

## Криозащитная эффективность ряда криопротекторов в зависимости от скорости охлаждения

UDC 577.352.4:612.111.085:547.42

N.A. CHERNOBAI\*, T.M. GURINA, A.V. PAKHOMOV

## Cryoprotective Efficiency of Some Cryoprotectants Depending on Cooling Rate

Получены данные по сохранности клеток интерстиция тестисов крыс после замораживания-отогрева с использованием скоростей охлаждения 1; 5 и 10 град/мин и растворов глицерина (7%), диметилсульфоксида (10%), этиленгликоля (7%) и диметилформамида (5%). Установлено, что глицерин обеспечивает достаточно высокую (до 75%) сохранность клеток при всех использованных скоростях замораживания. При применении других криопротекторов значения сохранности клеток повышались (от 56 до 83%) с увеличением скорости охлаждения от 1 до 10 град/мин. Показано, что охлаждение со скоростями около 10 град/мин может обеспечивать достаточно высокую сохранность клеток интерстиция тестисов после замораживания-отогрева.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, скорость охлаждения, клетки интерстиция тестисов, проницаемость, криопротекторы.

Отримано дані щодо збереженості клітин інтерстиція тестисів щурів після заморожування-відігрівання з використанням швидкостей охолодження 1; 5 та 10 град/хв та розчинів гліцерину (7%), диметилсульфоксиду (10%), етиленгліколю (7%) та диметилформаміду (5%). Встановлено, що гліцерин забезпечує достатньо високу (до 75%) збереженість клітин під час використання всіх швидкостей заморожування. При застосуванні інших криопротекторів збереженість клітин зростала (від 56 до 83%) при збільшенні швидкості заморожування від 1 до 10 град/хв. Показано, що охолодження зі швидкостями близько 10 град/хв може забезпечити достатньо високий рівень збереженості клітин інтерстиція тестисів після заморожування-відігрівання.

**Ключові слова:** криоконсервування, швидкість охолодження, клітини інтерстиція тестисів, проникність, криопротектори.

The survival of testes interstitial cells after freeze-thawing using the cooling rates of 1; 5 and 10 deg/min and glycerol (7%), dimethyl sulfoxide (10%), ethylene glycol (7%) and dimethyl formamide (5%) solutions has been estimated. Using of glycerol provided sufficiently high (up to 75%) cell survival under all the studied cooling rates. Cell survival increased (from 56% upto 83%) if cooling rates were elevated from 1 up to 10 deg/min in the case of other cryoprotectants. Cooling rates about 10 deg/min provided sufficiently high level of post-thaw cell survival.

**Key words:** cryopreservation, cooling rate, testes interstitial cells, permeability, cryoprotectants.

На сегодняшний день низкотемпературное консервирование – единственно доступный способ долгосрочного хранения клеток, в том числе гормонально-активных. Разработка научно обоснованных способов криоконсервирования возможна с учетом процессов массообмена в системе “клетка-окружающая среда” на разных этапах криоконсервирования. Фазовый переход “вода-лед”, являющийся неотъемлемым этапом технологического процесса низкотемпературного консервирования биологических объектов, обуславливает возникновение целой цепочки повреждающих факторов, к которым, прежде всего, следует отнести дегидратацию и внутриклеточную кристаллизацию. Оптимальная скорость охлаждения, специфичная для конкретного типа клеток, обеспечивает баланс трансмембранного массообмена “клетка-окружающая сре-

To date, low-temperature preservation is the only method for long-term storage of cells, including hormonally active ones. Development of fundamentally attested methods of cryopreservation is possible when considering the mass transfer processes in the system “cell-environment” at different stages of cryopreservation. “Water-ice” phase transition, being an essential step in the process of low temperature preservation of biological objects, causes the appearance of variety of damaging factors, which primarily include dehydration and intracellular crystallization. The optimal cooling rate is specific to a particular cell type, and provides an equilibrium transmembrane mass transfer between cell and environment, resulting in dehydration of cells, which, on the one hand, is sufficient to eliminate the possibility of intracellular ice formation, on the other hand it does not reach the critical level of fatal

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:  
nadiia\_chernobai@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373  
3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: nadiia\_chernobai@mail.ru

да”, в результате которого обезвоживание клеток, с одной стороны, является достаточным, чтобы исключить вероятность внутриклеточного льдообразования, а с другой – не достигает критического уровня, чтобы привести к неизбежному повреждению клеток. Существенную роль в этом процессе играют особенности строения плазматических мембран клеток, лимитирующих водный поток.

