

Криоконсервация и криохранение стволовых клеток в банках пуповинной крови и костного мозга

Д-р мед. наук А.Б. СМОЛЯНИНОВ, Г.Н. КОВАНЬКО

Покровский банк стволовых клеток, Центр клеточной и генной терапии, Санкт-Петербург,
д-р биол. наук Ш.М. БАГАУДИНОВ

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург,
канд. мед. наук О.Г. ХУРЦИЛАВА

Санкт-Петербургская государственная медицинская академия последипломного образования

The nature of destruction of a cell during its freezing and the mechanism of prevention of this destruction using cryoprotectors has been considered. Special features of cryoconservation of founder cells (FC) and the technique of this process are described. A container for the storage of founder cells and methods of maintaining low temperatures during storage of FC: nitrogen vapor or liquid nitrogen chilling, and also mechanical chilling are described. Cryoprotectors for cryoconservation of FC : glycerol, dimethylsulfoxide, hydroxyethylstarch and other polymers are described in detail. Recommendations on chilling conditions of FC during their cryoconservation and heating before use given.

В соответствии с современной теорией криоконсервации (КК) повреждение клетки при охлаждении связано с образованием льда. Замерзание – это кристаллизация воды, и точка замерзания – это температура, при которой достигается равновесие между кристаллами льда и водой. Точка замерзания воды снижается при добавлении соли (растворенных веществ), и чем больше содержание растворенной соли, тем ниже температура. Для любой смеси растворенных веществ и воды существует определенная температура начала образования кристаллов. Более того, образование и рост кристаллов в водных растворах происходят в определенном температурном диапазоне в отличие от образования кристаллов в чистой воде. Это связано с тем, что растущие кристаллы поглощают воду и выталкивают растворенные частицы. Включение воды в кристаллы приводит к изменению концентрации растворенных веществ и дальнейшему снижению температуры замерзания оставшейся воды, что препятствует образованию льда, если не происходит дальнейшего охлаждения. Таким образом, молярная концентрация раствора в равновесии со льдом определяется температурой раствора, а не исходной концентрацией соли. При быстром охлаждении кристаллы льда могут образовываться внутри клетки, что приводит к ее механическому повреждению и немедленной гибели. При медленном охлаждении кристаллы образуются в основном во внеклеточном пространстве, свободная вода переходит во внеклеточное пространство и включается в растущие ледяные кристаллы. В результате возникает прогрессирующая дегидратация клетки.

КК клеток стала возможна с открытием в 1949 г. криопротективных свойств глицерина. В 1959 г. поступили сообщения о криопротективных свойствах диметилсульфоксида (ДМСО). Глицерин и ДМСО являются коллагативными (проникающими) криопротекторами (КП). Они предотвращают повреждение от дегидратации за счет регулирования повышенной концентрации не проникающих в клетку внеклеточных растворенных веществ при образовании льда и за счет уменьшения количества воды, поглощаемой кристаллами льда при определенной температуре.

Дегидратация клеток происходит, поскольку некоторые растворенные вещества, такие, как ионы натрия, не могут свободно проходить через клеточную мембрану. Когда при медленном охлаждении вне клетки из воды образуются кристаллы льда, концентрация соли в растворе увеличивается и вода выходит из клеток. ДМСО препятствует этому процессу, поскольку свободно проходит в клетки. Высокая концентрация ДМСО в клетке и вне ее смягчает эффект дегидратации, поскольку число молекул ДМСО превышает число ионов соли в растворе. Поэтому различие осмолярности внутри и вне клетки при любой температуре после кристаллизации льда сглаживается. Очевидно, что коллагативные КП не должны быть токсичными для клеток при их использовании в высокой концентрации.

