

УДК 57.043:612.111:536.54

Т.М. Гурина*, И.П. Высеканцев, А.Л. Полякова

Влияние скорости охлаждения в области эвтектической температуры водного раствора криопротектора на жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli* после оттаивания

UDC 57.043:612.111:536.54

T.M. Gurina*, I.P. Vysekantsev, A.L. Polyakova

Effect of Cooling Rate in the Vicinity of Eutectic Temperature Characteristic for Cryoprotectant Aqueous Solution on Post-Thaw Viability of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* Cells

Реферат. В работе изучено влияние различных скоростей охлаждения в области эвтектических температур водных растворов криопротекторов (диметилсульфоксид, глицерин, полиэтиленоксид с молекулярной массой 1500, 1,2-пропандиол) на жизнеспособность клеточных суспензий *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli*. В указанном температурном интервале образцы клеточных суспензий охлаждали с контролируруемыми (1 и 25 град/мин) и неконтролируемыми (погружение в жидкий азот) скоростями охлаждения. Показано преимущество применения контролируемых скоростей охлаждения в области эвтектических температур исследуемых растворов криопротекторов для повышения жизнеспособности микроорганизмов после криоконсервирования. Наилучшие показатели жизнеспособности *S. cerevisiae* и *E. coli* были получены при скорости охлаждения 25 град/мин. Эта тенденция сохранялась для всех изученных концентраций криопротекторных веществ (5, 10, 15, 20%). Полученные результаты рекомендуется учитывать при разработке режимов замораживания других биологических объектов.

Ключевые слова: криоконсервирование, микроорганизмы, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, криопротекторный раствор, эвтектическая температура, скорость охлаждения.

Реферат. В роботі вивчено вплив різних швидкостей охолодження в області евтектичних температур водних розчинів криопротекторів (диметилсульфоксид, глицерин, поліетиленоксид з молекулярною масою 1500, 1,2-пропандіол) на життєздатність клітинних суспензій *Saccharomyces cerevisiae* і *Escherichia coli*. В зазначеному температурному інтервалі зразки клітинних суспензій охолоджували з контрольованими (1 і 25 град/хв) та неконтрольованими (занурення в рідкий азот) швидкостями охолодження. Показано перевагу застосування контрольованих швидкостей охолодження в області евтектичних температур розчинів криопротекторів, що досліджувалися, для підвищення життєздатності мікроорганізмів після криоконсервування. Найкращі показники життєздатності *S. cerevisiae* і *E. coli* було отримано при швидкості охолодження 25 град/хв. Ця тенденція зберігалася для всіх концентрацій (5, 10, 15, 20%) криопротекторних речовин, що досліджувалися. Отримані результати рекомендовано враховувати при розробці режимів заморожування інших біологічних об'єктів.

Ключові слова: криоконсервування, мікроорганізми, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, криопротекторний розчин, евтектична температура, швидкість охолодження.

Abstract. The effect of various cooling rates in the range of eutectic temperatures of aqueous solutions of cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, glycerol, polyethylene oxide with molecular mass 1500, 1,2-propane diol) on viability in cell suspension of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* was studied. The cell suspensions were cooled in these temperature ranges with controlled (1 and 25 deg/min) and non-controlled (plunging into liquid nitrogen) rates. Application of controlled cooling rates in eutectic temperature range of the studied cryoprotectant solutions was shown to be prospective for increase the post-thaw viability of microorganisms. The highest indices of viability of *S. cerevisiae* and *E. coli* were obtained for the cooling rate of 25 deg/min. This tendency was kept for all the studied concentrations of cryoprotective agents (5, 10, 15, 20%). The findings are recommended to be considered when developing the freezing protocols for other biological specimens.

Key words: cryopreservation, microorganisms, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, eutectic temperature range, cooling rate.

Отдел долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах и микробиологии, отдел низкотемпературного консервирования, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-11, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: gladiolus_@mail.ru

Поступила 25.12.2012

Принята в печать 30.01.2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 15–25.
© 2013, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Long Term Storage of Biological Objects under Low Temperatures and Microbiology, Department of Low Temperature Preservation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 4111, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: gladiolus_@mail.ru

Received December, 25, 2012

Accepted January, 30, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 1. – P. 15–25.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Низкотемпературное консервирование клеток, тканей и органов позволяет сохранять их биологические свойства длительное время за счет торможения метаболических и физиологических процессов. Для эффективного криоконсервирования необходимо учитывать процессы, протекающие в биологических объектах при замораживании-оттаивании. Такие процессы связаны с фазовыми превращениями, происходящими в используемых при замораживании криопротекторных растворах. При разработке протоколов криоконсервирования основное внимание уделяется влиянию разных скоростей охлаждения на фазовый переход вода-лед, который является одним из основных повреждающих факторов. Чаще всего образцы охлаждаются с постоянной скоростью до температуры $-30 \dots -40^\circ\text{C}$, а затем погружают в жидкий азот, что приводит к неконтролируемым скоростям охлаждения в диапазоне температур от указанной температуры до температуры жидкого азота [12, 17, 21].

В ряде работ показано, что во время замораживания существует также механизм повреждения клеток, связанный с эвтектической кристаллизацией [2, 16, 18, 25].

В процессе замораживания клетки вытесняются фронтом кристаллизации в межкристаллические прослойки, которые в основном состоят из криопротекторного раствора [11, 19, 20], поэтому фазовый переход в прослойках оказывает влияние на жизнеспособность клеток после замораживания-оттаивания. Таким образом, изменением скорости охлаждения образца в температурном интервале эвтектической кристаллизации можно влиять на степень повреждения криоконсервируемого биообъекта.

Во многих исследованиях замораживание микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli* в интервале температур от комнатной до температуры жидкого азота проводили с постоянными скоростями охлаждения [13, 14, 23], т. е. скорость охлаждения биообъектов в температурных интервалах кристаллизации основной массы воды в образце и кристаллизации смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора была одинаковой. Исследования влияния скоростей охлаждения на жизнеспособность и функциональные характеристики клеток (микроорганизмов) *Saccharomyces cerevisiae* показали, что оптимальная постоянная скорость охлаждения составляла от 3 до 10 град/мин [22, 24].