Цель работы – оценить влияние скоростей охлаждения на сохранность клеток интерстиция тестисов при использовании в качестве криопротекторов растворы глицерина, диметилсульфоксида (ДМСО), этиленгликоля (ЭГ) и диметилформамида (ДМФА), проникающая способность которых изучена [7].

### Материалы и методы

Объектом исследований были клетки ткани семенников крыс, полученные ферментативным методом [6]. Суспензии включали клетки диаметром 4,21–21 мкм. Наиболее многочисленной была популяция клеток размерами 11–16 мкм, на которых проводили исследования.

В работе использовали растворы глицерина, ДМСО, ЭГ и ДМФА, приготовленные на среде 199 с 20 мМ Hepes.

Исследовали сохранность клеток интерстиция тестисов после их 30-минутной экспозиции при температуре 20°C в растворах криопротекторов 5; 7; 10 и 15%-х концентраций. На основании этих исследований подбирали оптимальные концентрации криопротекторов для криоконсервирования, которые существенно не снижали их сохранность.

Жизнеспособность клеток до и после замораживания-отогрева контролировали методом суправитального окрашивания с использованием 0,2%-го водного раствора трипанового синего [3].

Количество жизнеспособных клеток определяли по формуле:

$$W = \frac{\sum_{окр}}{\sum_{общ}} \times 100\%,$$

где  $\sum_{окр}$  – количество окрашенных клеток;  $\sum_{общ}$  – общее количество клеток.

Для оценки влияния на клетки экспозиции с криопротекторами и замораживания-отогрева был введен относительный показатель сохранности, определяемый из соотношения:

$$N = \frac{W_1}{W_0} \times 100\%,$$

cell damage. An important role in this process is played by structural features of cell plasma membrane, limiting the water flow.

The aim of the study was to assess the effect of cooling rate on the survival of testes interstitial cells when using the cryoprotectant solutions of glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and dimethyl formamide (DMFA), which permeability was studied earlier [7].

### Materials and methods

The investigations were carried-out in rat testes cells isolated by enzymatic method [6]. Suspensions comprised the cells of 4.21–21  $\mu\text{m}$  diameter. The most part made the population of cells of 11–16  $\mu\text{m}$ , and these cells were used in the study.

In this work we used solutions of glycerol, DMSO, DMFA, ethylene glycol prepared with 199 medium supplemented with 20 mM Hepes.

We investigated the survival of testes interstitial cells after 30 minutes of exposure at 20°C in cryoprotectant solutions of 5, 7, 10, and 15%. Basing on these studies we selected the optimal concentrations of cryoprotectants for freeze-thawing, which did not significantly reduced the cell survival.

The viability of cells before and after freeze-thawing was assessed using supravital staining with 0.2% aqueous solution of trypan blue [3].

The number of viable cells was determined by the formula:

$$W = \frac{\sum_{stained}}{\sum_{total}} \times 100\%,$$

where  $\sum_{stained}$  is the number of stained cells;  $\sum_{total}$  is total number of cells.

To assess the effect of exposure with cryoprotectants and freeze-thawing on the cells we introduced a relative index of survival calculated with the following relation:

$$N = \frac{W_1}{W_0} \times 100\%,$$

where  $W_0$  and  $W_1$  are viabilities of cells before and after the effect (exposure with cryoprotectant solution of freeze-thawing), correspondingly.

Before freeze-thawing the solutions of cryoprotectants were added to cell suspension in a 1:1 ratio to get the required final concentration. After that the samples of 1 ml were incubated during 5 min at 20°C, and cooled in the programmable freezer Cryoson (Germany) in cryotubes (Nunc, USA) of 1.8 ml using constant

где  $W_0$  и  $W_1$  – количество жизнеспособных клеток до и после воздействия (экспозиция в растворе криопротектора или после замораживания-отогрева) соответственно.

При криоконсервировании растворы криопротекторов добавляли к клеточной суспензии в соотношении 1:1 для получения необходимой конечной концентрации. Затем полученные образцы объемом 1 мл инкубировали в течение 5 мин при температуре 20°C, замораживали на программном замораживателе “Cryoson” (Германия) в криоампулах (“Nunc”, США) объемом 1,8 мл с постоянными скоростями охлаждения 1; 5 или 10 град/мин до –40°C и затем контейнер с образцами погружали в жидкий азот для хранения.