Другой механизм действует при замораживании клеток в растворах макромолекул, таких, как гидроксиэтилкрахмал (ГЭК). Растворы высокомолекулярных полимерных КП содержат довольно малое количество растворенных частиц, и они не могут проникать в клетки. Эти КП защищают клетку, образуя вязкую оболочку, которая задерживает движение воды, предотвращая прогрессирующую дегидратацию по мере включения воды в крис-

* Доклад на Годичном общем собрании МАХ 29 апреля 2008 г. Даётся в сокращении.

таллы внеклеточного льда. Растворы некоторых соединений, присутствующие в достаточно высоких концентрациях, приводят к отвердеванию жидкости в аморфном стеклообразном состоянии без формирования кристаллов льда — процесс, называемый витрификацией.

Криоконсервация и стволовые клетки

При использовании методик КК стволовых клеток (СК) кристаллизация воды происходит при более высоких температурах, чем витрификация. Тем не менее при дальнейшем охлаждении до определенной температуры раствор внезапно приобретает вязкие свойства, что если не прекращает поток воды через внеклеточный матрикс, то хотя бы замедляет его. Предполагается, что именно таков механизм криопротекции СК при использовании ГЭК в обычных концентрациях. Чистая вода переходит в стеклообразное состояние при температуре около -139°C . При добавлении КП, такого, как ДМСО, глицерин или ГЭК, происходит повышение температуры витрификации. Для этой модели КК требуются два процесса:

- ✓ адекватная дегидратация для концентрирования внутриклеточных растворенных веществ и снижения вероятности образования внутриклеточного льда;
- ✓ витрификация при такой температуре, которая позволяет избежать избыточной дегидратации клетки.

Клетки подвергают замораживанию не в простых двух- или трехкомпонентных растворах, а в сложных растворах, содержащих соли, сахара, коллагеновые (проникающие) КП с внеклеточными КП или без них, а также белки плазмы. Температуры фазового перехода (например, температура стеклования) для этих растворов неизвестны. Улучшение выживаемости клеток при увеличении концентрации белка и, возможно, при комбинированном использовании проникающих и внеклеточных криопротекторов может хотя бы частично объясняться приведенными выше теориями замерзания и витрификации и их влиянием на клетку. Кроме того, витрификация позволяет объяснить связь между температурой хранения и выживанием СК со временем. При снижении температуры ниже температуры витрификации увеличение ранее образовавшихся кристаллов льда за счет рекристаллизации незамерзшей воды не может происходить, и клетки защищены от прогрессирующего механического повреждения. Рост существующих кристаллов льда за счет процесса рекристаллизации с точки зрения термодинамики более выгоден, чем образование ядра нового ледяного кристалла. Рекристаллизация может происходить в любое время (включая время согревания), когда температура продукта выше, чем температура витрификации. Оптимальная температура хранения — это температура ниже точки витрификации для используемого криопротективного раствора. Могут использоваться и более высокие температуры, но при этом существует риск повреждения клеток, который зависит от температуры хранения и стабильности (вязкости) раствора при данной температуре.

Этот упрощенный обзор эффектов замораживания и свойств проникающих и полимерных КП не дает полно-

го объяснения процессов, происходящих при замораживании. В это обсуждение также не включены вопросы специфического действия дегидратации на функцию клетки. Кроме механического и дегидратационного повреждения охлаждение само по себе может приводить к повреждению клетки. Более того, одних только коллагеновых эффектов недостаточно для объяснения криопротективных свойств ДМСО или глицерина. Другие свободно проникающие в клетку химические вещества, такие, как мочевина или диметилсульфон, не оказывают криопротективного действия на СК. Некоторые вещества могут действовать как криосенситизаторы. Очевидно, что химическая структура КП важна для выживания СК при замораживании, и для оптимальной КК большое значение имеет молекулярное взаимодействие между КП и белковыми или липидными молекулами.

