

## Влияние быстрого двухступенчатого замораживания на сохранность клеток костного мозга

UDC 576.5:57.043.086.13:577.352

M.V. OSTANKOV

## Effect of Rapid Two-Step Freezing on Bone Marrow Cell Integrity

Теоретически рассчитано переохлаждение внутриклеточного раствора костного мозга мыши при охлаждении клеточной суспензии с постоянной скоростью и при быстром двухступенчатом замораживании. На основании проведенных расчетов и экспериментов определены оптимальные условия криоконсервирования этих клеток под защитой диметилсульфоксида.

**Ключевые слова:** быстрое двухступенчатое замораживание, переохлаждение, внутриклеточная кристаллизация, диметилсульфоксид.

Теоретично розраховано переохолодження внутрішньоклітинного розчину кісткового мозку миші при охолодженні клітинної суспензії з постійною швидкістю та при швидкому двоступінчастому заморожуванні. На основі проведених розрахунків і експериментів визначено оптимальні умови криоконсервування цих клітин під захистом диметилсульфоксиду.

**Ключові слова:** швидке двоступінчасте заморожування, переохолодження, внутрішньоклітинна кристалізація, диметилсульфоксид.

Supercooling of murine bone marrow intracellular solution under cell suspension cooling with a constant rate and at a rapid two-step freezing has been theoretically calculated. The optimal conditions for these cells cryopreservation under dimethyl sulfoxide protection have been determined, basing on the calculations and experiments performed.

**Key-words:** rapid two-step freezing, supercooling, intracellular crystallisation, dimethyl sulfoxide.

Как правило, само по себе охлаждение клеток до субнулевых температур не приводит к их повреждению [1, 2, 4-6]. Основная масса поврежденных клеточных структур непосредственно или косвенно связана с образованием кристаллов льда вне и внутри клеток [4, 7, 9, 11-13, 17]. В зоне же фазовых превращений, когда вода (доля которой в биологических объектах составляет около 75-90%) превращается в лед, на клетки помимо температуры действует ряд факторов, способных вызвать их повреждение: концентрирование вне- и внутриклеточных растворов, рост кристаллов вне- и внутриклеточного льда, их рекристаллизация, изменения pH и ионной силы среды, образование трещин в аморфной твердой фазе, изменения электрического потенциала на мембране клетки, электрические поля, возникающие при растрескивании аморфной фазы, и другие факторы [9, 11-13, 17]. Среди перечисленных факторов наиболее значимым считают образование кристаллов льда внутри клеток [14, 16, 19]. Поэтому поиск оптимальных условий криоконсервирования клеточных суспензий направлен на предотвращение внутриклеточной кристаллизации при их глубоком охлаждении.

The cooling down itself of cells to subzero temperatures does not generally result in their damage [1, 2, 4-6]. The bulk of cell structure damages is directly or indirectly associated to the ice crystal formation both in cells and beyond them [4, 7, 9, 11-13, 17]. In the phase transformation area, when water (which part is about 75-90% in biological objects) is transformed into ice, cells are affected by some factors besides a temperature, capable to cause their damage such as: concentration of extra- and intracellular solutions, crystal growth of extra- and intracellular ice, their recrystallisation, pH and medium ion strength changes, fracture formation in amorphous solid phase, changes in electric potential on cell membrane, electric fields, occurring under amorphous phase fracturing and another factors [9, 11-13, 17]. Among the mentioned above factors the ice crystal formation inside cells is considered to be the most significant one [14, 16, 19]. Therefore the search for optimal conditions of cell suspension cryopreservation is oriented to prevent an intracellular crystallisation under its deep cooling down.

Research was aimed to compare the effect of two cooling regimens (cooling down with a constant rate and a rapid two-step freezing) on the murine bone marrow (BM) integrity and morphological composition.

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

\* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-57-91, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

\* Address for correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 5791, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Цель работы – сравнительный анализ влияния двух режимов охлаждения (охлаждения с постоянной скоростью и быстрого двухступенчатого замораживания) на сохранность и морфологический состав костного мозга (КМ) мышцы.