После хранения в течение недели образцы отогревали на водяной бане при 32...34°C. Криопротектор удаляли трехкратным центрифугированием клеток интерстиция тестисов (1500 об/мин в течение 3 мин), используя среду 199 с 20 мМ Hepes. Далее определяли относительный показатель сохранности клеток после замораживания-отогрева.

Используя модифицированную физико-математическую модель Кедем-Качальского [1], описали осмотическое поведение изолированных клеток на основных этапах замораживания-отогрева. В качестве транспортных характеристик клеток в данной модели используются коэффициенты проницаемости для воды ( $L_p$ ) и криопротектора ( $K_p$ ), а наиболее существенных геометрических параметров – поверхностно-объемное отношение клетки ( $\gamma=S_0/V_0$ ) и относительный осмотически неактивный объем ( $\alpha=V_\alpha/V_0$ , где  $V_\alpha$  – объем дегидратированной клетки;  $V_0$  – объем интактной клетки), определенные нами ранее [7, 8]. Решениями модели при известных значениях  $L_p$  и  $K_p$  являются: зависимости  $y(T)$ ,  $\pi_1^{in}(T)$  и  $\pi_2^{in}(T)$ , где  $y$  – относительный объем клетки;  $\pi_1^{in}$  и  $\pi_2^{in}$  – осмотическое давление первого и второго растворенного вещества внутри клетки соответственно.

Кинетику изменения концентрации  $C$  внеклеточного раствора в процессе замораживания задавали при расчетах аналитически, путем аппроксимации фазовой диаграммы плавления водных растворов исследуемых криопротекторов [1] в следующем виде:

$$C = -9,7664 \times 10^{-3} T^2 + 3,8264 T - 313,4059 - \text{ЭГ};$$

$$C = -26,1 \times 10^{-3} T^2 + 12,608 T - 1496,8 - \text{глицерина};$$

$$C = -14 \times 10^{-3} T^2 + 5,86 T - 550,77 - \text{ДМСО};$$

$$C = -0,238 \times 10^{-3} T^3 + 0,1519 T^2 - 32,4425 T + 2376,471 - \text{ДМФА},$$

где  $T$  – текущая температура.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

cooling rates of 1, 5 or 10 deg/min down to –40°C and then the container with the samples were plunged into liquid nitrogen for storage.

After one-week storage the samples were warmed in a water bath at 32...34°C. Cryoprotectant was removed by triple centrifugation of testes interstitial cells (1500 rpm for 3 min), using medium 199 with 20 mM Hepes. Then, a relative index of post-thaw cell survival was determined.

Applying the modified physical-mathematical model of Kedem-Kachalsky [1], we described the osmotic behavior of isolated cells at key stages of freeze-thawing process. The following transport parameters of the cells are used in this model: the coefficients of permeability for water ( $L_p$ ) and cryoprotectant ( $K_p$ ), as well as the most significant geometrical parameters: cell surface-to-volume ratio ( $\gamma=S_0/V_0$ ) and relative osmotically inactive volume ( $\alpha=V_\alpha/V_0$ , where  $V_\alpha$  is the volume of dehydrated cell;  $V_0$  is volume of intact cell, found by us earlier [7, 8]. If the values  $L_p$  and  $K_p$  are known the solutions of this model are the dependencies  $y(T)$ ,  $\pi_1^{in}(T)$  and  $\pi_2^{in}(T)$  temperature, where  $y$  is the relative cell volume;  $\pi_1^{in}$  and  $\pi_2^{in}$  are the osmotic pressures of the first and second solute inside the cell, correspondingly

The kinetics of the changes in concentration of extracellular solution during freezing in the calculations was set analytically by approximating the phase diagram of melting of aqueous solutions of the studied cryoprotectants [1] as follows:

$$C = -9.7664 \times 10^{-3} T^2 + 3.8264 T - 313.4059 - \text{EG};$$

$$C = -26.1 \times 10^{-3} T^2 + 12.608 T - 1496.8 - \text{glycerol};$$

$$C = -14 \times 10^{-3} T^2 + 5.86 T - 550.77 - \text{DMSO};$$

$$C = -0.238 \times 10^{-3} T^3 + 0.1519 T^2 - 32.4425 T + 2376.471 - \text{DMFA},$$

where  $T$  is the current temperature.

Statistical processing of experimental data was performed by the Student-Fisher's method.