При криоконсервировании биообъектов (клетки опухоли простаты крыс AT-1, *Saccharomyces cerevisiae*) было показано повреждающее действие эвтектической кристаллизации растворов NaCl и KCl [16, 22]. В то же время повреждения микроорга-

низкотемпературное консервирование клеток, тканей и органов позволяет сохранять их биологические свойства длительное время за счет ингибирования метаболических и физиологических процессов. Для эффективного криоконсервирования необходимо учитывать процессы, протекающие в биологических объектах во время замораживания-оттаивания. Эти процессы связаны с фазовыми переходами, происходящими в используемых для замораживания криопротекторных растворах. Разработка протоколов криоконсервирования сосредоточена на влиянии различных скоростей охлаждения на фазовый переход вода-лед, который является одним из основных повреждающих факторов. Обычно образцы охлаждаются с постоянной скоростью до $-30 \dots -40^\circ\text{C}$, после чего погружаются в жидкий азот, что приводит к неконтролируемым скоростям охлаждения в диапазоне температур от указанной температуры до температуры жидкого азота [12, 17, 21].

Несколько исследователей сообщили о существовании механизма повреждения клеток, связанного с эвтектической кристаллизацией во время замораживания [2, 16, 18, 25].

Во время замораживания клетки вытесняются фронтом кристаллизации в межкристаллические прослойки, которые в основном состоят из криопротекторного раствора [11, 19, 20], поэтому фазовый переход в прослойках оказывает влияние на жизнеспособность клеток во время замораживания-оттаивания. Таким образом, изменение скорости охлаждения образца в температурном интервале эвтектической кристаллизации может влиять на степень повреждения криоконсервируемого биообъекта.

Многие исследователи проводили замораживание *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli* микроорганизмов в интервале температур от комнатной до температуры жидкого азота с постоянными скоростями охлаждения [13, 14, 23], т. е. скорости охлаждения биообъектов в температурных интервалах кристаллизации основной массы воды в образце и кристаллизации смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора были одинаковыми. Исследования влияния скоростей охлаждения на жизнеспособность и функциональные характеристики клеток (микроорганизмов) *Saccharomyces cerevisiae* показали, что оптимальная постоянная скорость охлаждения составляла от 3 до 10 град/мин [22, 24].

Во время криоконсервирования биообъектов (клетки опухоли простаты крыс AT-1, *Saccharomyces cerevisiae*) было показано повреждающее действие эвтектической кристаллизации растворов NaCl и KCl [16, 22]. В то же время повреждения микроорга-

низкотемпературное консервирование клеток, тканей и органов позволяет сохранять их биологические свойства длительное время за счет ингибирования метаболических и физиологических процессов. Для эффективного криоконсервирования необходимо учитывать процессы, протекающие в биологических объектах во время замораживания-оттаивания. Эти процессы связаны с фазовыми переходами, происходящими в используемых для замораживания криопротекторных растворах. Разработка протоколов криоконсервирования сосредоточена на влиянии различных скоростей охлаждения на фазовый переход вода-лед, который является одним из основных повреждающих факторов. Обычно образцы охлаждаются с постоянной скоростью до $-30 \dots -40^\circ\text{C}$, после чего погружаются в жидкий азот, что приводит к неконтролируемым скоростям охлаждения в диапазоне температур от указанной температуры до температуры жидкого азота [12, 17, 21].



низмов, обусловленные кристаллизацией смеси эвтектической концентрации растворов криопротекторов, еще не изучены.

Цель работы – изучение влияния контролируемых скоростей охлаждения в области эвтектической температуры водных растворов криопротекторов: диметилсульфоксида (ДМСО), глицерина, полиэтиленоксида со средней молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500), 1,2-пропандиола (1,2-ПД) на жизнеспособность суспензий клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli*, суспендированных при различных исходных концентрациях указанных криопротекторов.

Использование клеток *S. cerevisiae* в качестве объекта исследования обусловлено тем, что, с одной стороны, эти клетки аналогичны по строению с клетками многих микроорганизмов, с другой – являясь низшими эукариотами, они имеют сходные с большинством эукариотических клеток разных видов внутриклеточные метаболические, генетические и сигнальные механизмы. Строение клеточной стенки и цитоплазматической мембраны у *E. coli* менее сложное, чем у дрожжей. Клеточная стенка этих бактерий состоит из двух слоев – пластичного и ригидного, содержащего два слоя пептидогликана [6]. Физико-химические факторы, действующие на клетки в процессе замораживания-оттаивания, могут разрушать связи между компонентами клеточной стенки, что делает этот объект интересным для криобиологических исследований.

Материалы и методы

Объекты исследования: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (раса 608, получена из Сп.ПО РНИИХП, Санкт-Петербург) и бактерии *Escherichia coli* B (штамм получен из ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва).

Дрожжи *S. cerevisiae* выращивали 48 ч при 30°C на агаризованной среде Сабуро, затем подращивали в жидкой среде Сабуро 24 ч с аэрацией. Бактерии *E. coli* выращивали в мясопептонном бульоне при 37°C с аэрацией 18 ч (начало стационарной фазы роста). Затем клетки осаждали центрифугированием (1500g, 15 мин) и ресуспендировали в водных растворах криопротекторов: ДМСО, глицерина, ПЭО-1500 и 1,2-ПД с концентрациями криопротекторного вещества 5, 10, 15 и 20% (об.). Концентрация клеток в полученных суспензиях составляла 10⁸ КОЕ/мл.

Микроорганизмы замораживали на программном замораживателе «Cryoson» (Германия), который прошел государственную метрологическую аттестацию в ННЦ «Институт метрологии» (аттестационное свидетельство №1895 от 26.03.2008 г.). Данный программный замораживатель позволяет варьировать скорость охлаждения в интервале 0,1–

suspended in the solutions with different initial concentrations of the mentioned cryoprotectants.

The use of *S. cerevisiae* cells as an object of investigation is preconditioned by the fact that on the one hand these cells are similar by structure with the cells of many microorganisms; on another hand, being a lower eukaryotes, they have intracellular metabolic, genetic and signal mechanisms similar to most eukaryotic cells of different types. The composition of a cell wall and cytoplasmic membrane in *E. coli* is less complex than in yeasts. Cell wall of these bacteria consists of two layers, plastic and rigid ones, containing two layers of peptidoglycan [6]. Physical and chemical factors affecting the cells during freeze-thawing can destruct the bonds between components of cell wall making the object interesting for cryobiological studies.

Materials and methods

The objects of research were *Saccharomyces cerevisiae* yeast (race 608 procured by Russian R&D Institute of Baking Industry, Saint-Petersburg, Russia) and *Escherichia coli* B bacteria (the strain was received from the State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow).

S. cerevisiae yeast were cultured for 48 hrs at 30°C with Sabouraud agar for 24 hrs with aeration. *E. coli* bacteria were cultured in meat-infused broth at 37°C with 18 hrs aeration (initiation of stationary growth phase). Afterwards the cells were centrifuged (1500g, 15 min) and re-suspended in cryoprotectant aqueous solutions: DMSO, glycerol, PEO-1500 and 1,2-PD with concentrations of cryoprotective substance of 5, 10, 15, 20% (v/v). Cell concentration in the obtained suspensions made 10⁸ CFUs/ml.

