

УДК 577.352.462:57.043

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ СКОРОСТЕЙ
ОХЛАЖДЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ****Л.Г. Кулешова, И.Ф. Коваленко***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 61015, ул. Переяславская, 23*

Поступила в редакцию 10 ноября 2007 г.

В работе методом численного моделирования кинетики потери внутриклеточной воды, используя ранее полученные в области субнулевых температур значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка для молекул воды L_{pg} и криопротектора k_{pg} , определены оптимальные скорости охлаждения этих клеток в присутствии 2,5%-в и 5% -в глицерина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембрана, транспорт воды, численное моделирование, оптимальные скорости охлаждения.

Образующийся в процессе замораживания клеточных суспензий внеклеточный лед приводит к нарушению термодинамического равновесия между клеткой и окружающей ее средой. Согласно принципу Ле-Шателье-Брауна [1] в системе "клетка - жидкая фаза" стимулируются процессы, препятствующие удалению от термодинамического равновесия, то есть приводящие к уменьшению пересыщения цитоплазмы относительно внеклеточного раствора. Пересыщение цитоплазмы уменьшается в первую очередь путем оттока воды из клетки, поскольку процесс проникновения воды через избирательно проницаемую плазматическую мембрану является более быстрым, чем других растворенных веществ. По мере концентрирования внеклеточного раствора при вымораживании воды осмотический градиент на плазматической мембране возрастает. Если внеклеточные кристаллы находятся в термодинамическом равновесии с окружающим их маточным раствором, то разность химических потенциалов вне и внутри клетки является не только движущей силой, вызывающей ее обезвоживание, но и силой, с увеличением которой возрастает вероятность образования зародышей льда внутри клетки. При медленном охлаждении кристаллизующейся суспензии в каждый момент времени за счет оттока части воды из клеток в окружающую их жидкую фазу значения химических потенциалов вне и внутри клеток успевают выравниваться. При этом клетки значительно обезвоживаются, но переохлаждение цитоплазмы, а вместе с ним и вероятность внутриклеточной кристаллизации, будут незначительны. Напротив при быстром охлаждении клетки обезвоживаются в значительно меньшей степени, но сильнее переохлаждаются, и термодинамическое равновесие устанавливается за счет образования и роста внутриклеточных кристаллов льда. Таким образом, в зависимости от того является ли скорость охлаждения низкой или высокой внутриклеточная вода выходит из клеток и присоединяется к фазе внеклеточного льда или же замерзает внутриклеточно. Образование внутриклеточного льда при больших скоростях охлаждения, как правило, приводит к потере целостности плазматических мембран и развитию лизиса клеток [2]. Значительное обезвоживание и длительное воздействие концентрированных внеклеточных растворов при медленных скоростях охлаждения также губительно для клеток [3]. Существование оптимальной скорости охлаждения, которая минимизирует повреждение клеток в результате действия этих двух факторов было подтверждено экспериментально для различного типа клеток: действительная кривая сохранности клеток как функция скорости охлаждения носит куполообразный характер [4]. Оптимальная скорость охлаждения является функцией проницаемости

Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения...

плазматической мембраны клеток для молекул воды и вероятности того, что остающаяся при дегидратации клеток в зоне развития внеклеточных кристаллов внутриклеточная вода может закристаллизоваться при необходимом для этого ее переохлаждении. Следовательно, оптимальной скоростью является та максимальная скорость охлаждения, при которой еще происходит безопасное обезвоживание клеток и не формируется повреждающий внутриклеточный лед. Отличия в транспортных характеристиках плазматических мембран различного типа клеток и в вероятности внутриклеточного льдообразования обуславливает существование различных численных значений оптимальных скоростей охлаждения.