Методики криоконсервации стволовых клеток

КК делает возможным длительное хранение СК без прогрессирующей потери клеток, которая возникает в случаях хранения без замораживания. Хотя хранение без замораживания приемлемо для транспортировки продуктов СК, их замораживание и хранение с использованием подходящих методик дают возможность неопределенно долго сохранять их жизнеспособность. Это позволяет использовать многодневные схемы подготовки к трансплантации, а также заниматься банкированием продуктов пуповинной крови, которые могут храниться годами или потенциально даже десятилетиями.

Обычно отсутствие приживления не связано с КК СК, хотя некоторые исследователи описали корреляцию между плохой КК и задержкой приживления после трансплантации. Все методики переработки клеток приводят к некоторой потере СК, и этот эффект КК чаще всего наблюдается при использовании компонентов с пограничным содержанием СК. После первоначальной потери СК на этапах КК прогрессирующее снижение числа или функции СК не происходит при соблюдении требований к замораживанию и хранению компонентов.

Большинство лабораторий криоконсервации используют одинаковые методы КК с минимальными различиями в концентрации криопротектора, объеме компонентов и температуре хранения. В качестве этапов КК выделяют обработку перед замораживанием, подготовку и добавление КП-растворов, охлаждение, хранение и транспортировку, согревание и последующие манипуляции, а также контроль качества на этапах обработки. Хотя КК и реинфузия СК легко выполняются в ряде центров трансплантации, они не лишены риска потери СК. Инфузия криоконсервированных клеток часто рискована для реципиента; многие виды риска носят жизнеугрожающий характер, а некоторые не до конца изучены. Потеря СК в результате КК и влияние этой потери на скорость приживления количественно не оценивались. Существует множество аспектов успешной КК СК, каждый из которых влияет на выход СК при КК и при любом технологическом процессе требует контроля с воспроизво-

димыми результатами. Учреждения, занимающиеся КК, по-прежнему сталкиваются с вопросами, не обеспечат ли другие растворы и методики лучшую сохранность клеток при меньшей цене и большей простоте или с меньшей токсичностью для реципиента или для клеток, которые подвергаются замораживанию.

СК из периферической крови, костного мозга или пуповинной крови замораживают и хранят обычно с использованием одинаковых методик. Общая методика включает криоконсервацию с ДМСО и источником белка плазмы, с гидроксиэтилкрахмалом или без него. Производится охлаждение со скоростью 1...3 °C в минуту и хранение при температуре –80 °C или ниже. Различия в этой методике могут касаться концентрации клеток при замораживании, количества и источника белка плазмы и методик замораживания. Большинство этих различий, вероятно, не оказывает большого влияния на выживаемость СК, что подтверждается успешным приживлением КК-компонентов. Однако КК приводит к потере неопределенной, но, возможно, значительной доли СК, и в случае пограничного содержания оставшихся СК возможна задержка их приживления после трансплантации.

СК составляют очень небольшую часть (обычно < 1 %) клеток костного мозга, периферической или пуповинной крови. Методики криоконсервации, оптимально подходящие для СК, не позволяют сохранить зрелые клетки крови, что может приводить к осложнениям, как реакции на инфузию. При наличии большого количества зрелых клеток крови замораживание производится в большом объеме, что увеличивает риск нежелательных реакций на инфузию из-за большого объема КП. Важно заметить, что концентрирование СК перед замораживанием уменьшает объем, требуемый для хранения. Несколько устройств для сепарации или отмыки клеток могут переработать большой объем собранных клеток. В качестве минимальной переработки клеток перед КК костного мозга должны использоваться сбор лейкоцитарной пленки и удаление эритроцитов. Среди СК периферической крови содержатся эритроциты в небольшом количестве, и при этом не требуется дальнейшая сепарация, хотя уменьшение объема может быть полезно, поскольку уменьшит потребность в КП. Переработка клеток пуповинной крови производится, чтобы уменьшить объем клеток, сохраняемых для аллогенной трансплантации.