Microorganisms were frozen with programmable freezer Cryoson (Germany) which was metrologically certified at National Scientific Center Institute of Metrology (certification Nr 1895 dated of 26.03.2008). This programmable freezer allows to vary the cooling rate within 0.1–40 deg/min. Cooling regimens were set by the temperature of cooling flow in the chamber of programmable freezer. Freezing programs were recorded using the control sample with copper-constantan thermocouple connected to data plotter Endim 622.01 (Germany). The samples were frozen in polypropylene cryovials (Nunc, Germany) with an effective volume of 1.8×10⁻⁶ m³. Measuring thermocouple junction was located in geometric center of the control sample. Cell suspension of 1×10⁻⁶ m³ volume was poured into cryovials for further freezing.

The samples were frozen by three regimens involving the varying of cooling rate in the range of eutectic temperature of the corresponding cryoprotectant solution. To estimate the values of this temperature range we used the reported data on the temperature of eutectics T_{eut} of aqueous solutions of the studied

40 град/мин. Режимы охлаждения задавали по температуре охлаждающего потока в камере программного замораживателя. Программы замораживания регистрировали по эталонному образцу с помощью медь-константановой термопары и самописца «Endim 622.01» (Германия). Образцы замораживали в полипропиленовых криопробирках («Nunc», Германия) с рабочим объемом $1,8 \times 10^{-6} \text{ м}^3$. Измерительный спай термопары находился в геометрическом центре эталонного образца. Суспензию клеток объемом по $1 \times 10^{-6} \text{ м}^3$ разливали в криопробирки для последующего замораживания.

Образцы замораживали по трем режимам, предусматривающим варьирование скорости охлаждения в области эвтектической температуры соответствующего раствора криопротектора. При определении численных значений этой температурной области использовали известные из литературы данные о температуре эвтектики T_{eut} водных растворов рассматриваемых видов криопротекторов. Начало и конец области эвтектической температуры обозначали $T_{eut}^b = T_{eut} + 20^\circ\text{C}$ и $T_{eut}^e = T_{eut} - 20^\circ\text{C}$ соответственно.

В работе использовали следующие режимы замораживания.

Режим 1: от $20 \dots 22^\circ\text{C}$ до температуры T_{eut}^b образцы охлаждали со скоростью 2 град/мин, затем выдерживали их при температуре T_{eut}^e 5 мин и далее погружали в жидкий азот.

Режим 2: от $20 \dots 22^\circ\text{C}$ до температуры T_{eut}^b образцы охлаждали со скоростью 2 град/мин, выдерживали их при температуре T_{eut}^e 5 мин, в области эвтектической температуры соответствующего вида криопротектора (от T_{eut}^b до T_{eut}^e) скорость охлаждения составляла 0,5–1 град/мин, после чего образцы погружали в жидкий азот.

Режим 3: от $20 \dots 22^\circ\text{C}$ до температуры T_{eut}^b образцы охлаждали со скоростью 2 град/мин, выдерживали их при T_{eut}^e 5 мин, в области эвтектической температуры соответствующего вида криопротектора (от T_{eut}^b до T_{eut}^e) скорость охлаждения составляла 20–25 град/мин, после чего образцы погружали в жидкий азот.

Замороженные образцы оттаивали на водяной бане при 37°C при постоянном встряхивании до исчезновения твердой фазы, которое определяли визуально.

Жизнеспособность дрожжевых клеток *S. cerevisiae* и бактерий *E. coli* определяли чашечным методом Коха [3] по количеству макроколоний, сформировавшихся на агаризованных средах. Серийные разведения клеточных суспензий проводили в 0,9%-м водном растворе NaCl. Контролем были суспензии клеток в соответствующих средах консервирования, не подвергавшиеся замораживанию.

cryoprotectants. Onset and termination of eutectic temperature range were denoted as $T_{eut}^b = T_{eut} + 20^\circ\text{C}$ and $T_{eut}^e = T_{eut} - 20^\circ\text{C}$ respectively.

In the experiments we used the following freezing regimens.

Regimen 1: from $20 \dots 22^\circ\text{C}$ to the T_{eut}^b temperature the samples were cooled with the rate of 2 deg/min, then held at T_{eut}^e temperature for 5 min and plunged into liquid nitrogen.

Regimen 2: from $20 \dots 22^\circ\text{C}$ to the T_{eut}^b temperature the samples were cooled with the rate of 2 deg/min, then held at T_{eut}^e temperature for 5 min, in the range of eutectic temperature of the corresponding cryoprotectant type (from T_{eut}^b to T_{eut}^e) the cooling rate was 0.5–1 deg/min, thereafter the samples were plunged into liquid nitrogen.

Regimen 3: from $20 \dots 22^\circ\text{C}$ to the T_{eut}^b temperature the samples were cooled with the rate of 2 deg/min, then held at T_{eut}^e temperature for 5 min, in the range of eutectic temperature of corresponding cryoprotectant type (from T_{eut}^b to T_{eut}^e) the cooling rate was 20–25 deg/min, thereafter the samples were plunged into liquid nitrogen.

The frozen samples were thawed in water bath at 37°C with constant shaking until disappearing of solid phase which was visually determined.

Viability of *S. cerevisiae* yeast cells and *E. coli* bacteria was assessed with Koch's Plate method [3] by the number of macrocolonies formed in agar media. Serial dilutions of cell suspensions were performed in 0.9% aqueous NaCl solution. The control was the cell suspensions in the corresponding preservation media which were not exposed to freezing.

The used Koch's plate method is an integral one and characterizes the preservation of cell proliferative properties. Each macrocolony formed on the surface of medium is initiated by cells-descendants of single microbial cell. This is undoubted advantage *versus* other methods for assessment of cell viability based on testing the change in permeability of cell membranes and barrier function of microorganism wall, metabolic and synthetic processes, cell ultrastructure *etc.* Here-with the obtained data can be surely extrapolated for the experiments with other eukaryotic cells for which the cryopreservation regimens have not been developed yet.

The obtained results were statistically processed in MS Excel using Student's test [7] considering the differences as significant at $p < 0.05$. The data were presented as $M \pm m$, where M is a mean value derived in 6 similar experiments, m denotes a standard error.

Results and discussion

The selection of the studied cryoprotectant set is stipulated by their wide application for microorganisms cryopreservation.