Классическим способом оценки транспортных характеристик плазматических мембран клеток для молекул воды и криопротекторов является получение экспериментальной кинетической кривой изменения клеточного объема в средах различной тоничности. При температурах выше 0°C для контроля объемных изменений используется несколько методов. К их числу относятся: определение времени лизиса клеток в гипотонических средах, которое пропорционально проницаемости L_p плазматических мембран для молекул воды [5,6]; измерение объемного ответа клеток электронным счетчиком Coulter [7,8], световой микроскопией, оснащенной диффузионной камерой для смены растворов [9,10,11]. Численные значения коэффициентов проницаемости плазматических мембран сперматозоидов ряда млекопитающих (барана, быка, кролика, мыши, человека) для молекул воды L_p , определенные этими методами, как в отсутствие криопротекторов, так и при их наличии в среде, хорошо согласуются между собой и лежат в интервале от $0,85 \times 10^{-13}$ до $17 \times 10^{-13} \text{ м}^3/\text{Нс}$ (0,5-10 мкм/мин атм.), соответственно энергия активации U_a составляет от 12 до 60 кДж/моль (3-14 ккал/моль) [12].

Однако экстраполяция данных о коэффициентах проницаемости плазматических мембран клеток L_p и об энергии активации U_a , определенных при температурах выше 0°C , к области субнулевых температур для оценки параметров проницаемости L_{pg} в зоне формирования внеклеточных кристаллов льда и прогнозирования оптимальной скорости охлаждения оказалась безуспешной. Так, численное моделирование транспорта воды в спермиях человека при замораживании на основании данных о L_p свидетельствует о том, что клетки способны обезвоживаться даже при скоростях охлаждения около $7000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Однако экспериментально определенная оптимальная скорость для спермиев человека ниже $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. [13,14,15]. Аналогичные оценки для сперматозоидов мыши и собаки показали, что прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения составляла бы около $5000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, в то время как экспериментально определенная оптимальная скорость в зависимости от концентрации криопротектора во внеклеточной среде находится в интервале $10-40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для спермиев мыши [12,16,17] и $10-30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для спермиев собаки [18,19]. Для сперматозоидов хряка оптимальная скорость охлаждения, прогнозируемая на основании коэффициентов проницаемости для воды, определенных при положительных температурах, также оказалась на два порядка выше (более $1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) фактически экспериментально установленной ($30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) [20,21]. Причиной такого расхождения вероятнее всего является тот факт, что транспортные характеристики плазматических мембран клеток при температурах ниже 0°C при наличии внеклеточного льда существенно отличаются от таковых при положительных температурах, и потому простая экстраполяция известных данных о L_p не дает ожидаемых результатов. Как показывают оценки, если коэффициент проницаемости плазматических мембран L_{pg} при субнулевых температурах как минимум на порядок ниже, а энергия активации U_{Lpg} как минимум в 2-2,5 раза выше,

чем при положительных температурах, то прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения оказывается близкой к экспериментальной [14].

Таким образом, для успешной оптимизации методов криоконсервирования клеточных суспензий крайне необходимо знание таких важных биофизических характеристик как коэффициенты проницаемости плазматической мембраны клеток для молекул воды и криопротекторов не только на этапе эквilibрации клеток в криозащитной среде, но и на этапе фазового перехода в присутствии внеклеточного льда и криопротекторов. Определение численных значений этих параметров позволяет достаточно точно, а priori предсказать наиболее вероятный диапазон оптимальных скоростей замораживания для данного типа клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе [22] при определении численных значений коэффициентов проницаемости плазматических мембран клеток для молекул воды L_{pg} и проникающих криопротекторов k_{pg} в условиях непрерывной внеклеточной кристаллизации нами был использован аналитический подход, предложенный Kedem O., Katchalsky A. [23,24] и модифицированный в приложении к криобиологическим задачам Е.А. Гордиенко [25]. В основе метода лежит сочетание физико-математического моделирования изменения клеточного объема и экспериментального изучения осмотического поведения клеток в аналогичных условиях [26]. Приведенный в работе [25] алгоритм расчета изменения объема клеток и концентраций внутриклеточных веществ в процессе кристаллизации клеточной суспензии при наличии проникающего криопротектора предполагает, что коэффициенты фильтрации клеточных мембран L_{pg} и их проницаемости для криопротектора k_{pg} с понижением температуры кристаллизующейся суспензии подчиняются аррениусовым зависимостям и мембрана при этом остается интактной:

$$\begin{aligned} L_{pg}(T) &= L_p(T_0) \exp \left[\frac{U_0}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right] \\ k_{pg}(T) &= k_p(T_0) \exp \left[\frac{U_1}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \end{aligned} \quad (1)$$