Концентрирование стволовых клеток перед криоконсервацией

Изменение концентрации клеток большинством лабораторий проводится с определенной целью, как, например, желание заморозить более чем один пакет (в более низкой концентрации) или минимизировать общий объем хранимого компонента (заморозка в более высокой концентрации). Кроме того, хотя некоторые лаборатории устанавливают пределы концентрации клеток с ядрами, немногие из них также устанавливают максимальную или

минимальную концентрацию либо количество эритроцитов, гранулоцитов или тромбоцитов. При КК клеток-предшественников периферической крови в высокой концентрации не было выявлено корреляции между концентрацией клеток и кинетикой приживления. Хотя корреляции между концентрацией клеток при замораживании и выходом CD34+ клеток не было обнаружено, выход гранулоцитарно-моноцитарных колониебразующих единиц (КОЕ-ГМ) уменьшался при более высокой концентрации клеток. Криоконсервация клеток с высокой концентрацией ядерных клеток возможна, но инфузия СК, замороженных в высокой концентрации, сопровождается повышенным риском неврологических осложнений в ранний период после введения.

Развитие методик обогащения клеток CD34+ – это еще одна задача для лаборатории КК. Эти методики обычно позволяют получить на выходе около 1 % исходного количества клеток с ядрами. КК этих клеток в том же объеме, что и неразделенных клеток, приведет к очень низкой клеточной концентрации, что может оказывать повреждающее влияние на компонент.

Контейнеры для хранения стволовых клеток

Клетки могут храниться в пакетах или пробирках из пластика, устойчивого к низким температурам. Преимущество пробирок связано с легкостью отбора проб для анализа. Большое число пробирок, необходимое для хранения, риск взрыва при попадании азота в плохо герметизированные пробирки, а также более высокий риск контаминации при работе с пробирками говорят в пользу применения пакетов. Контейнеры должны быть пригодными к хранению при сверхнизких температурах; некоторые виды пластика становятся слишком хрупкими при криогенном хранении и ломаются при малейшей нагрузке. Клеточные контейнеры хранят в стеллажных системах с охлаждением жидким азотом, хотя в холодильниках с машинным охлаждением пакеты или пробирки могут храниться в ящиках. Стеллажные системы обычно разрабатывают только под определенные размеры и форму пакетов для хранения. Переполненные пакеты могут не уместиться в кассету. Лаборатории, которые часто получают клетки, замороженные в других учреждениях, должны иметь контейнер, подходящий для хранения пакетов разных размера и устройства. Следует также учитывать, что пакеты, край которых после герметизации загрязнен кровью, могут быть опасны в плане перекрестного заражения вирусами гепатита после погружения в жидкий азот.

Хранение криоконсервированных стволовых клеток

Большинство лабораторий хранят СК при температуре ниже –120 °C в механических морозильных установках или в морозильниках с парами или жидкой фазой азота для уменьшения роста кристаллов льда за счет рекристаллизации. В доклинических исследованиях было показано прогрессирующее снижение содержания СК при аутологичной трансплантации пограничных коли-

честв СК, хранившихся в парах азота. Неудачное приживление можно объяснить возможной нестабильностью температуры хранения этих клеток.

Морозильники с парами азота характеризуются градиентом температуры: в верхней части температура может доходить до -100°C . Клетки, которые хранятся в этой части, подвергаются дополнительному воздействию тепла после открытия морозильника или подъема стеллажа для доступа к кассетам. Со временем, когда клетки повторно подвергаются действию тепла при нормальной работе установки, это может приводить к прогрессирующему повреждению СК. Градиент температуры в паровой фазе можно свести к минимуму, используя каркас из металла с большой теплопроводностью, например из алюминия. Контейнеры для длительного хранения и рабочие процедуры должны быть разработаны таким образом, чтобы избежать колебаний температуры. Длительность хранения может быть весьма продолжительной при соблюдении адекватной температуры и использования соответствующих методик КК.