Используемый чашечный метод Коха является интегральным и характеризует сохранение пролиферативных свойств клеток. Каждая макроколлония, сформировавшаяся на поверхности среды, образована дочерними клетками-потомками одной микробной клетки. Это является несомненным преимуществом перед другими методами оценки жизнеспособности клеток, основанными на тестировании изменения проницаемости клеточных мембран и барьерной функции стенки микроорганизмов, метаболических и синтетических процессов, ультраструктуры клеток и т. д. В связи с этим полученные данные можно с уверенностью экстраполировать на эксперименты с другими клетками эукариот, для которых до сих пор отсутствуют эффективные режимы криоконсервирования.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ MS Excel по методу Стьюдента [7], считая достоверными различия с показателем значимости $p < 0,05$. Данные представляли как $M \pm m$, где M – среднее значение, полученное в 6 аналогичных экспериментах, m – стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Выбор исследуемого ряда криопротекторов обусловлен тем, что они наиболее часто применяются для криоконсервирования микроорганизмов.

Отправной точкой для определения граничных значений области эвтектической температуры были известные из литературных источников значения эвтектической температуры T_{eut} водных растворов криопротекторов: ДМСО $T_{eut} = -66^\circ\text{C}$, 1,2-ПД $T_{eut} = -57^\circ\text{C}$, глицерина $T_{eut} = -46,5^\circ\text{C}$ [1, с. 91], полиэтиленоксидов в зависимости от молекулярной массы T_{eut} снижается от -11°C для ПЭО-900 до -14°C для ПЭО-2000 [8, с. 81]. В то же время известно [1, с. 78], что после завершения первичной кристаллизации, когда растворитель полностью вымораживается, наступает вторичная кристаллизация, тесно связанная с процессами эвтектической кристаллизации, при которой и растворенные вещества начинают затвердевать после достижения эвтектической температуры. Поскольку при криоконсервировании клеток используют сложные криоконсервирующие среды, содержащие соли, белки, органические молекулы и криопротекторы, эвтектическая зона этих веществ оказывается довольно размытой, и определить точку эвтектики очень трудно. В связи с этим вторичная кристаллизация, связанная с затвердеванием смесей эвтектического состава, в микроканальцах растягивается по температурной шкале.

Согласно экспериментальным данным, полученным методом термопластической деформации [4,

Starting point for estimating the boundary values of eutectic temperature range were known from the literature values of T_{eut} for cryoprotectant aqueous solutions: DMSO $T_{eut} = -66^\circ\text{C}$, 1,2-PD $T_{eut} = -46.5^\circ\text{C}$, for glycerol $T_{eut} = -46.5^\circ\text{C}$ [1, p. 91]; T_{eut} of polyethylenoxides depends on the molecular weight and decreases from -11°C for PEO-900 down to -14°C for PEO-2000 [8, p. 81]. At the same time it is known [1] that after completion of initial crystallization when the solvent entirely freezes-out, the secondary crystallization starts, which is tightly associated with eutectic crystallization during which the dissolved substances start to solidify after reaching the eutectic temperature. Whereas during cryopreservation of cells the complex cryopreservation media are used, the eutectic zone of these substances appears to be quite indistinct and the point of eutectics is hardly to determine. Due to this the secondary crystallization associated with the solidification of mixtures of eutectic composition in microchannels extends along the temperature scale.

According to the experimental data obtained by the method of thermoplastic deformation [4, 5] the extension of the studied temperature interval depending on the experimental conditions and cryoprotectant type could vary from 20 to 40 degrees. Thus the limits of onset and termination of eutectic temperature interval are as follows: $T_{eut}^b = T_{eut} + 20^\circ\text{C}$ and $T_{eut}^e = T_{eut} - 20^\circ\text{C}$, respectively.

Based on the above-mentioned and for convenient comparison of the obtained data the eutectic temperature intervals of the used cryoprotectant aqueous solutions were considered as: from -40 down to -86°C for DMSO; from -40 down to -77°C for 1,2-PD; from -30 down to -67°C for glycerol; and from -12 down to -55°C for PEO-1500.

Rate of cooling from the room temperature to the temperature of onset of the eutectic temperature interval T_{eut}^b of the corresponding cryoprotectant solution for all the used protocols of cooling made 2 deg/min. This rate provided the highest survival of some microorganisms [24]. Then the samples were held at T_{eut}^b for 5 min. Temporary stabilization is necessary to equilibrate the temperature of sample in eutectic temperature interval. After stabilization the samples were either plunged into liquid nitrogen (regimen 1) or underwent the following cooling with certain constant rate down to T_{eut}^e temperature and only then plunged into liquid nitrogen (regimens 2 and 3).

Thus, the cooling regimen 1 provided uncontrolled (UC) cooling rate in the investigated range from T_{eut}^b down to T_{eut}^e for all three types of cryoprotectant solutions independently of their concentrations while the regimens 2 and 3 guaranteed respectively low (1 deg/min) and high (20 deg/min) controlled cooling rates in this temperature range.



5], протяженность исследуемого нами температурного интервала в зависимости от условий эксперимента и вида криопротектора может варьировать от 20 до 40 градусов. Таким образом, границы начала и конца эвтектического температурного интервала: $T_{eut}^b = T_{eut} + 20^\circ\text{C}$ и $T_{eut}^e = T_{eut} - 20^\circ\text{C}$ соответственно.

С учетом вышеизложенного и для удобства сравнения полученных результатов эвтектические температурные интервалы используемых водных растворов криопротекторов были определены: от -40 до -86°C (ДМСО); от -40 до -77°C (1,2-ПД); от -30 до -67°C (глицерин); от -12 до -55°C (ПЭО-1500).

Скорость охлаждения от комнатной температуры до температуры начала эвтектического температурного интервала T_{eut}^b соответствующего раствора криопротектора для всех используемых нами протоколов охлаждения составляла 2 град/мин. Такая скорость охлаждения обеспечивает наиболее высокую сохранность ряда микроорганизмов [24]. Затем образцы выдерживали при температуре T_{eut}^b в течение 5 мин. Временная стабилизация необходима для выравнивания температуры образца по всему объему перед изменением скорости охлаждения в эвтектическом температурном интервале. После стабилизации образцы или погружали в жидкий азот (режим 1), или продолжали охлаждать с определенной постоянной скоростью до температуры T_{eut}^e и только тогда погружали в жидкий азот (режимы 2 и 3).

Таким образом, режим охлаждения 1 для всех трех видов растворов криопротекторов и выбранных значений их концентраций обеспечивал неконтролируемую (НК) скорость охлаждения в исследуемом диапазоне от T_{eut}^b до T_{eut}^e , в то время как режимы 2 и 3 гарантировали соответственно низкую (1 град/мин) и высокую (20 град/мин) контролируемые скорости охлаждения в этой области температур.

Данные по жизнеспособности микроорганизмов после криоконсервирования с водными растворами ДМСО, 1,2-ПД, глицерина и ПЭО-1500 различной концентрации согласно трем вышеописанным режимам охлаждения для клеток *S. cerevisiae* представлены на рис. 1.