### **Материалы и методы**

Исследования были выполнены на половозрелых мышах-самцах линии СВА массой 19-22 г. Все манипуляции с животными выполнены согласно положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985). Суспензию клеток получали из бедренных костей вымыванием костномозгового канала средой 199 с добавлением цитрата натрия. Количество клеток до и после криоконсервирования подсчитывали в камере Горяева [8]. Сохранность клеток оценивали в световом (ЛОМО) и люминесцентном (ЛЮОМ) микроскопе соответственно после окрашивания клеток КМ витальными красителями – трипановым синим и акридиновым оранжевым. Клеточный состав определяли на мазках, окрашенных азур-II-эозином по Романовскому [8], путем подсчета 500 клеток в световом микроскопе (ЛОМО).

Клетки КМ охлаждали с постоянной скоростью 1 и 10°C/мин на программном замораживателе УОП-06 производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины. При быстром двухступенчатом замораживании использовали специальный криостат, разработанный СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины [10]. В качестве криопротектора был выбран ДМСО в концентрации 10% с добавлением 3% телячьей сыворотки и 0,2% цитрата натрия. Отогревали клетки на водяной бане при 41°C. Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера [3].

### **Результаты и обсуждение**

Необходимым условием для образования внутриклеточных кристаллов льда является переохлаждение внутриклеточного раствора. При этом вероятность внутриклеточной кристаллизации экспоненциально растет с увеличением этого переохлаждения [6]. Как правило, при замораживании любой клеточной суспензии кристаллы льда первоначально образуются во внеклеточном растворе. По мере дальнейшего охлаждения количество внеклеточного льда увеличивается в соответствии с диаграммой плавления внеклеточного раствора и клетки вытесняются в жидкие каналы, расположенные между кристаллами внеклеточного льда. Поскольку растворенные во внеклеточном растворе вещества не захватываются в кристаллы льда, их концентрация в жидкой внеклеточной фазе,

### **Materials and methods**

Research was carried-out in 19-22 g' mature CBA male rats. All manipulations with animals were done according to the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985). Cell suspension was derived from thighbones by washing-out the bone marrow channel using medium 199, supplemented with sodium citrate. Cell number prior to and after cryopreservation was calculated in Goryaev's chamber [8]. Cell integrity was estimated under light and luminescent (LUMAM) microscopes, after bone marrow cell staining with trypane blue and acridine orange vital dyes. Cell composition was determined on smears, stained with azure-II-eosin by Romanovsky [8] by means of calculating 500 cells under light microscope (LOMO), expressed in percentage.

BM cells were cooled down with 1 and 10°C/min constant rate using UOP-06 programmable freezer produced by the Special Designing & Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. During rapid two-step freezing we used the cryostat, specially designed at the Special Designing & Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. As a cryoprotectant we used 10% DMSO, complemented with 3% calf serum and 0.2% sodium citrate. Cells were thawed on water bath at 41°C. The results obtained were statistically processed by the Student-Fisher's method [3].

### **Results and discussion**

The supercooling of intracellular solution is a necessary condition for intracellular ice crystal formation. At the same time a probability of intracellular crystallisation augments exponentially with supercooling increase [6]. As a rule, the ice crystals are initially formed in an extracellular solution during any cell suspension freezing. With further cooling down the number of extracellular ice increases according to the melting diagram for extracellular solution and cells are displaced into liquid channels, located between extracellular ice crystals. Since the substances, dissolved in extracellular solution are not captured into ice crystals, their concentration in a liquid extracellular phase, to which cells are in contact, rises according to the melting diagram for extracellular solution as well. Concentration growth of extracellular solution results in appearance of total concentration differential of solved substances on cell membranes, causing their osmotic dehydration and transmembrane differential reduction of solved substance total concentration due to some water efflux out of cells. Evidently, the more