где T_0 – исходная (до начала охлаждения) температура клеточной суспензии, U_0 и U_1 – соответственно энергии активации процесса переноса через плазматическую мембрану молекул воды и растворенного вещества, R_0 – универсальная газовая постоянная. Если охлаждение производится со скоростью β , то

$$T_0 \frac{d}{dt} = \beta \frac{d}{d\hat{T}}, \quad (2)$$

где $\hat{T} = \frac{T}{T_0}$ – относительная температура суспензии.

Считается, что внеклеточный лед возникает при нулевом переохлаждении внеклеточной среды и в процессе замораживания находится в термодинамическом равновесии с окружающим его внеклеточным раствором. Эффектами, связанными с кривизной и размерами кристаллов льда и соответствующими лаплассовыми эффектами, авторы работы [25] пренебрегают. Согласно теоретическим подходам [25], в условиях внеклеточной кристаллизации осмотическое равновесие в системе относительно проникающего (π_1) и непроникающего (π_2) через плазматическую

Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения...

скорость

вирования
изических
т клеток
клеток в
леточного
позволяет
имальных

>ициентов
икающих
нами был
[23,24] и
нко [25].
зменения
клеток в
зменения
лизации
тает, что
юти для
услензии
тной:

о)

и и ; -
мбрану
гая. Если

(2)

дении
ячССКОМ
ными с
совыми
[25],
теме
скуо

мембрану веществ с учетом объемной доли жидкой незамерзающей фракции χ в замораживаемой суспензии описывается следующими равенствами:

$$\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \frac{(1 - \alpha g_0) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}} (y - \alpha) g_0}{1 - g_0 y - \chi(1 - g_0)}, \quad \hat{\pi}_2^{\text{out}} = \frac{(1 - \alpha g_0) \hat{\pi}_{2\infty} - (1 - \alpha) g_0}{1 - g_0 y - \chi(1 - \alpha g_0)}, \quad (3)$$

где $\hat{\pi}_1^{\text{out}} = \pi_1^{\text{out}} / \pi_{20}^{\text{in}}$, $\hat{\pi}_2^{\text{out}} = \pi_2^{\text{out}} / \pi_{20}^{\text{in}}$ - приведенные значения внеклеточного осмотического давления соответственно проникающего

$$\pi_1^{\text{out}} = \frac{\pi_{1\infty} - g_0 \pi_1^{\text{in}} (V/V_0 - \alpha)}{1 - g_0 V/V_0} \text{ и не проникающего } \pi_2^{\text{out}} = \frac{\pi_{2\infty} - (1 - \alpha) g_0 \pi_{20}^{\text{in}}}{1 - g_0 V/V_0}$$

веществ; $\hat{\pi}_1^{\text{in}} = \pi_1^{\text{in}} / \pi_{20}^{\text{in}}$ - приведенное значение внутриклеточного осмотического давления проникающего через плазматическую мембрану вещества; π_{20}^{in} - начальное значение суммарного осмотического давления непроникающих веществ внутри клетки; $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$ - асимптотические значения осмотического давления соответственно проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ, соответствующие равномерному их распределению вдоль системы; $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$ - приведенные асимптотические значения осмотического давления соответственно проникающего ($\hat{\pi}_{1\infty} = \pi_{1\infty} / \pi_{20}^{\text{in}}$) и непроникающего ($\hat{\pi}_{2\infty} = \pi_{2\infty} / \pi_{20}^{\text{in}}$) веществ; $y = \frac{V}{V_0}$ -

относительный объем клетки; g_0 - начальное значение отношения суммарного объема клеток к полному объему клеточной суспензии; α - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ. Соотношения (3) были получены в предположении, что при росте кристаллов льда растворенные вещества концентрируются в жидких межкристаллических каналах, молекулярно не захватываясь льдом, а, следовательно, концентрации растворенных веществ в жидком внеклеточном растворе изменяются в соответствии с фазовой диаграммой.