Из рис. 1 видно, что для всех четырех видов водных растворов криопротекторов, применяемых для криоконсервирования клеток *S. cerevisiae*, замораживание согласно режиму 1, который предусматривает неконтролируемую скорость охлаждения после температуры T_{eut}^b , жизнеспособность клеток была достоверно ниже, чем при использовании режимов 2 и 3 с контролируемыми скоростями охлаждения в том же температурном интервале. При этом разница показателей жизнеспособности

The data on viability of microorganisms after cryopreservation in aqueous solutions of DMSO, 1,2-PD, glycerol and PEO-1500 of different concentrations according to three foregoing cooling regimens for *S. cerevisiae* cells are presented in Fig. 1.

Fig. 1 shows that for all four types of cryoprotectant aqueous solutions, applied for freeze-thawing of *S. cerevisiae* cells, the freezing by regimen 1 providing an uncontrolled cooling rate after T_{eut}^b temperature, the cell viability was significantly lower than the ones resulted after implementing regimens 2 and 3 with controlled cooling rates within the same temperature interval. Moreover, the differences in the indices of *S. cerevisiae* viability in the case of regimens 2 and 3, which differ by the value of controlled cooling rate within the eutectic temperature interval (low one for regimen 2 and high one for regimen 3) were less pronounced for aqueous solutions of DMSO and PEO-1500 than those for 1,2-PD and glycerol. At the same time, there was observed a stable tendency to increasing of *S. cerevisiae* cell viability when using high cooling rate (regimen 3) within the eutectic temperature range of certain cryoprotectant solution.

The data on viability of microorganisms after freeze-thawing in aqueous solutions of DMSO, 1,2-PD, glycerol and PEO-1500 of different concentration according to three regimens for *E. coli* cells are presented in Fig. 2.

Freeze-thawing of *E. coli* bacteria in aqueous solutions of DMSO and PEO-1500 (Fig. 2A and D) like in the case of *S. cerevisiae* using regimen 1 with uncontrolled cooling rates resulted in lower cell viability if compared with the controlled cooling rates (regimens 2 and 3) applied in the eutectic temperature range for certain cryoprotectant solution. Furthermore, the highest indices of viability were provided by high cooling rates applied in this temperature range (regimen 3).

Viability of *E. coli* cells after freeze-thawing in aqueous solutions of 1,2-PD and glycerol (Fig. 2B and C) significantly differed from the values obtained when using DMSO and PEO-1500 solutions as cryoprotective media. In this case the lowest indices of cell viability were obtained for low cooling rate in the eutectic temperature range (regimen 2), and the highest viability was reached when using high controlled cooling rate in the same temperature interval (regimen 3). Uncontrolled cooling rates applied after T_{eut}^b also reduced *E. coli* viability but these were still higher than those in case of regimen 2.

Using as an example the *S. cerevisiae* and *E. coli* microorganisms we have demonstrated that the application of controlled cooling rate of 20 deg/min within the eutectic temperature range for certain cryoprotectant solution allowed the obtaining of higher viability indices for microorganisms for all the studied cryoprotectant solutions independently of their concentra-



S. cerevisiae для режимов 2 и 3, которые отличались друг от друга величиной контролируемой скорости охлаждения в эвтектическом интервале температур (низкой для режима 2 и высокой для режима 3), для водных растворов ДМСО и ПЭО-1500 была менее выраженной, чем для 1,2-ПД и глицерина. В то же время наблюдается устойчивая тенденция к повышению жизнеспособности клеток *S. cerevisiae* при использовании высокой скорости охлаждения (режим 3) в области эвтектической температуры раствора криопротектора.

Данные по жизнеспособности микроорганизмов после криоконсервирования с водными растворами ДМСО, 1,2-ПД, глицерина и ПЭО-1500 различной концентрации согласно трем режимам охлаждения для клеток *E. coli* представлены на рис. 2.

При криоконсервировании бактерий *E. coli* с водными растворами ДМСО и ПЭО-1500 (рис. 2, А, D) как и *S. cerevisiae*, при использовании режима 1 с неконтролируемыми скоростями охлаждения жизнеспособность клеток меньше, чем при контролируемых скоростях охлаждения (режимы 2 и 3) в области эвтектической температуры раствора криопротектора. При этом наилучшие показатели жизнеспособности обеспечивали высокие скорости охлаждения в этой области температур (режим 3).

Жизнеспособность клеток *E. coli* при криоконсервировании с водными растворами 1,2-ПД и глицерином (рис. 2, В, С) существенно отличается от результатов, полученных при использовании в качестве криозащитных сред водных растворов ДМСО и ПЭО-1500. В этом случае наименьшие показатели жизнеспособности клеток получены для низкой скорости ох-