с которой контактируют клетки, растет также в соответствии с диаграммой плавления внеклеточного раствора. Рост концентрации внеклеточного раствора приводит к появлению перепада суммарной концентрации растворенных веществ на мембранах клеток, который вызывает их осмотическое обезвоживание и уменьшает трансмембранный перепад суммарной концентрации растворенных веществ за счет оттока части воды из клеток. Выравнивание указанного перепада концентраций, очевидно, происходит тем быстрее, чем большие значения имеют коэффициент проницаемости консервируемых клеток для молекул воды и их поверхностно-объемное отношение. Если скорость охлаждения клеточной суспензии достаточно мала, то трансмембранный перепад растворенных веществ в течение всего процесса кристаллизации оказывается близким к нулю. Поскольку внеклеточные кристаллы льда находятся в термодинамическом равновесии с омывающим их раствором, этот же перепад концентраций является и движущей силой внутриклеточной кристаллизации. Эффективное переохлаждение внутриклеточного раствора равно  $\dot{T}(C^{in}) - \dot{T}(C^{out})$ , где  $\dot{T}(C)$  – плавление внеклеточного раствора;  $C^{out}$  и  $C^{in}$  – концентрации вне- и внутриклеточных растворенных веществ. Очевидно, при  $C^{in} \rightarrow C^{out}$  эффективное переохлаждение внутриклеточного раствора падает, и, следовательно, вероятность внутриклеточной кристаллизации уменьшается. Таким образом, при охлаждении консервируемой клеточной суспензии с постоянной скоростью подбор оптимальной скорости охлаждения заключается в ее уменьшении до такого значения, чтобы исключить существенное эффективное переохлаждение внутриклеточного раствора и понизить вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда практически до нуля. При этом необходимо принять во внимание то обстоятельство, что снижение скорости охлаждения, в свою очередь, повышает вероятность повреждения клеток за счет их более длительной экспозиции в неблагоприятных условиях, которые создаются в процессе замораживания (гипертония, повышение ионной силы, сдвиг pH и т.п.).

Нами проведен теоретический расчет трансмембранного перепада суммарной концентрации растворенных веществ в процессе кристаллизации клеточной суспензии при двух указанных выше режимах охлаждения. Зависимость концентрации внеклеточного раствора от температуры определялась по известной диаграмме плавления для тройного раствора ДМСО-NaCl-вода. Интенсивность перераспределения воды между клетками и окружающим их раствором рассчитывали по уравнению Кедем-Качальского.

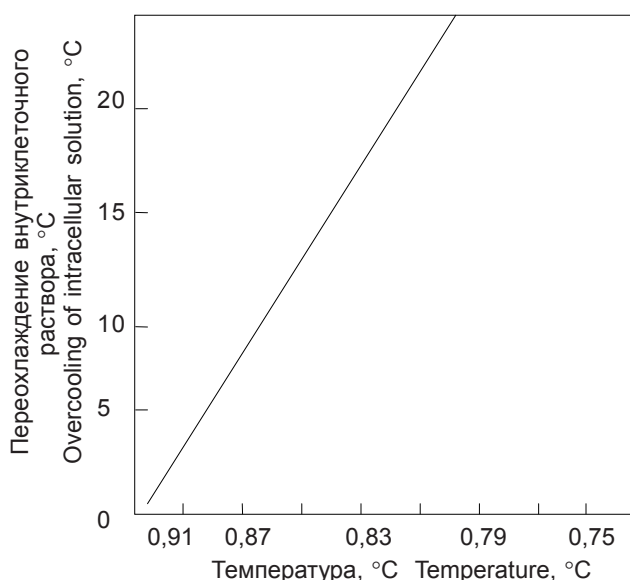
rapid levelling of the mentioned concentration differential occurs, the higher are the values of permeability coefficient of cryopreserved cells for water molecules and their surface-volume ratio. If cooling rate of cell suspension is quite a low, the transmembrane differential of solved substances within the whole crystallisation process is close to zero. Since the extracellular ice crystals are in thermodynamic balance with flowing them around solution, this concentration differential is a driving force for intracellular crystallisation as well. Efficient supercooling of intracellular solution equals to  $\dot{T}(C^{in}) - \dot{T}(C^{out})$ , where  $\dot{T}(C)$  is melting diagrams for extracellular solution,  $C^{out}$  and  $C^{in}$  are the concentrations of extra- and intracellular solved substances. Under  $C^{in} \rightarrow C^{out}$  an efficient supercooling of intracellular solution obviously falls, and as a result, the probability of intracellular crystallisation reduces. Thus, when cooling down the preserved cell suspension with a constant rate the selection for optimal cooling rate consists in its reduction down to this value, excluding a significant efficient supercooling of intracellular solution and decreasing almost to zero the probability of intracellular ice formation. At the same time the circumstance, that a decrease in cooling rate, in its turn, increases the probability of cells damage due to their more prolonged exposure under unfavourable conditions, created under freezing (hypertony, increased ion strength, pH shift *etc.*) should be taken into account.