## Results and discussion

It was found that exposure of testes interstitium cells in the solutions of cryoprotectants led to an increase of number of damaged cells. After 30 min incubation in 5% solutions of studied substances the survival of cell slightly decreased (by 2–8%) comparing to the control, in the case of 7% cryoprotectant solutions under the same conditions, the survival decreased by 7–14%. The most significant damage was observed in 10 and 15% solutions of studied cryoprotectants, the number of damaged cells increased by 10–20% (Fig. 1).

Analysis of the obtained data on the survival of testes interstitial cells after exposure in solutions of glycerol, ethylene glycol and DMFA of various concentrations allowed to conclude that the maximum concentrations of cryoprotectants, which do not significantly

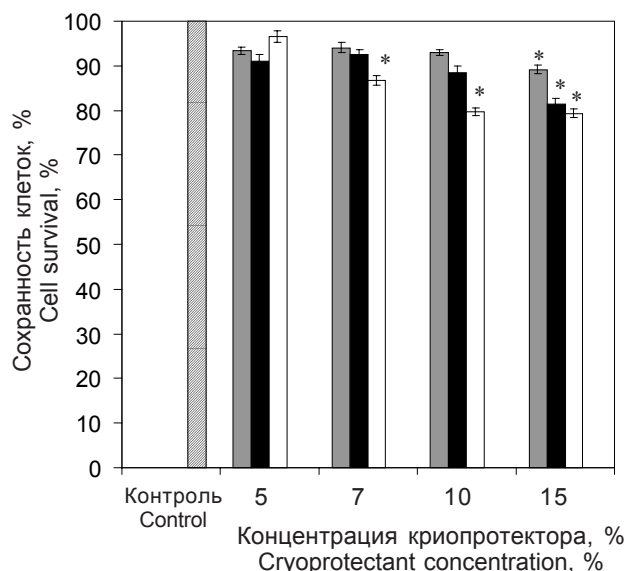
## Результаты и обсуждение

Установлено, что после экспозиции клеток интерстиция тестисов с растворами криопротекторов количество поврежденных клеток достоверно увеличивалось. После 30-минутной инкубации с 5%-ми растворами исследуемых веществ сохранность клеток незначительно снижалась (на 2–8%) по сравнению с контролем, при использовании 7%-х растворов криопротекторов при тех же условиях сохранность уменьшалась на 7–14%. Наибольшее повреждающее действие оказали 10 и 15%-е растворы исследуемых криопротекторов, количество поврежденных клеток увеличивалось на 10–20% (рис. 1). Анализируя полученные данные о сохранности клеток интерстиция тестисов после экспозиции в растворах глицерина, ЭГ и ДМФА различных концентраций, мы пришли к заключению, что максимальные концентрации криопротекторов, которые существенно не снижают сохранность, для ДМФА – 5%, для ЭГ и глицерина – 7%. При дальнейших экспериментах применяли эти концентрации. Концентрация ДМСО 10% была выбрана с учетом данных предыдущих исследований [4, 5].

На рис. 2 показана зависимость сохранности клеток интерстиция тестисов от скорости замораживания с различными криопротекторами. Из приведенных данных видно, что глицерин обеспечивает достаточно высокую (до 75%) сохранность клеток после замораживания со скоростями 1; 5 и 10 град/мин. Замораживание с применением растворов ДМСО и ЭГ со скоростью 1 град/мин обеспечивало сохранность клеток интерстиция тестисов до 59%. С увеличением скорости охлаждения до 5÷10 град/мин сохранность в среднем повышалась до 72%.

Наиболее высокие значения сохранности (83%) были получены после охлаждения клеток со скоростью 10 град/мин с использованием ДМФА. При снижении скорости охлаждения до 1 град/мин сохранность клеток уменьшалась до 56%. Используя данные работы [8], можно предположить, что более низкая сохранность клеток интерстиция тестисов после замораживания-оттаивания в присутствии ДМФА при медленном охлаждении обусловлена чрезвычайно высокой проникающей способностью ( $K_1 = 24,45 \times 10^{-7}$  м/с при температуре 20°C) этого вещества через мембраны клеток интерстиция тестисов, что могло стать причиной дополнительного поступления криопротектора в клетки еще на этапе охлаждения.