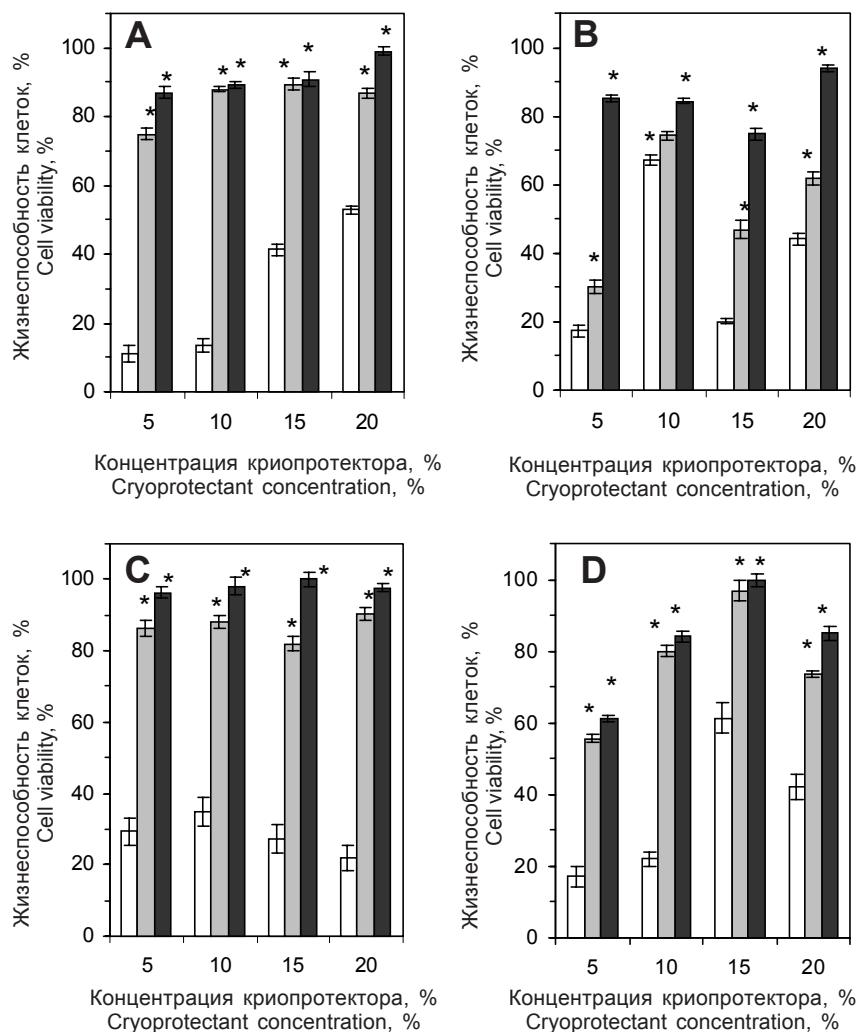


Рис. 1. Жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae* (% от контроля) после криоконсервирования с водными растворами криопротекторов ДМСО (А), 1,2-ПД (В), глицерина (С), ПЭО-1500 (D) различной концентрации (5, 10, 15 и 20%). Условия проведения эксперимента: □ – охлаждение до температуры начала эвтектического интервала T_{eut}^b с постоянной скоростью 2 град/мин с последующим погружением в жидкий азот (режим 1); ▒ – то же, но охлаждение в эвтектическом температурном интервале со скоростью 1 град/мин (режим 2); ■ – то же, но охлаждение в эвтектическом температурном интервале со скоростью 20 град/мин (режим 3). Представлены средние значения с учетом стандартных отклонений, вычисленных из 6 независимых определений. * – отличия статистически достоверны относительно показателей после замораживания согласно режиму 1, $p < 0,05$.

Fig. 1. Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells (% of the control) after cryopreservation in cryoprotectant aqueous solutions of DMSO (A), 1,2-PD (B), glycerol (C), PEO-1500 (D) in different concentrations (5, 10, 15 and 20%). Experimental conditions: □ – cooling down to the temperature of onset of eutectic interval T_{eut}^b with the constant rate of 2 deg/min with following plunging into liquid nitrogen (regimen 1); ▒ – the same conditions but with cooling in eutectic temperature interval with the rate of 1 deg/min (regimen 2); ■ – the same conditions but with cooling in eutectic temperature interval with the rate of 20 deg/min (regimen 3). The data represent the mean values with standard errors calculated from 6 independent equations. * – differences are statistically significant if compared to the indices after freezing according to the regimen 1, $p < 0.05$.

лаждения в области эвтектических температур (режим 2), а наилучшая жизнеспособность достигалась при высокой контролируемой скорости охлаждения в той же температурной области (режим 3). Неконтролируемые скорости охлаждения после T_{eut}^b также снижали жизнеспособность *E. coli*, но эти значения были выше, чем для режима 2.

На примере микроорганизмов *S. cerevisiae* и *E. coli* было показано, что применение контролируемой скорости охлаждения 20 град/мин в области эвтектической температуры раствора криопротектора позволяет получить более высокие показатели жизнеспособности микроорганизмов для растворов всех видов криопротекторов вне зависимости от их концентраций. По сравнению с теми режимами замораживания, в которых использовали неконтролируемую скорость охлаждения в указанном интервале температур, жизнеспособность увеличивалась в среднем в 2–3 раза для *S. cerevisiae* и в 1,5–2 раза для *E. coli*.

Таким образом, на жизнеспособность микроорганизмов при их криоконсервировании существенно влияют скорости охлаждения в области эвтектической температуры раствора криопротектора. При этом, как следует из экспериментальных данных, более предпочтительными оказываются высокие скорости охлаждения (порядка 20–25 град/мин) в области эвтектических температур. Следует отметить, что решающим фактором при определении наиболее эффективной контролируемой скорости охлаждения в области эвтектических температур является сочетание знания видовых особенностей строения микроорганизмов с выбором определенного раствора криопротектора. приме-