We have theoretically calculated a transmembrane differential of total concentration of solved substances during cell suspension crystallisation with two mentioned above cooling regimens. The dependency of extracellular solution concentration on temperature was determined by the known melting diagram for DMSO-NaCl-water triple solution. The intensity of water redistribution between cells and surrounding them solution was calculated using the Kedem-Katchalsky equation.

Fig. 1 and 2 demonstrate the dependencies of efficient supercooling of intracellular solution on temperature at a linear and two-step cooling regimens. As the data suggest, the supercooling and, consequently, the probability of intracellular crystallisation at two-step cooling are lower than at cooling with a constant rate.

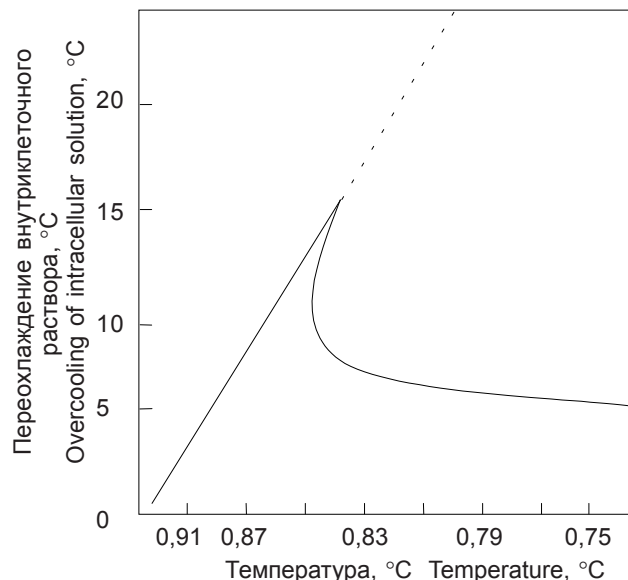
As shown in our experiments, the regimen parameters of two-step freezing (cooling rate prior to temperature stop beginning at adaptation temperature and after it, cell exposure duration) slightly affect the murine BM cell integrity (Table 1).

Since under rapid two-step freezing the BM cell exposure in hypertonic media is less prolonged, than under linear regimen and shorter than characteristic time for cryoprotectant penetration into cells, the cryoprotectant amount in cells slightly increases during



**Рис 1.** Кинетика изменения переохлаждения внутриклеточного раствора  $\delta T^{in}$  на этапе кристаллизации при охлаждении с постоянной скоростью в растворе ДМСО - NaCl - вода.

**Fig. 1.** Kinetics of change in intracellular solution overcooling  $\delta T^{in}$  at crystallisation stage under cooling with a constant rate in DMSO-NaCl-water solution.



**Рис 2.** Кинетика изменения переохлаждения внутриклеточного раствора  $\delta T^{in}$  при двухступенчатом режиме охлаждения. Пунктиром показана зависимость скорости переохлаждения клеточной суспензии при охлаждении с постоянной скоростью.

**Fig. 2.** Kinetics of change in intracellular solution overcooling  $\delta T^{in}$  at two-step cooling regimen. Dependency of overcooling rate of cell suspension under constant rate cooling is dotted.

На рис.1 и 2 представлены зависимости эффективного переохлаждения внутриклеточного раствора от температуры при линейном и двухступенчатом режимах охлаждения. Как видно из данных, переохлаждение и, следовательно, вероятность внутриклеточной кристаллизации при двухступенчатом охлаждении меньше, чем при охлаждении с постоянной скоростью.

Как показывают проведенные нами эксперименты, режимные параметры двухступенчатого замораживания (скорость охлаждения до начала температурной остановки при температуре адаптации и после нее, продолжительность экспозиции клеток при температуре адаптации) слабо влияют на сохранность клеток КМ мышей (табл. 1).

