1 year does not cause an additional death of cells. Number of microorganism and eukaryote cells in samples, stored at mentioned temperatures, did not differ from the number of cells stored at -196°C.

Cyclic change of temperature from -196 up to -150°C during 5 and 10 cycles also did not result in additional death of cells (Fig. 1-2).

During cyclic change of temperature from -196 up to -130°C the amount of bacteria *E.coli* and *P.aeruginosa* significantly and statistically reduced in the samples when using as cryopreservation medium of 0.14 M NaCl (5, 10 cycles), 0.14 M NaCl+5% DMSO (10 cycles), 0.14 M NaCl+5% sucrose (10 cycles). When we cyclically alter the temperature from -196 up to -100°C the amount of bacteria *E.coli* and *P.aeruginosa* the number of dead bacteria increased in all cryopreservation media after 5 and 10 cycles. With the increase of cycles of temperature change from 5



**Рис. 1.** Жизнеспособность микроорганизмов (% от контроля) после циклического изменения температуры хранения: □ – 5 раз от  $-196$  до  $-150^{\circ}\text{C}$ ; ■ – 10 раз до  $-150^{\circ}\text{C}$ ; ▒ – 5 раз до  $-130^{\circ}\text{C}$ ; ▓ – 10 раз до  $-130^{\circ}\text{C}$ ; ▤ – 5 раз –  $100^{\circ}\text{C}$ ; ▥ – 10 раз до  $-100^{\circ}\text{C}$ ; 1 – 0,14 М NaCl; 2 – 0,14 М NaCl + 5% ДМСО; 3 – МПБ; 4 – МПБ + 5% ДМСО.

**Fig. 1.** Viability of *E. coli* bacteria (% of the control) after cyclic change in storage temperature from  $-196$  up to  $-150^{\circ}\text{C}$  5 times (□);  $-150^{\circ}\text{C}$  10 times (■);  $-130^{\circ}\text{C}$  5 times (▒);  $-130^{\circ}\text{C}$  10 times (▓);  $-100^{\circ}\text{C}$  5 times (▤);  $-100^{\circ}\text{C}$  10 times (▥); 1 – 0,14 М NaCl; 2 – 0,14 М NaCl + 5% DMSO; 3 – MPB; 4 – MPB + 5% DMSO.

При циклическом изменении температуры от  $-196$  до  $-130^{\circ}\text{C}$  количество бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* достоверно снижалось в образцах при использовании как среды консервирования 0,14 М раствора NaCl (5, 10 циклов); 0,14 М раствора NaCl + 5% ДМСО (10 циклов); 0,14 М раствора NaCl + 5% сахарозы (10 циклов). При циклическом изменении температуры в образцах с *E. coli* и *P. aeruginosa* от  $-196$  до  $-100^{\circ}\text{C}$  количество погибших бактерий увеличивалось во всех средах консервирования после 5 и 10 циклов. С увеличением циклов изменения температуры с 5 до 10 количество погибших бактерий достоверно увеличивалось. Наличие в среде консервирования криопротекторов ДМСО, сахарозы и использо-

to 10 the amount of dead bacteria statistically and significantly enhanced. The presence in preservation medium of DMSO, sucrose and usage as preservation medium of MPB caused at thermocycling a moderate protective effect. Since a protective effect of DMSO and sucrose did not statistically and significantly differ in Fig. 1 the data on sucrose application were not presented.

Cyclic change of temperature in samples with *S. aureus* from  $-196$  up to  $-130^{\circ}\text{C}$  did not cause an additional death of bacteria, and from  $-196$  up to  $-100^{\circ}\text{C}$  the number of viable cells of *S. aureus* statistically and significantly reduced and increased with the cycling repetition factor (Fig. 1). Composition of the preservation medium in experiments with *S. aureus* did not cause a protective effect.



вание как среды консервирования МПБ оказывало при термоциклировании умеренно выраженный защитный эффект. Поскольку защитный эффект при применении как ДМСО, так и сахарозы достоверно не отличался, на рис. 1 данные об использовании сахарозы не приводятся.