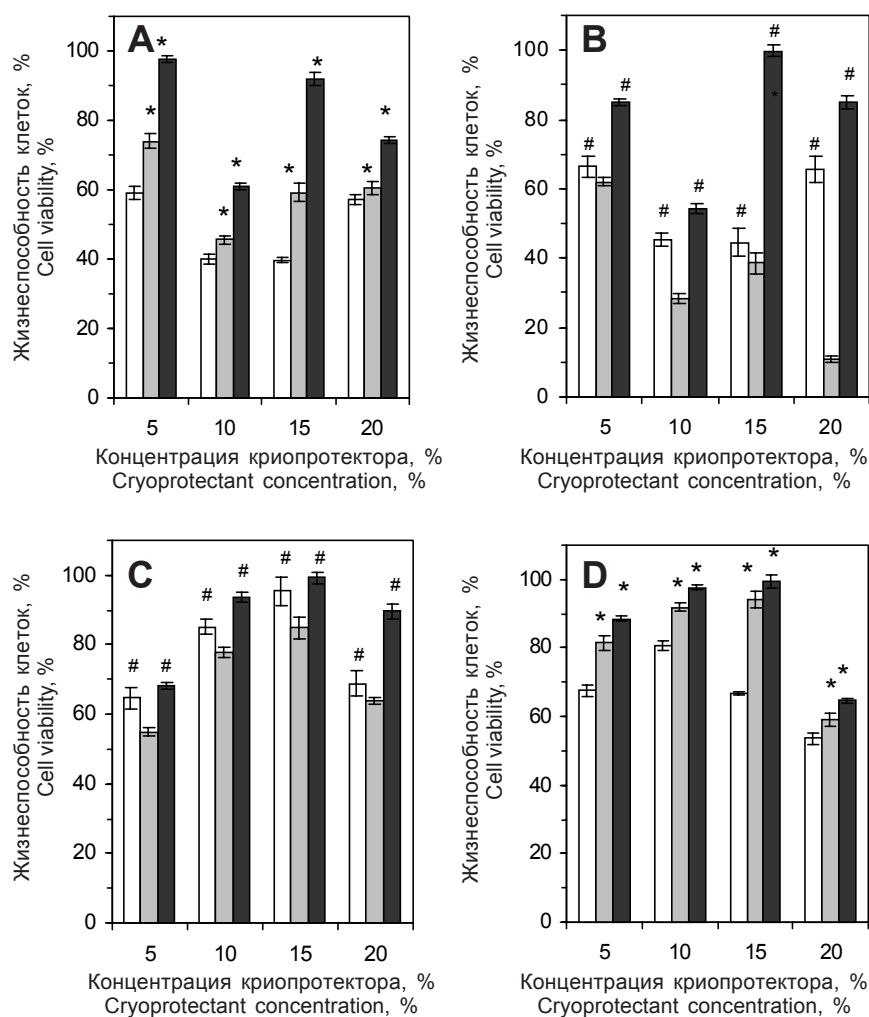


Рис. 2. Жизнеспособность клеток *Escherichia coli* (% от контроля) после криоконсервирования с водными растворами криопротекторов ДМСО (А), 1,2-ПД (В), глицерина (С), ПЭО-1500 (D) различной концентрации (5, 10, 15 и 20%). Условия проведения эксперимента: □ – охлаждение до температуры начала эвтектического интервала T_{eut}^b с постоянной скоростью 2 град/мин с последующим погружением в жидкий азот (режим 1); ■ – то же, но охлаждение в эвтектическом температурном интервале со скоростью 1 град/мин (режим 2); ■ – то же, но охлаждение в эвтектическом температурном интервале со скоростью 20 град/мин (режим 3). Представлены средние значения с учетом стандартных отклонений, вычисленных из 6 независимых определений. * – отличия статистически достоверны относительно показателей после замораживания согласно режиму 1; # – отличия статистически достоверны относительно показателей после замораживания согласно режиму 2, $p < 0,05$.

Fig. 2. Viability of *Escherichia coli* cells (% of the control) after cryopreservation in cryoprotectant aqueous solutions of DMSO (A), 1,2-PD (B), glycerol (C), PEO-1500 (D) in different concentrations (5, 10, 15 and 20%). Experimental conditions: □ – cooling down to the temperature of onset of eutectic interval T_{eut}^b with the constant rate of 2 deg/min with following plunging into liquid nitrogen (regimen 1); ■ – the same conditions but with cooling in eutectic temperature interval with the rate of 1 deg/min (regimen 2); ■ – the same conditions but with cooling in eutectic temperature interval with the rate of 20 deg/min (regimen 3). The data represent the mean values with standard errors calculated from 6 independent equations. * – differences are statistically significant if compared to the indices after freezing according to the regimen 1, # – differences are statistically significant if compared to the indices after freezing according to the regimen 2, $p < 0.05$.



ром такого сочетания может служить замораживание бактерий *E. coli* с водными растворами 1,2-ПД и глицерина, для которых более предпочтительными по показателям жизнеспособности являются высокие скорости охлаждения как контролируемые, так и неконтролируемые. Низкие скорости охлаждения (0,5–1 град/мин) в этом интервале температур дают наихудшие результаты по жизнеспособности. Это, по всей видимости, связано с особенностями строения микроорганизмов и обусловленной этими особенностями проницаемостью их цитоплазматических мембран для молекул воды и криопротекторов [9, 10].

Когда в качестве криоконсервирующей среды используется водный раствор криопротектора и для видов криопротекторов с известной температурой эвтектики, в первом приближении для определения температурного интервала кристаллизации смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора можно применять методику, описанную в данной статье. Если криоконсервирующая среда имеет более сложный состав и кроме кристаллизации смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора могут присутствовать и фазовые превращения, связанные с наличием других компонентов, необходимо использовать более сложные методики определения температурного интервала фазовых превращений для варьирования скоростей охлаждения с целью получения более высоких показателей сохранности криоконсервируемых биообъектов [15].

Выводы

Кристаллизация смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора на сегодняшний день является наименее изученным фазовым превращением как с точки зрения кинетики протекания процессов, так и их вклада в общее повреждение биообъектов при криоконсервировании.

В работе установлено, что скорость охлаждения в области эвтектической температуры раствора криопротектора оказывает влияние на конечные показатели жизнеспособности клеток микроорганизмов после их криоконсервирования. Причем это влияние имеет место при криоконсервировании *S. cerevisiae* и *E. coli* со всеми исследуемыми растворами криопротекторов (ДМСО, глицерин, ПЭО-1500, 1,2-ПД) вне зависимости от их концентраций. Выбор конкретной контролируемой скорости охлаждения в эвтектическом интервале температур зависит от вида консервируемого биологического материала. При определении наиболее эффективной контролируемой скорости охлаждения в области эвтектических температур решающим фактором является сочетание знаний видовых

Thus it can be concluded that post-thaw viability of microorganisms is significantly affected by cooling rates within the eutectic temperature range of certain cryoprotectant solution. Moreover, the experimental data evidently demonstrated that the most preferable ones were high cooling rates (of about 20–25 deg/min) within the eutectic temperature range. It is worth noting that an essential factor during determination of the most efficient controlled cooling rate within the eutectic temperature interval is the combination of knowledge about microorganism structure due to species peculiarities and the choice of proper cryoprotectant type. As an example of such combination could serve the freeze-thawing of *E. coli* bacteria in an aqueous solutions of 1,2-PD and glycerol for which both controlled and uncontrolled high cooling rates are more preferable judging by the indices of viability. Low cooling rates (0.5–1 deg/min) within this temperature range provide the worst results on viability. This is obviously associated with the peculiarities of microorganism structure and stipulated by these peculiarities permeability of their cytoplasmic membranes for molecules of water and cryoprotectants [9, 10].

If cryopreservation medium is the cryoprotectant aqueous solution it is possible to apply the method described in the paper for determining the crystallization temperature interval of cryoprotectant solution mixture of eutectic concentration in the first approximation for that cryoprotectants which eutectic temperature is known. If cryopreservation medium has more complicated composition and in addition to crystallization of cryoprotectant solution mixture of eutectic concentration the phase transitions associated with the presence of other components may exist, one should use more complicated methods for determining the temperature interval of phase transitions to vary the cooling rates aimed to obtain higher indices of post-thaw survival of biospecimens [15].

Conclusions

Nowadays, the crystallization of cryoprotectant solution mixture of eutectic concentration is a phase transition studied insufficiently both in terms of kinetics of processes and their contribution to the general injury of biospecimen during cryopreservation.

This study revealed that that the cooling rate within the eutectic temperature range of cryoprotectant solution affects a post-thaw viability of microbial cells. Moreover this impact was found during cryopreservation of *S. cerevisiae* and *E. coli* with all the studied cryoprotectant solutions (DMSO, glycerol, PEO-1500, 1,2-PD) independently on their concentrations. The choice of certain controlled cooling rate within the eutectic temperature interval depends on the type of biological specimen to be preserved. When determining

особенностей строения микроорганизмов с выбором определенного раствора криопротектора.

Более предпочтительными оказываются высокие скорости охлаждения (порядка 20–25 град/мин) в области эвтектической температуры раствора криопротектора. Низкие скорости охлаждения (0,5–1 град/мин) в этом интервале температур дают наихудшие результаты по жизнеспособности.

Данные, представленные в работе, необходимо учитывать при разработке протоколов криоконсервирования других видов микроорганизмов.

the most efficient controlled cooling rate in the range of eutectic temperatures a key factor is the combination of the knowledge about species peculiarities of microorganism structure and the choice of certain cryoprotectant solution.