Поскольку при быстром двухступенчатом замораживании экспозиция клеток костного мозга в гипертонических средах менее продолжительна, чем при линейном режиме охлаждения, и меньше характерного времени проникновения криопротектора в клетки, в процессе замораживания и последующего быстрого отогрева количество криопротектора в клетках увеличивается незначительно. Поэтому клетки

freezing and following rapid thawing. Therefore cells are more resistant to hypertonic lysis, occurring when returning frozen-thawed cells into physiological solution.

The results of experimental data about the number and integrity of bone marrow cells are presented in Fig. 3. After rapid two-step freezing the number and integrity of BM cells reduced only by  $6.41 \pm 3.50$  and  $11.32 \pm 1.73\%$ , correspondingly. During cell freezing with a constant  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  rate the cell number and integrity decreased by  $22.21 \pm 2.13$  and  $25.31 \pm 2.34\%$ , correspondingly. Cooling rate increase up to  $10^\circ\text{C}/\text{min}$

**Таблица 1.** Влияние режимных параметров быстрого двухступенчатого замораживания на сохранность клеток КМ

**Table 1.** Effect of regimen parameters of rapid two-step freezing on BM cell integrity

Режимный параметр криоконсервирования Regimen parameter of cryopreservation	Область варьирования Variation range	Влияние на сохранность клеток костного мозга,% Effecton BM cell integrity,%
Скорость охлаждения до температуры адаптации, °C/мин Cooling rate before adaptation temperature, °C/min	1 – 10	8,9
Температура адаптации, °C Adaptation temperature, °C	- 22 – 35	63,4
Время экспозиции при температуре адаптации, мин Exposure time at adaptation temperature, min	5 – 30	11,7
Скорость охлаждения после температуры адаптации, °C/мин Cooling rate after adaptation temperature, °C/min	50 – 400	18

**Таблица 2.** Клеточный состав костного мозга (%) до и после криоконсервирования с 10% ДМСО + 3% телячьей сыворотки + 0,2% цитрата натрия  
**Table 2.** BM cellular composition (%) prior to and after cryopreservation with 10% DMSO + 3% calf serum + 0.2% sodium citrate

Тип клеток Cell type	Нативный КМ (контроль) Native BM (control)	Быстрое двухступенчатое охлаждение Rapid two – step cooling	Постоянная скорость охлаждения, °C/мин Constant cooling rate, °C/min	
			1	10
Миелобласты Myeloblasts	4,71±0,31	4,92±0,23	4,64±0,52	4,21±0,71
Миелоциты Myelocytes	2,13±0,13	2,03±0,32	2,13±0,33	2,32±0,21
Метамиелоциты Metamyelocytes	8,82±0,32	8,12±0,32	5,72±0,14	5,23±0,21
Гранулоциты Granulocytes	35,12±0,91	33,42±1,41	26,62±2,31	20,71±4,12
Миелоидный росток Myeloid lineage	50,71±1,62	48,43±2,11 P <sub>1</sub> 0,05	35,11±3,23 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05	32,42±5,02 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> 0,05
Эритробласты Erythroblasts	3,54±0,81	3,14±0,72	4,75±0,51	3,30±0,34
Нормобласты Normoblasts	23,34±2,33	23,14±2,21	23,52±2,15	29,73±3,12
Эритроидный росток Erythroid lineage	26,83±3,12	26,23±2,91 P <sub>1</sub> 0,05	28,21±2,62 P <sub>1</sub> 0,05 P <sub>2</sub> 0,05	33,01 ±3,32 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> 0,05
Лимфобласты Lymphoblasts	1,82±0,32	1,92±0,24	2,50±0,41	3,61±1,13
Лимфоциты Lymphocytes	19,11±0,81	22,23±1,92	21,91±1,33	29,93±2,23
Лимфоидный росток Lymphoid lineage	20,92±1,31	24,15±2,31 P <sub>1</sub> 0,05	24,32±1,82 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> 0,05	32,02±3,31 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05 P <sub>3</sub> <0,05
Голядерные клетки Bare nucleus – cells	1,61±0,73	1,32±0,51	2,43±0,92	2,15±1,01

**Примечание:** – вероятность случайных расхождений с данными: P<sub>1</sub> – до охлаждения; P<sub>2</sub> – после быстрого двухступенчатого замораживания; P<sub>3</sub> – после охлаждения с постоянной скоростью 1° C/мин.