Жидкий азот может служить резервуаром для накопления вирусов, что может иметь клиническое значение, так как для заражения пакета достаточно переноса всего нескольких микроорганизмов.

Хранение при сверхнизкой температуре не является требованием для успешного приживления, если получено достаточное количество СК и если продолжительность хранения ограничена. При таких условиях может происходить умеренная потеря СК при сохранении кинетики приживления. Использование различных КП позволяет хранить клетки при более высоких температурах, хотя проспективного исследования такого хранения с соответствующими моделями приживления не проводилось. Хранение в морозильной камере с машинным охлаждением при -80°C допускается в течение короткого срока (если проведение трансплантации планируется через несколько недель или месяцев после сбора клеток). В основном при этом используется криопротекция с использованием ДМСО/ГЭК.

Есть сообщения об успешной трансплантации компонентов, которые при такой температуре хранились в течение срока до 22 мес. При этом не анализировалось, связано ли столь длительное успешное хранение с добавлением ГЭК в криопротективный раствор, что повлияло на его стабильность при относительно высокой температуре, или с тем, что СК было достаточно с запасом на потерю клеток. В одном из исследований отмечалась прогрессивная потеря КОЕ-ГМ и эритроидных бурсобразующих единиц после хранения СК периферической крови при температуре -80°C с использованием 5 или 10 % ДМСО (без ГЭК), поэтому рекомендуется ограничить время хранения при этой температуре. Температуру хранения следует поддерживать на заданном уровне и при транспортировке костного мозга. Наличие контейнеров для «сухой транспортировки», где жидкий азот поглощается стенкой контей-

нера, упрощает транспортировку замороженных клеток. В этих контейнерах благодаря использованию паров азота в течение 7–10 сут может поддерживаться температура около -180°C (при условии хранения в вертикальном положении). Остаточное количество жидкого азота в любой момент определяют взвешиванием контейнера.

Криопротекторы для криоконсервации стволовых клеток ДМСО и глицерин

ДМСО, глицерин и ряд других химических веществ могут использоваться как коллигативные КП, которые защищают СК от избыточного обезвоживания по мере перехода внеклеточной воды в растущие кристаллы льда. Оба вещества использовались для криоконсервации СК. Быстрое проникновение ДМСО через клеточную мембрану и трудности удаления глицерина после реинфузии привели к предпочтительному использованию ДМСО при криоконсервации СК. Инфузия содержащих ДМСО продуктов обычно хорошо переносится.

ДМСО, побочный продукт производства бумаги, представляет собой гигроскопическое полярное соединение, которое первоначально использовалось как растворитель для химических веществ, таких, как инсектициды,fungициды и гербициды. Чистый ДМСО (диметилсульфоксид) – это жидкость без цвета и практически без запаха, хотя ДМСО со степенью очистки для промышленного применения может иметь сильный запах серы. Период полувыведения ДМСО из сыворотки крови составляет примерно 20 ч, хотя для диметилсульфона, его метаболита, который выводится почками, – 72 ч. Небольшая часть ДМСО восстанавливается до диметилсульфида, который выводится через легкие с дыханием примерно через 24 ч после приема, на что указывает характерный запах выдыхаемого воздуха после инфузии ДМСО.

Оптимальная концентрация ДМСО для КП СК составляет около 10 %, хотя концентрация 5 и даже 3,5 % также успешно использовалась при трансплантации в клинике.

Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) и другие полимеры

ГЭК – это полимерное вещество с цепями различной длины и молекулярной массы. Первично он изучался как КП для эритроцитов. Затем было показано, что ГЭК оказывает эффективное криопротекторное действие и на другие клетки. Макромолекулярные КП могут использоваться самостоятельно, но основное внимание уделяется изучению КК СК с использованием внеклеточных и проникающих КП. В одном раннем исследовании было показано, что добавление поливинилпирролидона (ПВП) – еще одного макромолекулярного КП – к глицерину или ДМСО улучшает КК СК по сравнению с использованием только проникающих веществ.