Адекватность указанной теоретической модели [25] была нами доказана при определении транспортных характеристик плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка (ВНК-21) при их охлаждении со скоростями $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в присутствии различных концентраций глицерина [22]. Экспериментальные кинетические кривые изменения объема клеток почек сирийского хомячка при субнулевых температурах были получены методом криомикроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику изменения относительного объема клетки и концентраций проникающего и непроникающего через плазматическую мембрану веществ внутри клетки в процессе внеклеточной кристаллизации, имеет вид [25]:

$$\frac{dy}{d\hat{T}} = p \exp[a(\hat{T} - 1)/\hat{T}] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - \left[1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty} (1 - \alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{\text{in}} (y - \alpha) g_0}{\hat{\pi}_{2\infty} (1 - \alpha g_0) - (1 - \alpha) g_0} \right] \hat{\pi}_2^{\text{out}} \right\}, \quad (4)$$

$$\frac{d\hat{\pi}_1^{\text{in}}}{d\hat{T}} = \frac{p}{y - \alpha} \left\{ [\sigma_1 \hat{\pi}_1^{\text{in}} + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - (1 + \sigma_1 \Phi_{\text{out}}) \hat{\pi}_2^{\text{out}}] \times [(1 - \sigma_1) \hat{\pi}_{1\infty} - \hat{\pi}_1^{\text{in}}] \times \right. \\ \left. \times \exp[\alpha(\hat{T} - 1)/\hat{T}] - q(\hat{\pi}_1^{\text{in}} - \Phi_{\text{out}} \hat{\pi}_2^{\text{out}}) \exp[b(\hat{T} - 1)/\hat{T}] \right\},$$

где
$$\Phi_{out} = \frac{\pi_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^m(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0}, \quad p \equiv \frac{T_0}{\beta\tau_0}, \quad q \equiv \frac{\tau_0(T_0)}{\tau_1(T_0)}, \quad a \equiv \frac{U_0}{R_0T_0}, \quad b \equiv \frac{U_1}{R_0T_0},$$

 $\tau_0 = (\gamma_0 L_{pg} \pi_{20}^m)^{-1}, \quad \tau_1 = (\gamma_0 k_{pg})^{-1}, \quad \gamma_0$ - исходное поверхностно-объемное отношение клетки (для клеток почек сирийского хомячка $\gamma_0 = 0,5 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$), σ_1 - коэффициент отражения плазматической мембраны для проникающего через мембрану вещества (для глицерина принимается равным 0,95), энергии активации для молекул воды U_0 и молекул глицерина U_1 соответственно составляют 22 кДж/моль и 68 кДж/моль, параметр q принимается равным 0,1.

Сравнение экспериментальных данных об изменении объема клеток в процессе кристаллизации клеточной суспензии и теоретических, полученных в условиях идентичных проведенным экспериментам, при их максимальном совпадении позволило получить численные значения коэффициентов фильтрации L_{pg} и проницаемости k_{pg} клеток почек сирийского хомячка (табл.1).

Таблица 1 Транспортные характеристики плазматических мембран клеток почек сирийского хомячка в различных условиях замораживания [22].

Концентрация глицерина, С, %	Скорость охлаждения			
	1 ⁰ С/мин		5 ⁰ С/мин	
	$L_{pg}, \text{ м}^3/\text{Нс}$	$k_{pg}, \text{ м/с}$	$L_{pg}, \text{ м}^3/\text{Нс}$	$k_{pg}, \text{ м/с}$
2,5	$0,846 \times 10^{-13}$	$0,667 \times 10^{-8}$	$1,410 \times 10^{-13}$	$1,110 \times 10^{-8}$
5,0	$0,635 \times 10^{-13}$	$0,500 \times 10^{-8}$	$0,769 \times 10^{-13}$	$0,606 \times 10^{-8}$