Циклическое изменение температуры в образцах с *S. aureus* от  $-196$  до  $-130^{\circ}\text{C}$  дополнительной гибели бактерий не вызывало, а от  $-196$  до  $-100^{\circ}\text{C}$  количество жизнеспособных клеток *S. aureus* достоверно снижалось (рис. 1). Состав среды консервирования в опытах с *S. aureus* защитного эффекта не оказывал.

В опытах с дрожжами *S. cerevisiae* дополнительную гибель клеток вызывали циклическими изменениями температуры от  $-196$  до  $-130$  и  $-100^{\circ}\text{C}$  (рис. 1). Чувствительность клеток дрожжей к колебаниям температуры хранения была достоверно выше, чем у бактерий. Количество погибших клеток увеличивалось с повышением температуры от  $-130$  до  $-100^{\circ}\text{C}$  и с увеличением количества циклов колебаний. Применение в составе среды консервирования криопротекторов ДМСО и сахарозы оказывало выраженный защитный эффект (данные по сахарозе не приведены).

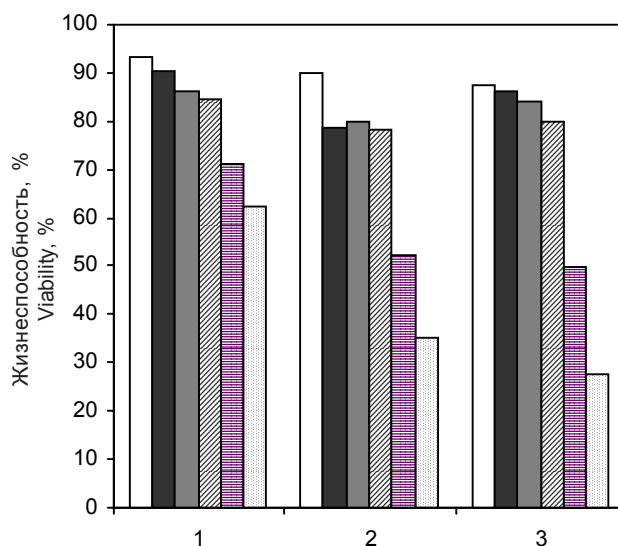
В опытах с клетками аденокарциномы Герена и эмбриональными клетками были получены результаты, сходные с результатами экспериментов с грамотрицательными бактериями и дрожжами. Часть клеток погибала при колебаниях температуры от  $-196$  до  $-130$  и  $-100^{\circ}\text{C}$  (рис. 2). При снижении температуры до  $-100^{\circ}\text{C}$  клеток погибало больше. Количество погибших клеток повышалось с увеличением количества циклов колебаний температуры. Устойчивость клеток разного происхождения к колебаниям температуры хранения снижалась по ряду: клетки аденокарциномы Герена – КЭП – клетки эмбриональной нейроткани.

В последующих экспериментах изучали изменение температуры в пробирках “Nunc” с клеточной суспензией в  $0,14\text{M}$  растворе  $\text{NaCl}$  с добавлением  $5\%$  ДМСО во время моделирования условий хранения.

При исследовании динамики изменения температуры в пробирках “Nunc” после отогрева от  $-196$  до  $-150$  и  $-100^{\circ}\text{C}$  было установлено, что температура в образцах повышается до  $-150$  и  $-100^{\circ}\text{C}$  через 30 мин (табл. 1, 2).

При изучении температурного поля внутри хранилища ХБ–0,5 было выявлено, что температура в его парах зависит от двух факторов – расстояния от зеркала жидкого азота и уровня жидкого азота в хранилище (рис. 3).

Была изучена также температура в пробирках во время моделирования условий сортировки и перезакладки криопробирок из карантин-



**Рис. 2.** Жизнеспособность (% от контроля) клеток аденокарциномы Герена (1), эмбриональной печени (2) и нейроткани (3) после циклического изменения температуры хранения: □ – 5 раз от  $-196$  до  $-150^{\circ}\text{C}$ ; ■ – 10 раз до  $-150^{\circ}\text{C}$ ; ◻ – 5 раз до  $-130^{\circ}\text{C}$ ; ◼ – 10 раз до  $-130^{\circ}\text{C}$ ; ⊞ – 5 раз до  $-100^{\circ}\text{C}$ ; ◻ – 10 раз до  $-100^{\circ}\text{C}$ ; 1 –  $0,14\text{M}$   $\text{NaCl}$ ; 2 –  $0,14\text{M}$   $\text{NaCl}$  +  $5\%$  ДМСО; 3 – МПБ; 4 – МПБ +  $5\%$  ДМСО.