В другом исследовании замораживали СК человека в составе, включающем 5 % ДМСО, 6 % ГЭК и 4 % альбумина крови человека и отмечали улучшение выживаемости клеток предшественников по данным культивирования *in vitro*.

Белки плазмы крови и их криопротекторное действие

Белки плазмы крови обладают криопротекторным действием, которое, возможно, связано с изменением вязкости или температуры витрификации криопротекторного раствора. Добавление белков сыворотки к криопротекторному раствору улучшает выживаемость СК.

Практически все растворы для КК содержат белки плазмы крови, которые добавляют в состав криопротекторного раствора или при обработке клеток. Концентрация и источник белка варьируют в разных группах трансплантации (в некоторых используется до 90 % плазмы). Источник белка также может быть различным, хотя сыворотка крови плода коровы больше не используется (она применялась в некоторых ранних исследованиях трансплантации костного мозга). Использование растворов альбумина является привлекательным благодаря возможности обеспечения высокой равномерной концентрации белка без костномозгового жира, остатков погибших клеток, антикоагулянтов и риска, который представляют криогlobулины, при использовании аутологичной плазмы крови, собранной при первоначальной обработке СК.

Содержание солей и сахаров в криопротекторах для криоконсервации стволовых клеток

Метаболически неактивные криоконсервированные клетки не нуждаются в сложной питательной среде, которая используется для роста СК ex-vivo. Успешная КК обеспечивается использованием доступных в продаже фармакологических солевых растворов.

Сахара могут действовать, как КП, но они не могут свободно проходить через клеточную мембрану и, вероятно, играют роль внеклеточных КП. В то же время количество глюкозы в солевых растворах для внутривенного введения исчисляется миллиологиями, т.е.пренебрежимо мало в сравнении с ее концентрацией в эффективных КП. Добавление различных сахаров может обеспечить лучшую криопротекцию, что, возможно, связано со стабилизацией клеточной мембранны при замораживании. Было высказано предположение, что глюкоза может защищать от цитотоксического действия высоких концентраций ДМСО.

Скорость охлаждения и нагревания при работе со стволовыми клетками

Потребность в медленном охлаждении и быстром нагревании при работе с СК с использованием коллигативных КП объясняется механической и дегидратационной травмой в результате образования и роста кристаллов льда. Нужная скорость охлаждения зависит от выбора КП. При замораживании СК с коллигативными КП, такими, как ДМСО, охлаждение должно идти медленно, в идеале со скоростью 1 °C в минуту. Влияние добавления макромолекулярных КП, таких, как ГЭК, к ДМСО на оптимальную скорость охлаждения СК не описывалось. Поскольку такие исследования не проводились, замораживание СК в ДМСО с ГЭК или без ГЭК следует проводить мед-

ленно, поскольку это было показано для обоих растворов КП по отдельности. Способ охлаждения неважен. Охлаждение проводится при помещении контейнера с клетками в холодную среду. Перенос тепла от теплого контейнера с клетками к камере зависит от размера клеточного контейнера, его изолирующих свойств и от разницы температур между контейнером и камерой, в которую его помещают.

Простое помещение клеточного контейнера в замораживатель с машинным охлаждением позволяет обеспечить воспроизводимое машинное охлаждение при соблюдении одинаковых свойств клеточного контейнера и холодильной камеры. Этую методику часто называют «неконтролируемым замораживанием», хотя при этом скорость охлаждения хорошо контролируется физикой теплопередачи. Если в ту же камеру поместить контейнер меньшего размера, охлаждение будет идти быстрее, как и при помещении такого же контейнера в более холодную камеру. Подбор размера объекта и температуры камеры можно проводить, добавляя изоляцию клеточного продукта. Преимуществом «погружного замораживания» является то, что эта методика не требует использования специальных устройств с компьютерным контролем и требует меньшего участия обслуживающего персонала. К недостаткам относится потребность в различных процедурах (в добавлении или снятии изоляции) для клеточных контейнеров различной толщины или камер с разной температурой, а также отсутствие записи скорости охлаждения клеток. Лаборатории, где используется эта методика, должны сначала определить, достигается ли при этом процессе желаемая скорость охлаждения. Процедура также должна включать ограничение объема продукта и жесткое определение используемых материалов и оборудования для получения воспроизводимых результатов.