**Notes:** – the probability of random divergence with the data: P<sub>1</sub> – prior to cooling; P<sub>2</sub> – after rapid two-step freezing; P<sub>3</sub> – after cooling with 1° C/min constant rate.

являются более устойчивыми к гипертоническому лизису, который возникает при возвращении деконсервированных клеток в физиологический раствор.

Результаты экспериментальных данных о количестве и сохранности клеток костного мозга представлены на рис. 3. После быстрого двухступенчатого замораживания количество клеток костного мозга уменьшалось только на 6,41±3,50%, а сохранность – на 11,32±1,73%. При замораживании клеток с постоянной скоростью 1° C/мин количество клеток уменьшалось на 22,21±2,13%, а сохранность – на 25,31±2,34%. Увеличение скорости охлаждения до 10° C/мин приводило к более выраженному снижению количества клеток (47,34±3,72%) и к уменьшению сохранности (60,11±3,52%) в сравнении с исходным костным мозгом.

resulted in more manifested reduction in cell number (47.34±3.72%) and integrity (60.11±3.52%) compared to the initial BM.

When studying BM cell composition the method of rapid two-step freezing was shown as capable for cell preservation of three hemopoietic lineages (Table 2). Their structure after cryopreservation and placing into embryonic calf serum did not differ from initial bone marrow structure. Changes concern some granulocytes and are manifested in chromatin condensation and nuclear pycnosis.

BM cell freezing with 1° C/min constant cooling rate and its increase up to 10° C/min resulted in a manifested damage of granulocytes structure, which had the highest surface-nucleus ratio and comprised a great number of lysosomes and mitochondria. These orga-

При изучении клеточного состава костного мозга было показано, что метод быстрого двухступенчатого замораживания позволяет сохранить клетки трех ростков кроветворения (табл. 2). Их структура после криоконсервирования и помещения в эмбриональную телячью сыворотку не отличается от структуры исходного костного мозга. Изменения касаются отдельных гранулоцитов и выражаются в конденсации хроматина и пикнозе ядер.

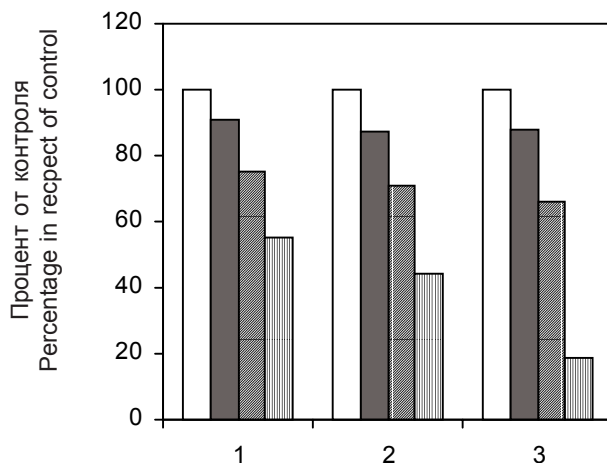
Замораживание клеток костного мозга с постоянной скоростью охлаждения  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и увеличение скорости до  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  приводили к выраженному повреждению структуры гранулоцитов, которые имеют наибольшее поверхностно-ядерное соотношение и содержат большее количество лизосом и митохондрий. Эти органеллы в первую очередь реагируют на замораживание с постоянной скоростью. Очевидно, при этом режиме замораживания переохлаждение и образование кристаллов льда внутри клеток оказывают влияние на мембранные структуры клетки в большей степени. В результате механического повреждения мембран лизосом создаются условия для выхода гидролитических и протеолитических ферментов, приводящие к аутолизу гранулоцитов. В костном мозге, криоконсервированном с использованием линейной скорости охлаждения, наблюдается достоверное снижение количества гранулоцитов. При этом в препаратах отмечается перераспределение клеточного состава в сторону значимого увеличения количества лимфоцитов и нормобластов (табл. 2), то есть количества клеток с малым числом органелл и небольшим ядерно-цитоплазматическим соотношением.

### Выводы

Определен оптимальный для исключения внутриклеточной кристаллизации режим охлаждения клеток костного мозга. Показано, что для данного вида клеток быстрое двухступенчатое замораживание является более эффективным, чем охлаждение с постоянной скоростью.