**Fig. 2.** Viability (% of the control) of Guerin's carcinoma cells (1), embryonic liver cells (2) and neuronal tissue cells after cyclic change in storage temperature from  $-196$  up to  $-150^{\circ}\text{C}$  5 times (□);  $-150^{\circ}\text{C}$  10 times (■);  $-130^{\circ}\text{C}$  5 times (◻);  $-130^{\circ}\text{C}$  10 times (◼);  $-100^{\circ}\text{C}$  5 times (⊞);  $-100^{\circ}\text{C}$  10 times (◻); 1 –  $0,14\text{M}$   $\text{NaCl}$ ; 2 –  $0,14\text{M}$   $\text{NaCl}$  +  $5\%$  DMSO; 3 – MPB; 4 – MPB +  $5\%$  DMSO; change of temperature.

In experiments with *S. cerevisiae* yeast an additional death of cells was caused by cyclic changes in temperature from  $-196$  up to  $-130$  and  $-100^{\circ}\text{C}$  (Fig. 1). Yeast cell sensitivity to storage temperature alterations was statistically higher than in bacteria. Number of dead cells increased with a rise of temperature from  $-130$  up to  $-100^{\circ}\text{C}$  and with the increase in the number of alteration cycles. Application as a component of preservation medium of DMSO and sucrose rendered a manifested protective effect.

In experiments with Guerin's carcinoma and embryonic cells there were obtained the results similar to experimental ones with gram-positive bacteria and yeast. Some cells die during alteration of temperature from  $-196$  up to  $-130$  and  $-100^{\circ}\text{C}$  (Fig. 5). When decreasing the temperature down to  $-100^{\circ}\text{C}$  the number of dead cells was higher. Amount of dead cells enhanced with an increase of the number of cycles of temperature alteration. The resistance of cells of various origin to storage temperature fluctuation reduced in the order: Guerin's carcinoma – embryonic liver cells – cells of embryonic neurotissue.

In following experiments there was studied the change in temperature in “Nunc” cryotubes with cell suspension in  $0,14\text{M}$   $\text{NaCl}$  with adding  $5\%$  DMSO during modelling the storage conditions.

**Таблица 1.** Динамика изменения температуры в криопробирках “Nunc” после переноса их из жидкого азота в штатные кассеты при температурах  $-150$  и  $-100^{\circ}\text{C}$

**Table 1.** Dynamics of temperature change in “Nunc” cryotubes after their transfer from liquid nitrogen into regular cassettes at  $-150$  and  $-100^{\circ}\text{C}$

Температурный интервал термостеклования Temperature interval of thermovitrification	Количество криопробирок в кассете, шт Number of cryotubes in cassettes	Температура, $^{\circ}\text{C}$ , через время, мин Temperature, $^{\circ}\text{C}$ , in time, min														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	15	20	30	55	
От $-196^{\circ}\text{C}$ до $-150^{\circ}\text{C}$ From $-196$ up to $-150^{\circ}\text{C}$	1	-196,0	-193,5	-191,8	-183,3	-178,5	-174,7	-	-	-	-160,7	-155,0	-152,4	-150,5	-149,0	
	6	-196,0	-195,0	-192,8	-190,0	-186,6	-183,3	-180,2	-177,4	-175,0	-170,7	-163,7	-161,5	-156,0	-153,5	
От $-196$ до $-100^{\circ}\text{C}$ From $-196$ up to $-100^{\circ}\text{C}$	1	-196,0	-193,0	-183,0	-174,0	-165,0	-156,3	-148,8	-144,0	-136,3	-127,0	-110,5	-105,0	-98,3	-95,5	
	6	-196,0	-194,3	-189,0	-181,0	-173,0	-166,2	-159,0	-152,8	-147,5	-137,7	-120,5	-110,0	-99,0	-96,0	

ного хранилища в основное. Когда криопробирки, содержащие 0,5 или 2,0 мл суспензии клеток, замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$ , переносили в штатную кассету и размещали непосредственно над поверхностью жидкого азота, температура в них существенно не отличалась от контроля (табл. 2). Если замороженную до  $-196^{\circ}\text{C}$  криопробирку помещали в штатную кассету, размещенную на расстоянии 50 см от поверхности жидкого азота, повышение температуры в пробирке было более выраженным. Температура в криопробирке повышалась с увеличением времени нахождения в кассете. При внесении криопробирок в кассету, где находилось еще 6 замороженных пробирок, повышение температуры было менее выраженным.