В большинстве центров для обеспечения оптимальной скорости охлаждения используются электронные контроллеры. Эти устройства обеспечивают охлаждение камеры с заданной скоростью за счет подачи в камеру жидкого азота. Температуру камеры можно программировать в различные моменты в процессе охлаждения, чтобы увеличить или уменьшить разницу между температурой продукта и камеры и скорость охлаждения продукта.

На клеточный контейнер или внутрь него помещается датчик для регистрации температуры продукта и изменения скорости охлаждения в зависимости от этой температуры. В типичном случае программа запускает снижение температуры камеры с контролируемой скоростью при сближении температуры продукта и камеры. При достижении температуры клеточного продукта, близкой к температуре плавления, программа производит быстрое снижение температуры камеры для поглощения выделяемого тепла, а затем также быстро снова нагревает камеру до температуры, близкой к температуре продукта, чтобы из-

бежать такого же быстрого падения температуры продукта. После этого контроллер можно запрограммировать на возобновление заданной скорости охлаждения. Место размещения датчика температуры очень важно. Если датчик температуры образца находится на краю клеточного контейнера, на него будет влиять температура камеры, и данные будут в меньшей степени отражать температуру самого продукта. Преимуществом устройств охлаждения с компьютерным контролем является возможность программирования компьютера на различный размер образцов и контроль достигнутой скорости снижения температуры. К недостаткам относятся высокая стоимость устройства и материалов, а также потребность в технологическом контроле состояния устройства. Кроме того, в лаборатории должна иметься возможность немедленного продолжения работы с образцом при сбое устройства (возможность поместить образец в замораживатель с машинным охлаждением для завершения процесса).

Клинические исследования влияния скорости охлаждения на результат трансплантации не проводились. В исследованиях культур костного мозга человека *in vitro* было показано, что для консервации СК человека в 10 % ДМСО оптимальная скорость охлаждения составляет 1 °C в минуту. Выход колониеобразующих клеток снижался при использовании скорости ниже 1 °C или выше 3 °C в минуту. В исследованиях различных фаз охлаждения клеток мышей было показано, что продолжительность фазы плато (немедленно следующей за достиже-

нием температуры плавления) и скорость охлаждения после прохождения фазы плато влияют на число образующихся колоний в селезенке. Скорость охлаждения до образования льда не влияла на жизнеспособность СК.

Некоторые центры постоянно используют пробирки контроля заморозки, где содержится небольшое количество клеток в дополнение к большему количеству клеток в пакетах для замораживания. Характеристики охлаждения пробирок и пакетов различаются, что снижает надежность такого контроля выживания клеток при замораживании.

Скорость нагревания имеет большее значение при высокой скорости охлаждения. Это связано с образованием внутриклеточных ядер льда при быстром охлаждении. Если нагревание будет идти медленно, рост этих кристаллов за счет рекристаллизации может привести к механическому повреждению клеток. При использовании медленного охлаждения образование внутриклеточных кристаллов льда происходит в меньшей степени и механическое повреждение клетки при рекристаллизации менее вероятно. В целом скорость нагревания должна быть выше скорости охлаждения.

Эффективным методом нагревания является простое погружение контейнера с клетками на водяную баню (с принятием необходимых мер против контаминации пакета). Согревание проходит быстрее при более высокой температуре водяной бани (например, 40 °C и выше), но клеточный контейнер следует извлечь из водяной бани до перегрева клеток.