Исследование влияния замораживания при высокой скорости охлаждения (85–100 град/мин) в присутствии 10% ДМСО на сохранность органотипической культуры семенников после отогрева [2] показало, что быстрое охлаждение может при-



**Рис. 1.** Сохранность клеток интерстиция тестисов после 30-минутной экспозиции (при 20°C) клеточной суспензии с растворами криопротекторов различных концентраций: ■ – глицерина; ▒ – ЭГ; □ – ДМФА; \* – различия достоверны по отношению к значениям сохранности при 5%-й концентрации соответствующего криопротектора ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Testes interstitium cell survival after 30 min exposure (at 20°C) of cell suspension with cryoprotectant solutions of various concentrations: ■ – glycerol; ▒ – EG; □ – DMFA; \* – the differences are statistically significant comparing to the data of survival at 5% concentration of corresponding cryoprotectant ( $p < 0.05$ ).

reduce the cell survival are: 5% for DMFA, and 7% for ethylene glycol and glycerol. In further experiments these concentrations were used. The concentration of DMSO of 10% was chosen based on previous studies [4, 5].

Fig. 2 represents the data on survival of testes interstitial cells in dependence of cooling rates and types of cryoprotectant. The data show that glycerol provides quite a high survival (75%) of cells after cooling with rates of 1, 5 and 10 deg/min. Freezing with DMSO and EG solutions using cooling rate of 1 deg/min resulted in the survival of testes interstitial cells of 59%. Increasing of cooling rate up to 5÷10 deg/min led to a rise up to 72% in average.

The highest values of cell survival (83%) were obtained using cooling rate of 10 deg/min and DMFA solution. Reducing of the cooling rate down to 1 deg/min led to a decrease in cell survival down to 56%. Using our recent data [8], we can assume that the lower survival of testes interstitial cells after freeze-thawing in the presence of DMFA and slow cooling is due to the extremely high permeability ( $K_1 = 24.45 \times 10^{-7}$  m/s at 20°C) of this substance through testes interstitial cell membranes that could cause additional entry of the cryoprotectant into the cells already at the stage of cooling.

водить к внутриклеточной кристаллизации за счет недостаточной дегидратации клеток в процессе охлаждения. Оптимальной же скоростью, не приводящей к значительному снижению сохранности клеток после замораживания-оттаивания, по мнению автора, является скорость охлаждения 5 град/мин.

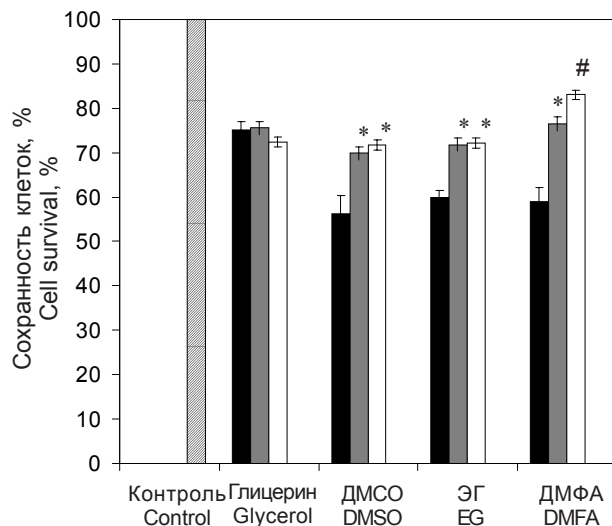
Полученные данные свидетельствуют, что при оценке криозащитных свойств криопротекторов варьирование скоростей охлаждения может показать, какой из них является более эффективным. Мембраны клеток интерстиция тестисов так же хорошо проницаемы для глицерина, как и для ЭГ и ДМСО [8], вместе с тем, если для ЭГ и ДМСО предпочтительным оказалось более быстрое охлаждение, то при использовании глицерина достоверных различий влияния скорости охлаждения в диапазоне 1÷10 град/мин на сохранность клеток интерстиция тестисов нами не выявлено. Для ДМФА более эффективными оказались скорости охлаждения образцов 5 и 10 град/мин.

Успех криоконсервирования во многом определяется осмотическим поведением клеток на основных его этапах, которое зависит от степени согласования применяемых процедур с транспортными характеристиками плазматических мембран криоконсервируемых клеток и их геометрическими параметрами. Анализ осмотического поведения клеток при различных процедурах криоконсервирования дает возможность определить наиболее оптимальные условия насыщения клеток криопротектором и его удаления из клеток, согласовать процедуру экспозиции в растворе криопротектора с процедурой дальнейшего замораживания и т. п.

Используя вычисленные ранее коэффициенты проницаемости и соответствующие геометрические параметры клеток интерстиция тестисов [7, 8], было проведено моделирование их осмотического поведения на этапе охлаждения с различными скоростями.

На рис. 3 показана динамика изменения относительного объема исследуемых клеток при охлаждении со скоростями 1; 10 и 100 град/мин.