Если замороженную криопробирку помещали в воздушную среду при  $20^{\circ}\text{C}$ , температура в ней уже через 2 мин повышалась выше  $-100^{\circ}\text{C}$  (табл.3).

Во всех экспериментах по переносу криопробирок до температуры выше  $-196^{\circ}\text{C}$  наблюдалась разница температур в центре и слое, расположенном рядом со стенкой.

### Выводы

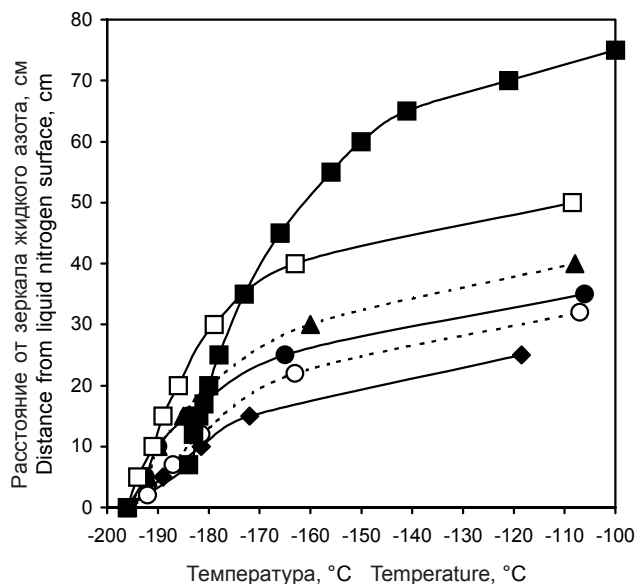
Экспериментально показана возможность дополнительной гибели криоконсервированных клеток про- и эукариот при колебаниях температуры хранения. Гибель клеток происходит при изменении температуры от  $-196$  до  $-130$  и  $-100^{\circ}\text{C}$ .

Количество погибших клеток увеличивается с повышением температуры и увеличением количества циклов колебания температуры. Хранение образцов при постоянных температурах  $-130$  или  $-100^{\circ}\text{C}$  к дополнительной гибели клеток не приводит.

На чувствительность клеток к колебанию температуры хранения влияют их исходные морфофункциональные свойства, обусловленные таксо-

When studying the dynamics of temperature change in “Nunc” cryotubes after thawing from  $-196$  up to  $-150$  and  $-100^{\circ}\text{C}$  there was established that the temperature in samples increased up to  $-150^{\circ}$  and  $-100^{\circ}\text{C}$  in 30 min (Tables 1, 2).

During investigation of temperature field inside the KhB-0.5 tank there was found that the temperature in liquid nitrogen vapours depends on two factors: the distance from liquid nitrogen surface and the level of liquid nitrogen in the storehouses (Fig. 3).



**Рис. 3.** Распределение температур над поверхностью жидкого азота в хранилище ХБ-0,5 при разной заполненности хранилища жидким азотом, уровень азота в хранилище, см: ■ – 95; □ – 70; ▲ – 60; ● – 55; ○ – 52; ◆ – 45.

**Fig. 3.** Distribution of temperatures above the surface of liquid nitrogen in KhB at various filling levels of the storehouse with liquid nitrogen; nitrogen level in tank, cm: ■ – 95; □ – 70; ▲ – 60; ● – 55; ○ – 52; ◆ – 45.

