

При переносе эритроцитов животных после деконсервирования в изотонический раствор NaCl при 37°C (модель трансфузии) наблюдаются достоверные отличия глубины повреждений криоконсервированных с ПЭО-1500 клеток от контрольной группы. Степень повреждений эритроцитов коня, быка, собаки составляет 32-36 % и увеличивается в течение суток до 50%. При переносе в изоосмотические условия замороженных и отогретых под защитой ДМСО клеток всех исследуемых животных достоверных различий от контроля в течение суток не наблюдается.

В другой серии экспериментов изучали показатели осмотической устойчивости, которые свидетельствуют об изменении эластичности плазматической мембраны. Индекс осмотической хрупкости, показывающий концентрацию NaCl, при которой происходит 50%-й гемолиз, для эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭО-1500, достоверно выше как в контрольной группе, так и в группе эритроцитов, замороженных под защитой ДМСО. При сравнении данного показателя контрольных и криоконсервированных с ДМСО эритроцитов значительных отличий не обнаружено.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что глицерин не эффективен для эритроцитов данных животных. ПЭО-1500 оказался более эффективным криопротектором, однако после деконсервирования в изоосмотических условиях клетки повреждаются, т. е. являются осмотически неустойчивыми. Наиболее эффективен (по исследуемым параметрам) для эритроцитов коня, быка, собаки ДМСО, который обеспечивает не только оптимальный уровень потери клеток после замораживания-отогрева, но и сохраняет их осмотическую устойчивость.

24 hrs up to 50%. When transferring frozen and thawed under DMSO protection cells for all studied animals into isoosmotic conditions no statistically significant differences in comparison with the control during 24 hrs were observed.

In other experiments there were studied the indices of osmotic resistance testifying to the change in plasma membrane elasticity. Osmotic fragility index indicating to NaCl concentration under which there is 50% hemolysis for the erythrocytes cryopreserved under PEO-1500 protection is statistically and significantly higher both in the control group and in that with the erythrocytes frozen under DMSO protection. No considerable differences were found when comparing this index for control and cryopreserved DMSO erythrocytes.

Thus basing on performed studies one can conclude about inefficiency of glycerol for erythrocytes of mentioned animals. Animal erythrocytes are preserved after cryopreservation with PEO-1500, but after thawing under isoosmotic conditions the cells are damaged, that is they are osmotically non-resistant. DMSO was occurred to be the most efficient (on the studied parameters) for equine, bovine, canine erythrocytes. It provides not only optimal level of cell loss after freeze-thawing but also keeps their osmotic resistance.

## **Возможности криоконсервирования биообъекта на основе ускоренных режимов замораживания**

А.Г. Мищенко, А.В. Горбунов

*Институт животноводства УААН, г. Харьков*

## **Possibilities for Bioobject Cryopreservation Basing on Accelerated Regimens of Freezing**

A.G. MISHCHENKO, L.V. GORBUNOV

*Cattle Breeding Institute of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov*

Рассмотрены подходы к созданию безальтернативного способа криоконсервирования биологического материала, основанного на применении ускоренных режимов замораживания. Показано, что при традиционных способах криоконсервирования спермиев животных, с учетом выделения скрытой теплоты кристаллизации, величина средневзвешенного ускорения может изменяться от +927 до  $-1200^{\circ}\text{C}/\text{мин}^2$ . С помощью математического моделирования определена возможность создания устройства, позволяющего реализовывать различные режимы замораживания, отличающиеся не только по скорости, но и ускорению. Проведен анализ существующих моделей теплообмена, выбрана одна из них (Г. Джеффрис, Б. Свирлз, 1970), наиболее адекватно описывающая процесс пассивного охлаждения термоблока в горловине сосуда Дьюара.

Approaches to creating an alternative-free way for biological material cryopreservation, based on applying accelerated freezing regimens were considered. When applying traditional ways for animal spermatozoa cryopreservation, taking into account the release of hidden crystallisation heat, the value of weight-average acceleration was shown as capable to change from +927 to  $-1200^{\circ}\text{C}/\text{min}^2$ . Using mathematical modelling a possibility to create the device, enabling realisation of various freezing regimens, differing both by rate and acceleration, was determined. The existing models of heat exchange were analysed and one of them (G. Jeffrys, B. Swirls, 1970), most adequately describing the process of thermoblock passive cooling in Dewar vessel neck, was chosen.