Из представленных данных видно, что при скорости охлаждения 1 град/мин в присутствии ДМСО обезвоживание клеток завершается к  $-10^{\circ}\text{C}$ , при замораживании с растворами ЭГ и ДМФА к  $-20^{\circ}\text{C}$ , а при использовании глицерина достижение минимального объема клеток наблюдается к  $-45^{\circ}\text{C}$ . Данный факт свидетельствует о снижении проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов при охлаждении для молекул глицерина по сравнению с использованием других криопротекторов. Увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин в присутствии всех исследуемых веществ расширяет температурный диапазон обезвоживания клеток интерстиция тестисов. При охлаждении со



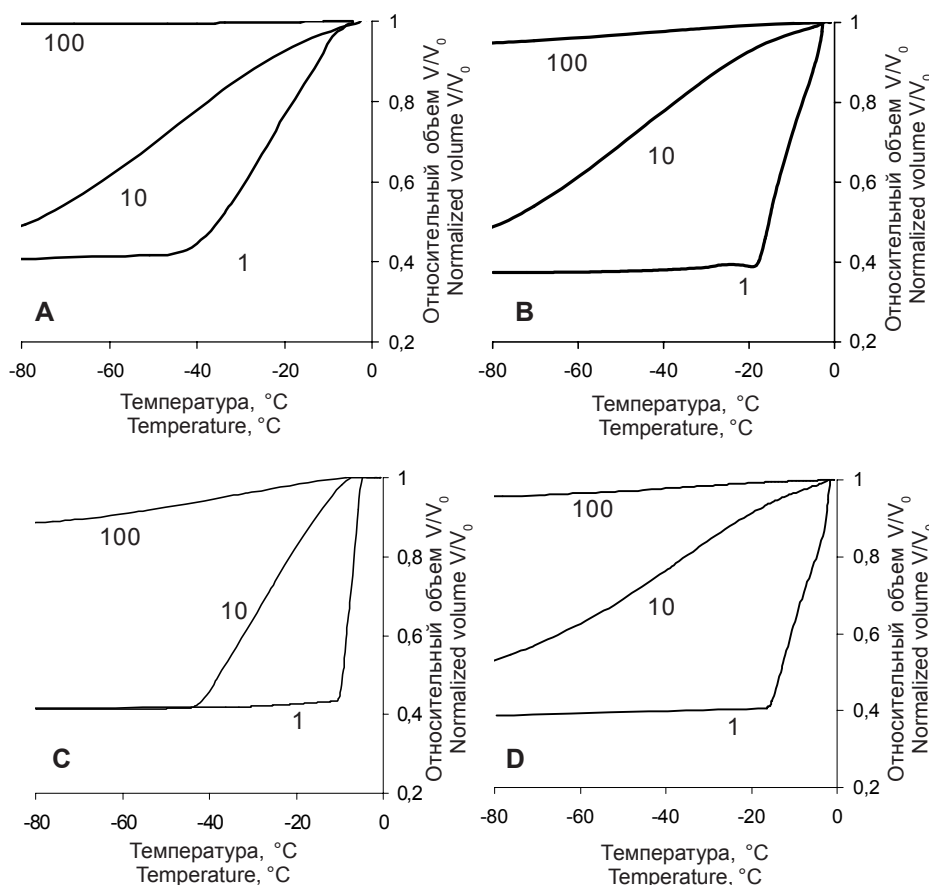
**Рис. 2.** Сохранность клеток интерстиция тестисов после замораживания-отогрева с растворами глицерина (7%), ДМСО (10%), ЭГ (7%) и ДМФА (5%) со скоростями, град/мин: ■ – 1; ▒ – 5; □ – 10; \* – различия достоверны относительно охлаждения со скоростью 1 град/мин в присутствии ДМСО, ЭГ и ДМФА; # – различия достоверны относительно охлаждения со скоростями 1 и 5 град/мин в присутствии ДМФА ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Testes interstitium cell survival after freeze-thawing with solutions of glycerol (7%), DMSO (10%), EG (7%) and DMFA (5%) with various cooling rates, deg/min: ■ – 1; ▒ – 5; □ – 10; \* – the differences are statistically significant comparing to the data for cooling rates of 1 deg/min and in the presence of DMSO, EG and DMFA; # – the differences are statistically significant comparing to the data for cooling rates of 1 and 5 deg/min and in the presence of DMFA; ( $p < 0.05$ ).