**Таблица 2.** Температуры в криопробирках, перенесенных из жидкого азота в штатные кассеты  
**Table 2.** Temperatures in cryotubes, transferred from liquid nitrogen into regular cassettes

Условия опыта Experimental conditions	Время, мин Time, min	Объем суспензии в криопробирках, мл Volume of suspension in cryotubes, ml	Размещение термопары в криопробирках Location of thermocouple in cryotubes		Температура, °C Temperature, °C
			центр centre	рядом со стенкой close to walls	
Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	—	2,0	+	+	– 196
		0,5	+	+	– 196
Перемещение криопробирки в кассету, расположенную непосредственно над поверхностью жидкого азота Transfer of cryotube into cassette located directly above the surface of liquid nitrogen	10	2,0	+	–	– 185,7
		2,0	–	+	– 180,5
		0,5	+	–	– 186,8
		0,5	–	+	– 185,5
	20	2,0	+	–	– 184,6
		2,0	–	+	– 180,7
		0,5	+	–	– 185,2
		0,5	–	+	– 182,7
Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	—	2,0	+	+	– 196
		0,5	+	+	– 196
Перемещение криопробирки в кассету, расположенную на расстоянии 50 мм от поверхности жидкого азота Transfer of cryotube into cassette with 6 tubes located directly on the distance of 50 mm above the surface of liquid nitrogen	10	2,0	+	–	– 162,4
		2,0	–	+	– 171,0
		0,5	+	–	– 179,1
		0,5	–	+	– 176,6
	20	2,0	+	–	– 154,3
		2,0	–	+	– 167,7
		0,5	+	–	– 176,6
		0,5	–	+	– 174,1
Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	—	2,0	+	+	– 196
		0,5	+	+	– 196
Перемещение криопробирки в кассету с 6 пробирками. Кассеты расположены на расстоянии 50 мм от поверхности жидкого азота Transfer of cryotube into cassette with 6 tubes located directly on the distance of 50 mm above the surface of liquid nitrogen	10	2,0	+	–	– 173,2
		2,0	–	+	– 177,2
		0,5	+	–	– 167,1
		0,5	–	+	– 180,2
	20	2,0	+	–	– 166,8
		2,0	–	+	– 176,6
		0,5	+	–	– 168,5
		0,5	–	+	– 176,6

номическим положением и происхождением, и состав среды консервирования.

Во время хранения в парах азота в хранилищах и при перемещении криопробирок через воздушную среду возможно повышение в них температуры

There was also studied the temperature inside cryotubes during modelling the sorting conditions and their re-laying from quarantine vessel into main one. When vials with 0.5 or 2.0 ml of suspension were frozen down to –196°C, transferred into regular cassette and

**Таблица 3.** Температуры в криопробирках, перенесенных из жидкого азота в воздушную среду  
**Table 3.** Temperatures in cryotubes, transferred from liquid nitrogen into air

Условия опыта Experimental conditions	Время, мин Time, min	Объем суспензии в криопробирках, мл Volume of suspension in cryotubes, ml	Размещение термопары в криопробирках Location of thermocouple in cryotubes		Температура, °С Temperature, °С
			центр centre	рядом со стенкой close to walls	
Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	—	2,0	+	+	– 196
		0,5	+	+	– 196
Перемещение криопробирки в воздушную среду Transfer of cryotube into air	1	2,0	+	–	– 156,6
		2,0	–	+	– 138,2
		0,5	+	–	– 124,3
		0,5	–	+	– 113,2
	2	2,0	+	–	– 118,2
		2,0	–	+	– 100,0
		0,5	+	–	– 75,9
		0,5	–	+	– 65,2
	3	2,0	+	–	– 83,6
		2,0	–	+	– 73,6
		0,5	+	–	– 50,0
		0,5	–	+	– 43,2

до значений, при которых наблюдали гибель клеток.

Установленный факт возможности летального повреждения клеток при колебании температуры от –196°С до температуры выше –130°С следует учитывать при разработке технологических инструкций по эксплуатации низкотемпературных банков биологических объектов.

### Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под общ. ред. Н.С. Пушкаря и А.М. Белоуса.– Киев: Наук. думка, 1981.– 608 с.
2. *Грищенко В.И., Тарасов А.И., Руденко С.В., Петренко А.Ю.* Чувствительность к программному и циклическому замораживанию и отогреву клеток эмбриональной печени человека 7-12 недель гестации // Пробл. криобиологии.– 2000.– №4.– С. 37-44.
3. *Зинченко А.В., Зинченко В.Д.* Исследование акустической эмиссии в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола при охлаждении-нагреве // Пробл. криобиологии.– 1999.– №3.– С. 43-45.
4. *Криобиология и биотехнология* / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук.думка, 1987.– 216 с.
5. *Культура животных клеток: Методы* / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир, 1989.– 333 с.
6. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований.– М.: Медицина, 1978.– 397 с.