Как было сказано выше, наиболее адекватно поведение биологической системы при замораживании описывают транспортные характеристики, определенные при наибольшей скорости охлаждения, при которой доминирующим биофизическим ответом клеток является обезвоживание. Подставляя в систему дифференциальных уравнений (4) численные значения параметров проницаемости L_{pg} и k_{pg} мембран клеток почек сирийского хомячка при скорости охлаждения 5⁰С/мин (табл.1), нами было промоделировано осмотическое поведение клеток при скоростях охлаждения β в интервале от 5 до 100⁰С/мин в присутствии 2,5% -в и 5%-в глицерина. Уравнения (4) решались численно методом Рунге-Кутты 4-го порядка с использованием разработанной компьютерной программы. Кинетику изменения концентрации C внеклеточного раствора в процессе замораживания задавали при расчетах аналитически путем аппроксимации известной из литературы [27] фазовой диаграммы плавления водного раствора глицерина в следующем виде:

$$C = -8,19 \cdot 10^{-4} T^3 + 0,58 T^2 - 1,40 \cdot 10^2 T + 1,12 \cdot 10^4, \quad (5)$$

где T – текущая температура.

На основании полученных кинетических кривых изменения клеточного объема были спрогнозированы наиболее вероятные оптимальные скорости охлаждения данного типа клеток. Критерием оценки оптимальной скорости охлаждения служил максимально допустимый, безопасный уровень обезвоживания клеток. Р. Mazur [28] показал, что повреждающий яйцеклетки и эмбрионы внутриклеточный лед возникает в том случае, если при обезвоживании в них остается более 10-15% -в воды. При

Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения...

определении прогнозируемой оптимальной скорости охлаждения сперматозоидов ряда млекопитающих оптимальной считалась та, при замораживании с которой в клетках остается не более 5% -в исходного объема воды, при этом температурный предел принимался либо -15°C [29], либо -30°C [12,13,18,20]. Известно, что при температуре -30°C образование внутриклеточного льда в биологических объектах неизбежно происходит гомогенным механизмом [30,31,32]. Данную температуру можно рассматривать как предельную, до достижения которой теоретически возможно обезвоживание клеток.

На рис.1 приведены кинетические кривые изменения клеточного объема клеток почек сирийского хомячка, рассчитанные с использованием вышеописанной термодинамической модели и определенных транспортных характеристик L_{pg} и k_{pg} .