Investigation of the effect of freezing with rapid cooling (85–100 deg/min) in the presence of 10% DMSO on the survival of testes organotypic culture after thawing [2] has shown that rapid cooling could lead to intracellular crystallization due to insufficient dehydration of cells during cooling. The optimal cooling rate which caused less significant reduction in cell survival after freeze-thawing was reported as 5 deg/min.

The obtained data suggest that when assessing the protective properties of cryoprotectants the varying of cooling rates could reveal which substance is more efficient. Testes interstitial cell membranes are highly permeable for glycerol, as well as for EG and DMSO [8]. However, while EG and DMSO showed better action during rapid cooling, the application of glycerol did not reveal the significant differences in the effect of cooling rate in the range of 1÷10 deg/min on the survival of testes interstitial cells. In the case of DMFA the more efficient cooling rates were 5 and 10 deg/min.

The success of cryopreservation is mainly determined by the osmotic reactions of the cells at the main stages of the process, which depend on the coordination of the applied procedures and the transport characteristics of cell plasma membrane as well as cell



**Рис. 3.** Зависимости относительного объема клеток интерстиция тестисов от температуры при охлаждении со скоростями 1; 10 и 100 град/мин (отмечены у соответствующих кривых) в присутствии растворов: глицерина (А); ЭГ (В); ДМСО (С) и ДМФА (D).

**Fig. 3.** Dependencies of testes interstitium cell normalized volume vs. temperature during cooling with rates of 1; 10 and 100 deg/min (marked near the curves) in the presence of glycerol (A); EG (B); DMSO (C) and DMFA (D).

скоростью 100 град/мин степень обезвоживания клеток становится незначительной, что может привести к внутриклеточной кристаллизации и стать причиной повреждения клеток.

Результаты прогнозирования осмотического поведения клеток интерстиция тестисов при замораживании с разными скоростями позволяют дать следующее объяснение повышению сохранности клеток при повышении скорости охлаждения до 10 град/мин в присутствии ДМСО, ЭГ и ДМФА.

Охлаждение со скоростью 1 град/мин сопряжено с длительным нахождением клеток в обезвоженном состоянии, что может стать причиной их гибели в результате осмотического стресса. Увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин снижает время экспозиции клеток в дегидратированном состоянии, исключая одновременно и внутриклеточную кристаллизацию, и внутриклеточный стресс. Вместе с тем, очевидно, что дальнейшее увеличение скорости охлаждения (до 100 град/мин) исключает дегидратацию, в результате чего клетки

geometrical parameters. Analysis of the osmotic behavior of cells under conditions of various cryopreservation procedures allow to determine the most optimal conditions for saturation of the cells with cryoprotectant and its removal from the cells, as well as to coordinate the procedures of cells' exposure in cryoprotectant solution and following freezing, etc.

Using previously calculated permeability coefficients and the corresponding geometric parameters of testes interstitial cells [7, 8], we simulated their osmotic behavior during cooling with different rates.

Fig. 3 shows the changes in the normalized volume of cells when cooling with rates of 1, 10 and 100 deg/min.

The presented data show that application of cooling rate of 1 deg/min in the presence of DMSO results in completion of cell dehydration before  $-10^{\circ}\text{C}$ ,

in the presence of EG and DMFA before  $-20^{\circ}\text{C}$ , and in the case of glycerol the minimal cell volume is reached nearly  $-45^{\circ}\text{C}$ . This fact indicates a higher decrease in the permeability of testes interstitium cell membranes for glycerol molecules during cooling comparing to other studied cryoprotectants.

The increase in the rate of cooling up to 10 deg/min in the presence of all the studied substances extends the temperature range of testes interstitium cell dehydration. In the case of cooling rate of 100 deg/min the dehydration of cells becomes negligible, and this can lead to intracellular crystallization and cause cell damage.

The simulation of testes interstitial cell osmotic behavior during freezing with various cooling rates allow to explain the rise in the cell survival when increasing the cooling rate up to 10 deg/min in the presence of DMSO, EG and DMFA.

Cooling rate of 1 deg/min is associated with long period of cell dehydration, which could result in their death due to osmotic stress. The increase in the rate

будут повреждаться в результате внутриклеточной кристаллизации.

### Выводы

Полученные данные о сохранности клеток после замораживания-отогрева позволяют рекомендовать дальнейшее изучение криозащитной активности растворов глицерина, ЭГ, ДМСО и ДМФА при разработке новых схем криоконсервирования клеток.