placed directly above the surface of liquid nitrogen, the temperature in them did not significantly differ from the control (Table 2). If frozen down to –196°С cryotube was placed into regular cassette placed in a distance of 50 cm from liquid nitrogen surface the temperature rise in a vial was more manifested. Temperature in cryotube increased with the rise of the time of being in a cassette. In case of cryotubes placing into a cassette where there were more 6 frozen vials, temperature rise was less manifested.

If frozen cryotube was placed in air at 20°С, in 2 min the temperature in it increased higher than –100°С (Table 3).

In all experiments on transfer of cryotubes up to the temperature higher than –196°С there was revealed the difference of temperatures in the centre and the layer adjacent to walls (Table 2, 3).

### Conclusions

Extradeth of cryopreserved cells of pro- and eukaryotes is experimentally shown when altering the storage temperature. Cell death occurs during temperature transition from –196°С up to –130° and –100°С.

Number of dead cells increases with a rise in temperature and the one of cycles of temperature alte-



7. *Лакин Т.Ф.* Биометрия.– М.: Высш. школа, 1989.– 339 с.
8. *Луста К.А., Фихте Б.А.* Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К. Ерошина.– Пущино, 1990.– 186 с.
9. *Осецкий А.И., Гурина Т.М.* Исследование фазовых состояний замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации // Пробл. криобиологии.– 1992.– №4.– С. 24-29.
10. *Пашинцев Л.П., Абаев В.М., Любимова Н.В., Кирюшкина М.С.* Методика получения жизнеспособных клеток злокачественных опухолей молочной железы человека // Эксперим. онкология.– 1993.– Вып. 15, №6.– С. 52-56.

*Поступила 15.07.2004*

ration. Storage at constant temperatures of  $-130$  or  $-100^{\circ}\text{C}$  does not result in additional death of cells.

Initial morphofunctional properties of cells, stipulated by taxonomic location and origin, as well as composition of preservation media affect their sensitivity.

During storage in nitrogen vapours in storehouses and when removing cryotubes in air, the temperature rise in them is probable up to values where cell death was observed. The finding about the possibility of lethal damage of cells at temperature alteration from  $-196$  up to  $-130^{\circ}\text{C}$  should be taken into account when developing technical guidelines on exploitation of low temperature banks of biological objects.

### References

1. *Actual problems of cryobiology/* Ed. by N.S. Pushkar and A.M. Belous. – Kiev: Naukova Dumka, 1981.– 608 p.
2. *Grischenko V.I., Tarasov A.I., Rudenko S.V., Petrenko A.Yu.* Sensitivity to programmable and cyclic freezing and thawing of cells of human embryonic liver of 7-12 gestation weeks // Problems of Cryobiology.– 2000.– N4.– P. 37-44.
3. *Zinchenko A.V., Zinchenko V.D.* Investigation of an acoustic emission in glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions under cooling and heating // Problems of Cryobiology.– 1999.– N3.– P. 43-46.
4. *Cryobiology and biotechnology/* Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova Dumka, 1987.– 216 p.
5. *Culture of living cells: Methods/* Ed. by R. Freshni.– Moscow: Mir, 1989.– 333 p.
6. *Labinskaya A.S.* Microbiology with the technique of microbiological studies.– Moscow: Meditsina, 1978.– 397 p.
7. *Lakin T.F.* Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1989.– 339 p.
8. *Lusta K.A., Fikhte B.A.* Method of determining the viability of microorganisms / Ed. by Eroshin V.K.– Puschino, 1990.– 186 p.
9. *Osetsky A.I., Gurina T.M.* Study of phase states of frozen solutions and biosystems by the method of thermoplastic deformation // Problems of Cryobiology. – 1992.– N 4.– P. 24-29.
10. *Pashintsev L.P., Abaev V.M., Lyubimova N.V., Kiryushkina M.S.* Methods of obtaining viable cells of human breast tumor// Experimental oncology.– 1993.– Issue 15, N6.– P. 52-56.

*Accepted in 15.07.2004*