More preferable cooling rates appeared to be the high ones (of about 20–25 deg/min) within the eutectic temperature range of certain cryoprotectant solution. Low cooling rates (0.5–1 deg/min) in this temperature range yield the lowest viability values.

The data presented in the paper should be considered when developing the cryopreservation protocols for other species of microorganisms.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.
2. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 144 с.
3. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пушино, 1990. – 186 с.
4. Осецкий А.И., Гурина Т.М. Исследование фазовых состояний замороженных растворов и биосистем методом термопластической деформации // Проблемы криобиологии. – 1992. – №2. – С. 24–29.
5. Осецкий А.И., Кирилук 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. 272–282.
6. Поздеев О. К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 768 с.
7. Приседский Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник. – Донецьк, 1999. – 210 с.
8. Пушкар Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. – Киев: Наук. думка, 1977. – 243 с.
9. Сакун О.В., Марущенко В.В., Коваленко І.Ф. та ін. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води та криопротекторів // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 1. – С.41–48.
10. Сакун О.В. Механізм кріопшкодження дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні у водному розчині диметилсульфоксиду з постійною швидкістю у контейнерах циліндричної форми // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №1. – С. 59–65.
11. 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.
12. Day J. G., Stacey G. N. Cryopreservation and freeze-drying protocols. – Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2007. – 348 p.
13. Dumont F., Marechal P. A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70, № 1. – P. 268–272.
14. Dumont F., Marechal P. A., Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, №1. – P. 33–42.
15. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kyryliuk A.L., Bozhok G.A. Developing protocol of testicular interstitial cell cryopreservation with consideration of determining temperature intervals for controlled cooling below -60°C // Cryobiology. – 2011. – Vol. 62, №2. – P. 107–114.

References

1. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 432 p.
2. Gordiyenko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low-temperature preservation of cell suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 144 p.
3. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods for assessment of microorganism viability. – Puschino, 1990. – 186 p.
4. Osetsky A.I., Gurina T.M. Study of phase states of frozen solutions and biosystems by method of thermoplastic deformation // Problems of Cryobiology. – 1992. – N2. – P. 24–29.
5. 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 close liquid phase inclusions // Problems of Cryobiology. – 2007. – Vol. 17, N3. – P. 272–282.
6. Pozdeev O.K. Medical microbiology / Ed. By V.I. Pokrovsky. – Moscow: GEOTAR-MED, 2001. – 768 p.
7. Prisedsky Yu.G. Statistical processing of biological experiments results: Textbook. – Donetsk, 1999. – 210 p.
8. Pushkar N.S., Belous A.M., Itkin Yu.A. Low-temperature crystallization in biological systems. – Kiev: Naukova Dumka, 1977. – 243 p.
9. Sakun O.V., Maruschenko V.V., Kovalenko I.F. et al. Temperature effect on membrane permeability coefficient of yeast-like fungi *Saccharomyces cerevisiae* for water and cryoprotectants // Problems of Cryobiology. – 2009. – Vol. 19, N1. – P. 41–48.
10. Sakun O.V. Cryoinjury mechanisms in the yeast fungi *Saccharomyces cerevisiae* during freezing in dimethyl sulfoxide aqueous solution at a constant rate in cylindrical containers // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N1. – P. 59–65.
11. 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.
12. Day J. G., Stacey G. N. Cryopreservation and freeze-drying protocols. – Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2007. – 348 p.
13. Dumont F., Marechal P. A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70, N 1. – P. 268–272.
14. Dumont F., Marechal P. A., Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46, N1. – P. 33–42.
15. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kyryliuk A.L., Bozhok G.A. Developing protocol of testicular interstitial cell cryopreservation with consideration of determining temperature intervals for controlled cooling below -60°C // Cryobiology. – 2011. – Vol. 62, N2. – P. 107–114.
16. Han B., Bischof J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48, N1. – P. 8–21.



16. Han B., Bischof J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing // *Cryobiology*. – 2004. – Vol. 48, №1. – P. 8–21.
17. Higgins A.Z., Cullen D.K., LaPlaca M.C., Karlsson J.O.M. Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // *J. Neurosci. Meth.* – 2011. – Vol. 201, №1. – P. 9–16.
18. Kristiansen J. Leakage of a trapped fluorescent marker from liposomes: effects of eutectic crystallization of NaCl and internal freezing // *Cryobiology*. – 1992. – Vol. 29, №5. – P. 575–584.
19. 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, №1. – P. 1–29.
20. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1984. – Vol. 247, №3. – P. 125–142.
21. Meryman H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice // *Transfusion*. – 2007. – Vol. 47, №5. – P. 935–945.
22. Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.J. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions // *Cryobiology*. – 1988. – Vol. 25, №5. – P. 471–482.
23. Seki S., Kleinhans F. W., Mazur P. Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58, №2. – P. 157–165.
24. Smentek P., Windisch S.Z. Frage des Überlebens von Helestämmen unter flüssigem Stickstoff // *Zbl. Bacteriol.* – 1982. – Vol. 3, №3. – S. 432–439.
25. Toscano W.M., Cravalho E.G., Silvares O.M., Huggins C.E. The thermodynamics of intracellular ice nucleation in the freezing of erythrocytes // *J. Heat Transfer*. – 1975. – Vol. 97, №3. – P. 326–332.
17. Higgins A.Z., Cullen D.K., LaPlaca M.C., Karlsson J.O.M. Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells // *J. Neurosci. Meth.* – 2011. – Vol. 201, №1. – P. 9–16.
18. Kristiansen J. Leakage of a trapped fluorescent marker from liposomes: effects of eutectic crystallization of NaCl and internal freezing // *Cryobiology*. – 1992. – Vol. 29, №5. – P. 575–584.
19. 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, №1. – P. 1–29.
20. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 1984. – Vol. 247, №3. – P. 125–142.
21. Meryman H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice // *Transfusion*. – 2007. – Vol. 47, №5. – P. 935–945.
22. Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.J. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions // *Cryobiology*. – 1988. – Vol. 25, №5. – P. 471–482.
23. Seki S., Kleinhans F. W., Mazur P. Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58, №2. – P. 157–165.
24. Smentek P., Windisch S. Z. Frage des Überlebens von Helestämmen unter flüssigem Stickstoff // *Zbl. Bacteriol.* – 1982. – Vol. 3, №3. – S. 432–439.
25. Toscano W.M., Cravalho E.G., Silvares O.M., Huggins C.E. The thermodynamics of intracellular ice nucleation in the freezing of erythrocytes // *J. Heat Transfer*. – 1975. – Vol. 97, №3. – P. 326–332.