Результаты теоретического прогнозирования осмотического поведения клеток интерстиция тестисов при охлаждении в присутствии растворов глицерина, ЭГ, ДМСО и ДМФА показали, что при скорости охлаждения 1 град/мин снижение сохранности может быть обусловлено длительным нахождением клеток в дегидратированном состоянии. Быстрое охлаждение (85–100 град/мин), хотя и позволяет избежать длительного действия гипертонии, наблюдающейся при медленных скоростях, приводит к значительному переохлаждению клеток, в результате чего возникает внутриклеточная кристаллизация.

of cooling up to 10 deg/min reduces the duration of cell dehydration, excluding both the intracellular crystallization, and intracellular stress. However, it is clear that further increase of cooling rate (up to 100 deg/min) prevents dehydration, resulting in cell damage due to intracellular crystallization.

### Conclusions

The obtained data about the cell survival after freeze-thawing allow to recommend the further study of cryoprotective activity of glycerol, ethylene glycol, DMSO and DMFA solutions when developing new cryopreservation protocols.

The results of theoretical simulation of osmotic behavior of testes interstitium cells during cooling in the presence of glycerol, ethylene glycol, DMSO and DMFA solutions showed that application of cooling rate of 1 deg/min resulted in a decrease in the cell survival due to long duration of cell dehydration. Rapid cooling (85–100 deg/min) allow to avoid long-term hypertonic exposure, observed during slow cooling, which could lead to a significant supercooling of cells and intracellular crystallization.

### Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 142 с.
2. Легащ Е.И. Комбинированная трансплантация криоконсервированных органотипических культур эндокринных желез: Дис. ... доктора мед. наук.– Харьков, 2008.– 336 с.
3. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования. Справочник.– М.: Медицина, 1987.– 398 с.
4. Пахомов А.В., Божок Г.А. Жизнеспособность различных фракций суспензии клеток семенников при инкубации в растворах ДМСО // Проблемы криобиологии.– 2005.– Т. 15, №4.– С. 739–740.
5. Пахомов А.В., Божок Г.А., Легащ Е.И., Бондаренко Т.П. Гормонотипическая способность клеток интерстиция семенников и органотипической культуры семенников новорожденных поросят после криоконсервирования // Проблемы криобиологии.– 2007.– Т. 17, №2.– С. 179–185
6. Салех Дж. М. Абу Жаяб Коррекция андрогенной функции у экспериментальных животных путем трансплантации нативных и криоконсервированных органных культур семенников: Дис ... канд. мед. наук.– Киев, 2004.– 129 с.
7. Чернобай Н.А., Коваленко И.Ф., Божок Г.А. и др. Осмотическое поведение клеток интерстиция тестисов в гипертонических растворах NaCl и ПЭО-400 // Проблемы криобиологии.– 2010.– Т. 20, №1.– С. 83–87.
8. Чернобай Н.А., Пахомов А.В., Коваленко И.Ф. и др. Зависимость проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для молекул ряда криопротекторов от температуры // Проблемы криобиологии.– 2010.– Т. 20, №2.– С. 153–158.

Поступила 21.06.2011  
Рецензент О.А. Нардид

### References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 142 p.
2. Legach E.I. Combined transplantation of cryopreserved organotypic cultures of endocrine glands: Dissertation ... of Doctor of Medical Sciences.– Kharkov, 2008.– 398 p.
3. Menshikov V.V. Laboratory methods of investigation: Reference book.– Moscow: Meditsina, 1987.– 398 p.
4. Pakhomov A.V., Bozhok G.A. Viability of different fractions of testicular cell suspension at incubation in DMSO solutions // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N4.– P. 739–740.
5. Pakhomov A.V., Bozhok G.A., Legach E.I., Bondarenko T.P. Hormone-producing ability of testicular interstitial cells and organotypic testicular culture of newborn piglets after cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N2.– P.179–185.
6. Saleh J.M. Abu Jajab Correction of androgene function in experimental animals by transplantation of native and cryopreserved testicular organ culture: Dissertation ... of Candidate of Medical Sciences.– Kiev, 2004.– 129 p.
7. Chernobay N.A., Kovalenko I.F., Bozhok G.A. et al. Osmotic behavior of testes interstitium cells in hypertonic solutions of NaCl and PEO-400 // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N1.– P. 83–87.
8. Chernobay N.A., Pakhomov A.V., Kovalenko I.F. et al. Temperature dependence of testes interstitium cell membrane permeability for cryoprotectant molecules // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N2.– P. 153–158.

Accepted 21.06.2011