Процедура быстрого двухступенчатого замораживания очень проста, ее реализация не требует использования дорогостоящего оборудования и заключается в погружении консервируемой клеточной суспензии в заранее охлажденную до заданной температуры спиртовую баню на определенный промежуток времени с последующим погружением контейнера непосредственно в жидкий азот.

Теоретически обосновано и экспериментально доказано, что режим криоконсервирования КМ обеспечивает высокую сохранность трех ростков кроветворения – эритроидного, гранулоцитарного и лимфоидного.



**Рис. 3.** Количество и сохранность клеток КМ до и после криоконсервирования. 1 – количество клеток КМ; 2 – сохранность клеток КМ в световом микроскопе; 3 – сохранность клеток КМ в люминесцентном микроскопе. □ – нативный КМ; ■ – двухступенчатое замораживание; ▨ –  $V=1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ; ▩ –  $V=10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

**Fig. 3.** BM cell number and integrity prior to and after cryopreservation. 1 – BM cell number; 2 – BM cell integrity under light microscope; 3 – BM cell integrity under luminescent microscope. □ – native BM; ■ – two-step freezing; ▨ –  $V=1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; ▩ –  $V=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

nelles are primarily responding to constant rate freezing. Obviously, under this freezing regimen the supercooling and ice crystal formation inside cells affect mostly the cell membrane structures. Due to mechanical damage of lysosome membranes the conditions for hydrolytic and proteolytic enzyme release, resulting in granulocyte autolysis, are created. In BM cryopreserved with linear cooling rate a statistically significant decrease in granulocyte number is observed. At the same time a redistribution of cellular composition towards significant increase in lymphocyte and normoblast number (Table 2), *i.e.* cell amount with low number of organelles and small nucleus-cytoplasm ratio is noted in preparations.

### Conclusions

There has been determined the BM cell optimal cooling regimen for excluding an intracellular crystallisation. A rapid two-step freezing was shown as more efficient for this cell type, than the constant rate cooling.

The procedure of rapid two-step freezing is very simple. Its realisation does not require any expensive equipment and consists in immersing the preserved cell suspension into an alcohol bath, preliminarily cooled down to the fixed temperature for the certain time period with following container immersion directly into liquid nitrogen.

The designed cryopreservation regimen was theoretically substantiated and experimentally proved as

## Литература

1. Аксенов А.И. Влияние замораживания на взаимодействие воды с биоструктурами. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тезисы докладов Междунар. конференции.—Харьков, 1988.— С. 7-8.
2. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С.Пушкаря, А.М.Белоуса.— Киев: Наук. думка, 1981.— 608 с.
3. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.— Л.: Медицина, 1962.— 180 с.
4. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция.— М.: Высш. школа, 1987.— 187 с.
5. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология.— Киев: Наук. думка.— 1994.— 431 с.
6. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. — Киев: Наук. думка, 1994. — 143 с.
7. Кулешова Л.Г. Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. дис... канд. биол. наук.— Харьков, 1983.— 24 с.
8. *Лабораторные методы исследования в клинике* / Под ред. В.В.Меньшикова — М.: Медицина, 1987.— 368 с.
9. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А. и др. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.— Киев: Наук. думка, 1977.— 243 с.
10. Пушкарь Н.С., Гордиенко Е.А., Осецкий А.И. и др. Исследование физических процессов в биологических объектах при глубоком охлаждении // Пробл. криобиологии.— 1995.— № 3.— С. 30-37.
11. Релин Н.В. Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения // Криобиология.— 1986.— №3.— С.31-36.
12. Acker J.P., Mcgann L.E. The role of cell – cell contact on intracellular ice formation // *Cryo-Lett.*— 1998.— Vol.19,N4.— P. 367-374.
13. Armitage W.J. and Juss B.K. The influence of cooling rate on survival of frozen cells differs in monolayers and in suspensions // *Cryo-Lett.*— 1996.— Vol.17,N2.— P. 213–218.
14. Diller K.R., Cravalho E.G., Huggins C.E. Intracellular freezing in biomaterials // *Cryobiology.*— 1972.— Vol.9, N5.— P. 429-440.
15. Diller K.R. Intracellular freezing: Effect of extracellular supercooling // *Cryobiology.*— 1975.— Vol.12, N5.— P. 480-485.
16. Dowgert M.F., Steponkus P.L., Levin R.L., Fergyson J.R. Cryobiology of isolated plant protoplast: II. Intracellular ice formation // *Cryobiology.*— 1979.— Vol.16, N6.— P. 593.
17. Jackson T.H. Novel microwave technology for cryopreservation of biomaterials by suppression of apparent ice formation // *Cryobiology.*— 1997.— Vol.34, N4.— P. 363-372.
18. McGrath J.J., Cravalho E.C., Huggins C.E. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells // *Cryobiology.*— 1975.— Vol.12, N6.— P. 540-550.
19. Smith A.U. Biological effects of freezing and supercooling // Baltimore, Williams and Wilkins.— 1961.— 182 p.