Basing on heat exchange model the optimal device parameters to freeze meristematic cells of cultivated plants

На основе модели теплообмена определены оптимальные параметры устройства для замораживания меристемальных клеток культурных растений со скоростями  $0,01 \div 4^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Устройство для криоконсервирования биологических объектов растительного и животного происхождения состоит из сосуда Дьюара и термоблока, который установлен в его горловине и может изменять глубину погружения относительно верхнего края горловины. Термоблок изготовлен в форме цилиндра из нержавеющей стали, имеет пустотелую оболочку, дополнительные отверстия, что позволяет реализовать широкий диапазон скоростей ( $10 \div 50^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) и ускорений ( $+1000 \div -2000^\circ\text{C}/\text{мин}^2$ ) процесса замораживания с минимальным градиентом температуры  $1^\circ\text{C}/\text{см}$  по оси внутренней части термоблока. Масса термоблока относительно мала ( $\approx 0,2$  кг), что позволяет экономно расходовать хладагент при замораживании ( $\approx 0,07$  кг). Применение данного устройства на основе транспортного сосуда Дьюара X-5 создает возможность осуществления процесса замораживания биообъекта как в лабораторных, так и полевых условиях.

Таким образом, разработанное устройство обеспечивает оптимальный режим замораживания биообъекта за счет вариации характера скорости охлаждения изменением давления воздуха ( $0,01 \div 3$  атм) между стенками термоблока в горловине сосудов Дьюара X-5, X-34 и X-35.

with  $0,01 \div 4^\circ\text{C}/\text{min}$  were determined. Device for cryopreservation of biological objects of plant and animal origin consists of Dewar vessel and thermoblock, which is mounted in its neck and can change the immersion depth towards an upper neck edge. Thermoblock is manufactured in stainless steel cylinder-like form, it has a hollow case and additional holes, allowing to realise a wide range of rates ( $10 \div 50^\circ\text{C}/\text{min}$ ) and accelerations ( $1000-2000^\circ\text{C}/\text{min}^2$ ) of freezing process with  $1^\circ\text{C}/\text{cm}$  temperature gradient by thermoblock internal part axis. Thermoblock weight is relatively low ( $\approx 0.2$  kg), that enables economical consumption of cool agent during freezing ( $\approx 0.07\text{kg}$ ). Application of this device basing on X-5 Dewar vessel provides the possibility to realise cooling process of biological material under both laboratory and field conditions.

Thus, the designed device provides an optimal regimen for bioobject freezing due to varying the character of cooling rate by changing air pressure ( $0.01 \div 3$  atm) between thermoblock walls in Dewar vessel neck: X-5, X-34 and X-35.

## Криоконсервирование культуры эмбриональных фибробластов человека.

В.В. Парфенова, Т.Ф. Петренко, Н.А. Волкова, Е.И. Гончарук  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cryopreservation of Human Embryonic Fibroblast Culture

V.V. PАРFENOVA, T.F. PЕТRЕНKO, N.A. VОLKOVA, E.I. GONCHARUK  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В криобиологической практике для криоконсервирования эмбриональных клеток и тканей наиболее широко применяется диметилсульфоксид (ДМСО), который наряду с защитными свойствами проявляет токсическое действие на клетки, что требует его удаления из среды после оттаивания.

В то же время такие криопротекторы, как 1,2-пропанediол (1,2-ПД) и оксиэтилированный глицерин (ОЭГ) в небольших концентрациях не оказывают токсического действия на клетки и могут быть использованы для их криоконсервирования.

Цель работы – изучение криозащитных свойств ОЭГ, 1,2-ПД и эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота. Исследования были проведены на клетках 5-го пассажа культуры эмбриональных фибробластов человека. Контролем служили пробы, замороженные под защитой 10%-го раствора ДМСО. При этом сохранилось  $87,8 \pm 3,3\%$  жизнеспособных клеток. При культивировании отогретых образцов отмечали активную пролиферацию клеток с образованием монослоя на 4-5-е сутки.

Установлено, что при замораживании клеток под защитой 5%-го раствора 1,2-ПД количество жизнеспособных

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is the most widely applied in cryobiology for embryonic cell and tissue cryopreservation. But along with its high protective properties it is toxic for cells and requires to be removed out of cryopreservation medium after sample thawing.

At the same time such cryoprotectants as 1,2-propanediol (1,2-PD) and oxyethylated glycerol (OEG) in low concentrations do not cause a toxic effect on cells and can be used for human embryonic fibroblast culture cryopreservation.

The work was aimed to studying cryoprotective properties of OEG, 1,2-PD and cattle embryonic serum (ES). Research was carried-out in the 5<sup>th</sup> passage human embryonic fibroblast culture cells. Samples, frozen under 10% DMSO protection were the control. At the same time  $87.8 \pm 3.3\%$  of viable cells were kept. Herewith  $87.7 \pm 3.3\%$  viable cells were kept. When culturing thawed samples an active cell proliferation with monolayer formation to 4-5th day was noted.

During cell freezing under 5% 1,2-PD protection the amount of viable cells was established to make  $87.0 \pm 3.5\%$ . An increase in 1,2-PD concentration in freezing medium up