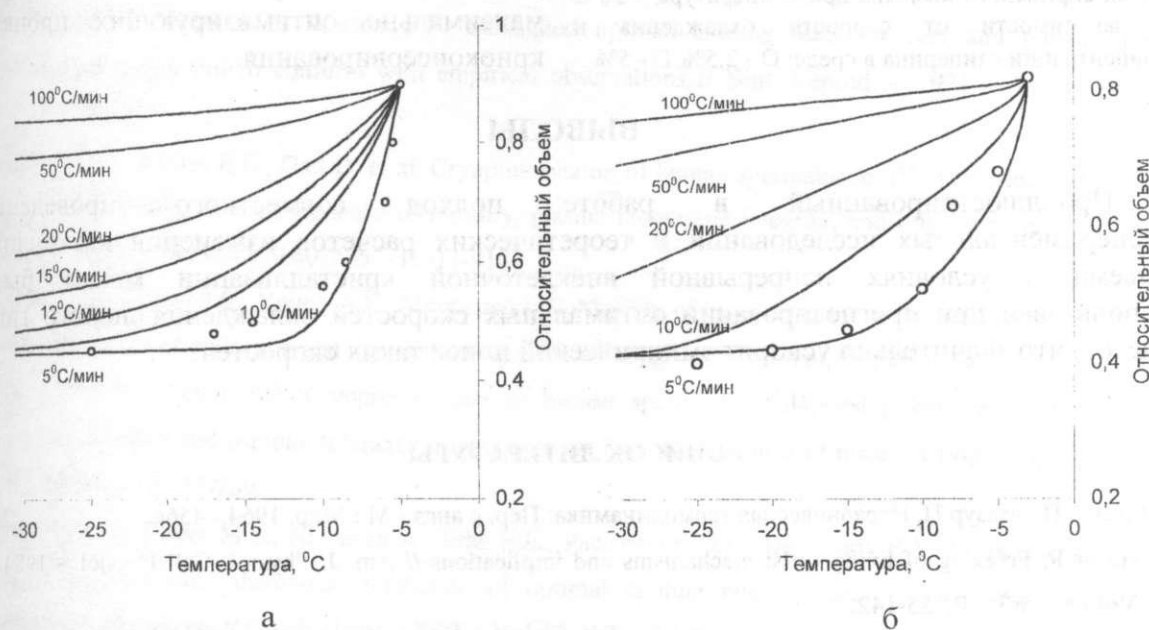


Рис.1 Кинетические кривые изменения относительного объема клеток почек сирийского хомячка при различных скоростях охлаждения в присутствии глицерина в среде: а - 2,5%, б - 5% (сплошные линии – расчетные данные, О - экспериментальные данные)

Моделирование транспорта воды при разных скоростях охлаждения позволило оценить процент внутриклеточной воды, остающейся в клетках при температуре -30°C , пользуясь соотношением:

$$\frac{V - V_b}{V_0 - V_b} \times 100\%, \quad (6)$$

где V - объем клетки при -30°C ; V_b - осмотически неактивный объем; V_0 - исходный объем клетки. Прогнозируемая оптимальная скорость охлаждения для данного типа клеток была определена графически из данных, представленных на рис.2.

Прогнозируемые оптимальные скорости охлаждения при концентрации глицерина в суспензионной среде 2,5%-й и 5%-в соответственно составляют не более $11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и $12^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Реально внутриклеточный лед может возникнуть гетерогенным механизмом

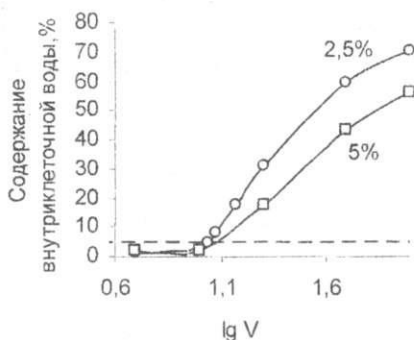


Рис.2 Прогнозируемое содержание воды в клетках почек сирийского хомячка при температуре -30°C в зависимости от скорости охлаждения и концентрации глицерина в среде: \circ - 2,5%, \square - 5%

при температурах гораздо выше -30°C . При этих температурах, обычно в интервале -5°C до -20°C , потенциально в клетках остается значительно больше воды, чем по результатам проведенной оценки. В связи с этим, полученные прогнозируемые скорости являются несколько завышенными. Однако важность их определения состоит в том, что они позволяют существенно ограничить интервал экспериментального уточнения скоростей охлаждения максимально оптимизирующих процесс криоконсервирования.

ВЫВОДЫ

Проиллюстрированный в работе подход совместного проведения экспериментальных исследований и теоретических расчетов изменения клеточного объема в условиях непрерывной внеклеточной кристаллизации может быть использован при прогнозировании оптимальных скоростей охлаждения любого типа клеток, что значительно ускорит эмпирический поиск таких скоростей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грот С.П., Мазур П. Неравновесная термодинамика: Пер. с англ. - М.: Мир, 1964. - 456с.
2. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 1984. - Vol.247, №3. - P.125-142.
3. Lovelock J.E. Haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1953. - Vol.10, №4. - P.414-426.
4. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.N.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell Res.* - 1972. - Vol.71, №2. - P.345-355.
5. Noiles E.E., Mazur P., Watson P.F., Kleinhans F.W., Critser J.K. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy // *Biol. Reprod.* - 1993. - Vol.48, №1. - P.99-109.
6. Curry M.R., Redding B.J., Watson P.F. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa // *Cryobiology.* - 1995. - Vol.32, №2. - P.175-181.
7. Gilmore J.A., McGann L.E., Liu J., Gao D.Y., Peter A.T., Kleinhans F.W., Critser J.K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa // *Biol. Reprod.* - 1995. - Vol.53, №5. - P.985-995.
8. Willoughby C.E., Mazur P., Peter A.T., Critser J.K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. - *Biol. Reprod.* - 1996. - Vol.55, №3. - P.715-727.
9. Mc Grath J.J., Nowlen S., Ligon R. Experimental and analytical techniques for determining permeability parameters of individual cells and cell populations // *Cryobiology.* - 1983. - Vol.20, №6. - P.712.

Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения...

10. Mc Grath J.J., Tu S.M., Sherban K., Melkerson M. A microscope diffusion device for the study of osmotic phenomena in individual cells // *Cryobiology*. - 1985. - Vol.22, №6. - P.627-628.
11. Schreuders P.D., Aggarwal S.J., Diller K., Baxter C.R. A microscopic diffusion chamber for measure of the osmotic properties of individual cells // *Cryobiology*. - 1987. - Vol.24, №6. - P.552-553.
12. Devireddy R.V., Swanlund D.J., Roberts K.P., Bischof J.C. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents // *Biol. Reprod.* - 1999. - Vol.61, №3. - P.764-775.
13. Devireddy R.V., Swanlund D.J., Roberts K.P., Pryor J.L., Bischof J.C. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing // *Hum. Reprod.* - 2000. - Vol.15, №5. - P.1125-1135.
14. Curry M.R., Millar J.D., Watson P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations // *Biol. Reprod.* - 1994. - Vol.51, №5. - P.1014-1021.
15. Henry M.A., Noiles E.E., Gao D. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function // *Fertil. Steril.* - 1993. - Vol.60, №5. - P.911-918.
16. Szein J.M., Farley J.S., Young A.F., Mobraaten L.E. Motility of cryopreserved mouse spermatozoa affected by temperature of collection and rate of thawing // *Cryobiology*. - 1997. - Vol.35, №1. - P.46-52.
17. Songsasen N., Leibo S.P. Cryopreservation of mouse sperm. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice // *Cryobiology*. - 1997. - Vol.35, №3. - P.255-269.
18. Thirumala S., Ferrer M.S., Al-Jarrah A., Eilts B.E., Paccamonti D.L., Devireddy R.V. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents // *Cryobiology*. - 2003. - Vol.47, №2. - P.109-124.
19. Yu I., Songsasen N., Godke R.A., Leibo S.P. Differences among dog in responses of their spermatozoa cryopreserved at various cooling and warming rates // *Cryobiology*. - 2002. - Vol.44, №1. - P.57-72.
20. Devireddy R.V., Fahrig B., Godke R.A., Leibo S.P. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates // *Mol. Reprod. Dev.* - 2004. - Vol.67, №4. - P.446-457.
21. Fiser P.S., Fairfull R.V., Hansen C., Shrestha J.N.B., Underhill L. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level // *Mol. Reprod. Dev.* - 1993. - Vol.34, №2. - P.190-195.
22. Кулешова Л.Г., Коваленко И.Ф. Определение транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточной кристаллизации // *Проблемы криобиологии*. - 2006. - Т.16, №1. - С.3-12.
23. Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1958. - Vol.27, №2. - P.229-246.
24. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability // *J. Gen. Physiol.* - 1961. - Vol.45, №2. - P.143-179.
25. Гордненко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. - Киев: Наук. думка, 1994. - 143с.

26. McGrath J.J. Quantitative measurement of cell membrane transport: Technology and applications // *Cryobiology*. - 1997. - Vol.34, №4 - P. 315-334.
27. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А., Вишневский В.И., Розанов Л.Ф. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах. - Киев: Наук. думка, 1977. - 243с.
28. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell. Biophys.* - 1990. - Vol.17, №1. - P.53-92.
29. Thirumala S., Devireddy R.V. A simplified procedure to determine the optimal rate of freezing biological systems // *J. Biomech. Eng.* - 2005. - Vol.127, №2. - P.295-300.
30. Trad F.S., Toner M., Biggers J.D. Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes // *Hum. Reprod.* - 1999. - Vol.14, №6. - P.1569-1577.
31. Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Borel R.I., Tompkins R.G., Yarmush M.L., Toner M. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethylsulfoxide // *Biophys. J.* - 1993. - Vol.65, №6. - P.2524-2536.
32. Karlsson J.O.M., Cravalho E.G., Toner M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing // *J. Appl. Phys.* - 1994. - Vol.75, №9. - P.4442-4455.