Поступила 06.06.2007

providing a high integrity for three hemopoietic lineages: erythroid, granulocyte and lymphoid ones.

The selected regimen of rapid two-step freezing was cryomicroscopically and cytologically shown as preserving the structure integrity in bone marrow cells.

## References

1. Aksenov A.I. Effect of freezing on water and biostructure interactions. Achievements and perspectives of cryobiology and cryomedicine development: Proceedings of International Conference.— Kharkov, 1988.— P. 7-8.
2. *Actual problems of cryobiology* /Ed. by N.S. Pushkar, A.M. Belous.— Kiev: Naukova dumka, 1981.— 608 p.
3. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological research.— Leningrad: Meditsina, 1962.— 180 p.
4. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Freezing and cryoprotection.— Moscow: Vyssh. Shkola, 1987.— 187 p.
5. Belous A.M., Grischenko V.I. Cryobiology.— Kiev: Naukova dumka.— 1994.— 431 p.
6. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of cell suspension low temperature preservation.— Kiev: Naukova dumka, 1994.— 143p.
7. Kuleshova L.G. Kinetics of ice formation in living cells and model systems: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences.— Kharkov, 1983.— 24 p.
8. *Laboratory methods for clinical research* / Ed. by V.V. Menshikov.— Moscow: Meditsina, 1987.— 368 p.
9. Pushkar N.S., Belous A.M., Itkin Yu.A. et al. Low temperature crystallisation in biological systems.— Kiev: Naukova dumka, 1977.— 243p.
10. Pushkar N.S., Gordienko E.A., Osetsky A.I. et al. Study of physical processes in biological systems during profound cooling // *Problems of Cryobiology.*— 1995.— N3.— P. 30-37.
11. Repin N.V. Study of extra- and intracellular crystallisation in human erythrocytes at different conditions of cooling // *Cryobiology.*— 1986.— N3.— P. 31-36.
12. Acker J.P., Mcgann L.E. The role of cell – cell contact on intracellular ice formation // *Cryo-Lett.*— 1998.— Vol.19,N4.— P. 367-374.
13. Armitage W.J. and Juss B.K. The influence of cooling rate on survival of frozen cells differs in monolayers and in suspensions // *Cryo-Lett.*— 1996.— Vol.17,N2.— P. 213–218.
14. Diller K.R., Cravalho E.G., Huggins C.E. Intracellular freezing in biomaterials // *Cryobiology.*— 1972.— Vol.9, N5.— P. 429-440.
15. Diller K.R. Intracellular freezing: Effect of extracellular supercooling // *Cryobiology.*— 1975.— Vol.12, N5.— P. 480-485.
16. Dowgert M.F., Steponkus P.L., Levin R.L., Fergyson J.R. Cryobiology of isolated plant protoplast: II. Intracellular ice formation // *Cryobiology.*— 1979.— Vol.16, N6.— P. 593.
17. Jackson T.H. Novel microwave technology for cryopreservation of biomaterials by suppression of apparent ice formation // *Cryobiology.*— 1997.— Vol.34, N4.— P. 363-372.
18. McGrath J.J., Cravalho E.C., Huggins C.E. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells // *Cryobiology.*— 1975.— Vol.12, N6.— P. 540-550.
19. Smith A.U. Biological effects of freezing and supercooling // Baltimore, Williams and Wilkins.— 1961.— 182 p.

Accepted in 06.06.2007